

PATHOGENESE EN SYMPTOOMEXPRESSIE IN VIRUSZIEKE TABAK

Een onderzoek naar veranderingen in oplosbare eiwitten

*With a summary: Pathogenesis and symptom expression
in virus-diseased tobacco plants*

A study of changes in soluble proteins

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad
van doctor in de Landbouwwetenschappen
op gezag van de Rector Magnificus, Mr. J.M. Polak,
hoogleraar in de Rechts- en Staatswetenschappen
van de Westerse Gebieden,
te verdedigen tegen de bedenkingen
van een commissie uit de Senaat
van de Landbouwhogeschool te Wageningen
op vrijdag 7 april 1972 te 16.00 uur

door

L.C. VAN LOON

LABORATORIUM VOOR VIROLOGIE, LANDBOUWHOGESCHOOL, WAGENINGEN, 1972

Dit proefschrift met stellingen van

LEENDERT CORNELIS VAN LOON,

landbouwkundig ingenieur, geboren te Delft, 15 september 1941,
is goedgekeurd door de promotor, Dr. Ir. J.P.H. van der Want,
hoogleraar in de Virologie, en de co-promotor, Dr. A. van Kammen.

De Rector Magnificus van de Landbouwhogeschool,

J.M. POLAK

Wageningen, 3 februari 1972

CHERCHER C'EST CHOISIR

STELLINGEN

I

Het model van Hadwiger en Schwochau ter verklaring van de aard van de reactie van een plant na infectie met een pathogeen is niet van toepassing op de combinatie TMV - tabak. Daarom moet bij verklaringen dat van schimmels of bacteriën afkomstige factoren verantwoordelijk zouden zijn voor de door deze pathogenen in tabaksbladeren geïnduceerde hypersensitieve reactie, terughoudendheid worden betracht.

Hadwiger, L.A. en Schwochau, M.E. (1969). *Phytopathology* 59, 223-227.

Lozano, J.C. en Sequeira, L. (1970). *Phytopathology* 60, 833-838.

II

Het optreden van de hypersensitieve reactie van tabak na infectie met TMV berust niet op *de novo* synthese van een of meer eiwitten die de uitbreiding van de lokale vlekken remmen.

Loebenstein, G., Sela, B. en Praagh, T. van, (1969). *Virology* 37, 42-48.

Loon, L.C. van, en Geelen, J.L.M.C. (1972). in druk.

III

Een correlatie tussen virusvermenigvuldiging, symptoomexpressie en peroxidase-activiteit sluit niet uit dat peroxidase een rol speelt bij resistentie tegen het betrokken virus binnen dezelfde plantesoort.

Wood, K.R. en Barbara, D.J. (1971). *Physiol. Pl. Path.* 1, 73-81.

Loon, L.C. van, en Geelen, J.L.M.C. (1972). in druk.

IV

Het door Niblett en Semancik gesuggereerde verband tussen lading en specifieke infectiositeit van cowpea-mozafekvirus is onvoldoende bewezen.

Niblett, C.L. en Semancik, J.S. (1970). *Virology* 41, 201-207.

V

De methode waarbij de latentieperiode van virussen die in de vector circuleren bepaald wordt met infectiezuigtijden van 24 uur, is in beginsel juist, maar geeft voor het erwte-enatiemozaïekvirus te hoge waarden.

Sylvester, E.S. (1965). *Virology* 25, 62-67.

VI

- a) Bij het onderzoek naar de pathogenese in geïnfecteerde planten dient meer aandacht besteed te worden aan de rol van hormonen bij het optreden van fysiologische veranderingen.
- b) De bestudering van de rol van hormonen bij het optreden van fysiologische veranderingen in geïnfecteerde planten kan bijdragen tot inzicht in het werkingsmechanisme van deze stoffen.

VII

De conclusie van Leshem dat de werking van abscissinezuur in de door hem onderzochte plantaardige systemen berust op een stimulering van de ribonuclease-activiteit door dit hormoon, wordt door zijn experimenten onvoldoende gesteund.

Leshem, Y. (1971). *Physiol. Plant.* 24, 85-89.

VIII

Het is onwaarschijnlijk dat de groeiremmende werking van CCC op planten uitsluitend het gevolg is van remming van de synthese van gibberellinen door deze verbinding.

Bragt, J. van, (1969). *Neth. J. Agric. Sci.* 17, 183-188.

Lang, A. (1970). *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21, 537-570.

IX

Een interpretatie van kwantitatieve verschillen in isoënzypatronen op polyacrylamidegels is slechts zinvol, als overeenstemming bestaat tussen de kleurintensiteit van de gezamenlijke isoënzymbanden en de, onder vergelijkbare omstandigheden gemeten, activiteit van het enzym in oplossing.

X

Noch het door Kumosinski en Timasheff op grond van lichtverstrooiingsexperimenten, noch het door Adams en Lewis op grond van evenwichtscentrifugering opgestelde model lijken de associatie van runder- β -lactoglobuline A adequaat te beschrijven.

Kumosinski, T.F. en Timasheff, S.N. (1966). J. Am. Chem. Soc. 88, 5635-5642.

Adams, E.T. en Lewis, M.S. (1968). Biochemistry 7, 1044-1053.

XI

De conclusie van Bartels-Schooley en MacNeill dat er twee verschillende mechanismen zijn waarop de fungicide werking van benzimidazolen kan berusten, is onvoldoende gefundeerd.

Bartels-Schooley, J. en MacNeill, B.H. (1971). Phytopathology 61, 816-819.

XII

De waarnemingen van Ledoux, Huart en Jacobs laten weinig twijfel dat transport van bacterie-DNA in *Arabidopsis thaliana* plaatsvindt; het optreden van covalente bindingen tussen bacterie- en plant-DNA, zoals door genoemde auteurs voorgesteld, lijkt daarentegen niet waarschijnlijk.

Ledoux, L., Huart, R. en Jacobs, M. (1971). European J. Biochem. 23, 96-108.

XIII

De door Kauffmann en Wirthwein aangevoerde gegevens zijn onvoldoende om aannemelijk te maken dat de substitutie van het halogeen in 2-halogeen-4-methylchinolines door een piperidino- of een diëthylaminogroep uitsluitend verloopt via een AE_n mechanisme.

Kauffmann, T. en Wirthwein, R. (1971). Angew. Chem. Internat. Edit. 10, 20-33.

XIV

Het rendement van het wetenschappelijk onderwijs kan aanmerkelijk vergroot worden door aangepaste faciliteiten voor de gehuwde werkende vrouw.

Wanneer het de afgestudeerden aan de Landbouwhogeschool tot plicht wordt gerekend om, als zij daarvoor de bekwaamheden hebben, hun studie met een proefschrift te bekronen, dienen zij hiertoe in financieel, materiëel en personeel opzicht gelijkelijk in de gelegenheid te worden gesteld.

Polak, J.M., LH-Berichten 15 december 1971.

Voor Ada

INHOUD

| | |
|---|----|
| Gebruikte afkortingen | 5 |
| 1. Inleiding | 7 |
| 1.1. Doelstelling | 7 |
| 1.2. Genetische eigenschappen van tabaksmozaïekvirus | 9 |
| 1.3. Genetische aspecten van tabak in verband met TMV-infectie | 11 |
| 1.4. Veranderingen in eiwitconstitutie en enzymactiviteiten van tabak na infectie met TMV in verband met het symptoomtype | 16 |
| 1.5. Keuze van de oplosbare eiwitfractie voor onderzoek naar veranderingen in eiwitconstitutie na infectie met TMV | 31 |
| 2. Materiaal en methoden | 33 |
| 2.1. Planten | 33 |
| 2.2. Virussen | 33 |
| 2.2.1. Tabaksmozaïekvirus | 33 |
| 2.2.2. Tabaksnecrosevirus | 34 |
| 2.2.3. Tabaksratelvirus | 34 |
| 2.2.4. Komkommermozaïekvirus | 34 |
| 2.2.5. Aardappelvirus X | 34 |
| 2.2.6. Aardappelvirus Y | 34 |
| 2.3. TMV-eiwit | 35 |
| 2.3.1. Bereiding | 35 |
| 2.3.2. Serologie | 35 |
| 2.4. Bereiding van oplosbare eiwitten uit tabak | 35 |
| 2.4.1. Procedure; criteria voor zuiverheid; opbrengst | 35 |
| 2.4.2. Bereiding van radioactief gemerkte oplosbare eiwitten | 36 |
| 2.5. Fractionering van de gezuiverde eiwitfractie | 37 |
| 2.5.1. Gefractioneerde precipitatie met ammoniumsulfaat | 37 |
| 2.5.2. Gelfiltratie over Sephadex G 100 | 37 |
| 2.5.3. Chromatografie op DEAE-cellulose | 37 |
| 2.6. Elektroforese in polyacrylamidegel | 39 |
| 2.6.1. Uitvoering | 39 |
| 2.6.2. Zichtbaar maken van eiwitten op de gels na elektroforese | 42 |
| 2.6.3. Zichtbaar maken van enzymen op de gels na elektroforese | 43 |
| 2.6.4. Evaluatie | 44 |
| 2.7. Toetsen van het effect van verschillende eiwitfracties en chemische verbindingen | 45 |
| 2.8. Chemicaliën | 46 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3. | Veranderingen in eiwitpatronen van verschillende tabaksvariëteiten na infectie met verschillende TMV-stammen bij verschillende temperaturen | 47 |
| 3.1. | Vergelijking van de eiwitpatronen van tabak cv. Samsun en Samsun NN | 47 |
| 3.2. | Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun na infectie met TMV W U1 bij 20° | 49 |
| 3.3. | Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun na infectie met TMV W U1 bij 30° | 53 |
| 3.4. | Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun EN na infectie met TMV W U1 bij 20° | 55 |
| 3.5. | Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun NN na infectie met TMV W U1 bij 20° | 55 |
| 3.6. | Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun NN na infectie met TMV W U1 bij 30° | 61 |
| 3.7. | Veranderingen in eiwitpatronen van <i>N. glutinosa</i> na infectie met TMV W U1 bij 20° | 63 |
| 3.8. | Veranderingen in eiwitpatronen van tabak na infectie met TMV <i>vulgare</i> | 65 |
| 3.9. | Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun na infectie met TMV HR (U8) bij 20° | 65 |
| 3.10. | Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun EN na infectie met TMV HR (U8) bij 20° | 68 |
| 3.11. | Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun NN na infectie met TMV HR (U8) bij 20° | 69 |
| 3.12. | Symptomen van Holmes' necrotiserende stam 1952 D op tabak cv. Samsun bij 20 en 30° | 69 |
| 4. | Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun en Samsun NN na infectie met verschillende virussen bij 20° of na verschillende behandelingen | 71 |
| 4.1. | Keuze van de betrokken virussen | 71 |
| 4.2. | Veranderingen na infectie met PVX of PVY ⁰ | 71 |
| 4.3. | Veranderingen na infectie met CMV gele stam | 73 |
| 4.4. | Veranderingen na infectie met TNV | 76 |
| 4.5. | Veranderingen na infectie met TRV of PVY ⁿ | 77 |
| 4.6. | Veranderingen na menginfecties | 79 |
| 4.7. | Veranderingen na bespuiting met kwikchloride | 80 |
| 4.8. | Veranderingen na afsnijden of bevriezen van de bladeren | 81 |
| 4.9. | Vergelijking van de kwantitatieve veranderingen na virusinfecties en na behandelingen | 82 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.10. | Vergelijking van de kwalitatieve veranderingen na virusinfecties | 86 |
| 4.11. | De mogelijkheden van het gebruik van eiwitpatronen voor de diagnostiek van virusziekten | 88 |
| 5. | Eigenschappen van eiwitcomponenten die na infectie verschijnen | 90 |
| 5.1. | Kinetiek van de inductie van de vier nieuwe componenten in tabak cv. Samsun NN na infectie met TMV W U1 | 90 |
| 5.2. | Invloed van de vlek Dichtheid op de hoeveelheden van de nieuwe componenten | 91 |
| 5.3. | Het effect van actinomycine D op de inductie van de nieuwe componenten | 91 |
| 5.4. | Veranderingen in de incorporatie van radioactief gemerkte aminozuren in eiwitten van tabak cv. Samsun NN na infectie met TMV W U1 | 95 |
| 5.5. | Mogelijke functies van de nieuwe componenten | 98 |
| 5.6. | Toetsen van een eventuele remmende werking van de nieuwe componenten | 102 |
| 5.6.1. | Correlatie tussen het voorkomen van de nieuwe componenten en het optreden van verworven systemische resistentie <i>in vivo</i> | 102 |
| 5.6.2. | Afwezigheid van een remmend effect van de nieuwe componenten <i>in vitro</i> | 104 |
| 5.6.3. | Correlatie tussen het voorkomen van de nieuwe componenten en remming van de virussynthese <i>in vivo</i> | 106 |
| 5.7. | Onderzoek naar verdere kwalitatieve verschillen in eiwitconstitutie tussen niet-geïnfecteerde en met TMV W U1 geïnfecteerde tabak cv. Samsun NN | 107 |
| 5.7.1. | Gefractioneerde precipitatie met ammoniumsulfaat | 107 |
| 5.7.2. | Gelfiltratie over Sephadex G 100 | 108 |
| 5.7.3. | Chromatografie op DEAE-cellulose | 114 |
| 5.8. | Kwalitatieve veranderingen in isoënzypatronen van tabak cv. Samsun NN na infectie met TMV W U1 | 115 |
| 5.8.1. | Ribonuclease | 115 |
| 5.8.2. | Peroxidase | 116 |
| 6. | Algemene discussie | 119 |
| 7. | Samenvatting | 133 |
| 8. | Summary | 137 |

| | |
|------------------|-----|
| 9. Literatuur | 141 |
| Dankwoord | 151 |
| Curriculum vitae | 152 |

GEBRUIKTE AFKORTINGEN

| | |
|------------------|--|
| A ₂₈₀ | Optische dichtheid bij 280 nm |
| AMD | Actinomycine D |
| AVF | Anti-virus factor |
| Bis | N,N-methyleenbisacrylamide |
| CMV | Konkommermozaïekvirus |
| cpm | Tellen per minuut |
| DEAE-cellulose | Diëthylaminoëthylcellulose |
| DNA | Desoxyribonucleïnezuur |
| dpm | Desintegraties per minuut |
| E ₂₆₀ | Extinctie bij 260 nm |
| EDTA | Ethyleendiaminetetraazijnzuur |
| MCE | Mercaptoëthanol |
| μCi | Microcurie |
| m-RNA | Boodschapper-RNA |
| MW | Molecuulgewicht |
| PEG | Polyethyleenglycol |
| POPOP | 1,4-Di-2(5-fenyl-oxazolyl)benzeen |
| PIMV | Tabaksmozaïekvirus para-stam |
| PVX | Aardappelvirus X |
| PVY | Aardappelvirus Y |
| RNA | Ribonucleïnezuur |
| S III | Supernatant na 2 uur centrifugeren bij 150.000 g |
| SDS | Natriumlaurylsulfaat |
| TCA | Trichloorazijnzuur |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyleendiamine |
| TMV | Tabaksmozaïekvirus |
| TMV HR | Tabaksmozaïekvirus Holmes' ribgrass stam |
| TNV | Tabaksnecrosevirus |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethaan |
| TRV | Tabaksratelvirus |
| U.V. | Ultraviolet |

1. INLEIDING

1.1. Doelstelling

Infectie van een gevoelige plant met een virus veroorzaakt in de plant ziektesymptomen die karakteristiek zijn voor de combinatie virus - waardplant. Het ontstaan van symptomen is het gevolg van veranderingen in de normale fysiologische processen van de waardplant, veroorzaakt door een specifieke interactie van de genetische informatie van het virus en het genoom van de waardplant. Variatie van de genetische informatie van het virus in de combinatie virus - waardplant kan leiden tot het ontstaan van verschillende typen symptomen op dezelfde waardplant. Verschillende virussen brengen meestal verschillende symptomen teweeg op dezelfde waardplant en dit is dikwijls eveneens het geval met virusisolaten die op grond van hun serologische eigenschappen beschouwd worden als stammen van eenzelfde virus.

Uit het feit dat inoculatie met het vrije nucleïnezuur van een virus evengoed leidt tot infectie, virusvermenigvuldiging en symptoominductie, volgt dat de eigenschappen van een virus bepaald worden door zijn nucleïnezuur. Het is mogelijk van een virus natuurlijke mutanten te isoleren die zich van de uitgangsstam onderscheiden doordat zij andere symptomen teweegbrengen op één of meer waardplanten. Het is eveneens mogelijk kunstmatige mutanten te maken door behandeling van het virus met een mutagens. Deze mutanten moeten zich van de uitgangsstam onderscheiden in hun symptomen op tenminste één waardplant, daar dit criterium praktisch uitsluitend hanteerbaar is voor hun isolatie. Daar opheldering van de nucleotidenvolgorde in het nucleïnezuur geen inzicht verschaft omtrent de wijze waarop de genetische eigenschappen van een virus tot uitdrukking worden gebracht, kan alleen informatie hieromtrent verkregen worden door middel van onderzoek naar door het virusnucleïnezuur gecodeerde eiwitten.

Op een enkele uitzondering na, wordt het nucleïnezuur van plantevirussen gevormd door RNA. Dit dient als matrix voor zijn eigen vermenigvuldiging en heeft tevens een boodschapper-functie. De door het virus-RNA gecodeerde eiwitten zullen dus een onmiddellijke afspiegeling vormen van de genetische informatie van het virus. In het geval van kunstmatige mutanten is gebleken dat in een aantal gevallen aminozuursubstituties in het manteleiwit voorkomen, en dat deze in vrijwel alle gevallen verklaard kunnen worden uit de verandering van één base in het virus-RNA. Hieruit blijkt dat de genetische informatie van een virus bepalend is voor de specificiteit van de symptomen in de combinatie virus - waardplant. Onderzoek naar de bijdrage van het virus in de symptoomvorming zal dus moeten geschieden door het isoleren en karakteriseren van de door het virus-RNA gecodeerde eiwitten.

Variatie van het genoom van de waardplant in de combinatie virus - waardplant geeft meestal aanleiding tot inductie van verschillende typen symptomen door hetzelfde virus of dezelfde virusstam. Hetzelfde virus brengt meestal verschillende symptomen teweeg op verschillende waardplantsoorten of -variëteiten. De aanwezigheid van zogenaamde

resistentiegenen in de plant, hetzij van nature aanwezig, hetzij door kruising ingebracht, sluit infectie door het pathogeen uit, of is verantwoordelijk voor een overgevoelighedsreactie waardoor de verspreiding van het pathogeen in de plant beperkt blijft. Bij verschillende schimmelziekten is een gen om gen relatie bekend, waarbij de plant over een aantal resistentiegenen (loci of allelen) beschikt die, in dominante vorm aanwezig, de plant onvatbaar maken voor, of de interactie schimmel - waardplant doen verkeren in een overgevoelighedsreactie bij infectie door stammen van de schimmel die corresponderende virulentiegenen bezitten. Gezien de geringe hoeveelheid genetische informatie van een virus is vergelijking met die van een schimmel, is de aanwezigheid van enige verschillende virulentiegenen op het virusgenoom niet aannemelijk. Er kan evenwel toch in een aantal virus - waardplant combinaties sprake zijn van een gen om gen relatie, waarbij een virusgen zou kunnen corresponderen met een resistentiegen dat, in dominante vorm aanwezig, de plant onvatbaar of overgevoelig maakt voor infectie met het desbetreffende virus. In dit geval zou de relatie slechts één gen omvatten. In de combinatie tabaksmozaïekvirus - tabak zijn zelfs meerdere allelen van een resistentiegen van de waardplant bekend. Hieruit blijkt hoezeer het genoom van de plant betrokken is bij het al of niet tot stand komen van een ziektebeeld. Op deze grond berust ook het zoeken naar rassen van een soort die onvatbaar of verminderd vatbaar zijn voor virusziekten. Onderzoek naar de bijdrage van de plant in de symptoomvorming zal dan ook moeten geschieden op het niveau waarop de genetische informatie van de plant tot uitdrukking gebracht wordt, d.w.z. in de synthese van eiwitten.

Door de ontwikkeling van nieuwe fractionerings- en scheidingstechnieken is het mogelijk geworden eiwitten uit planten in natieve vorm te isoleren en in componenten te scheiden. Door vergelijking van eiwitpatronen uit niet-geïnfecteerde en met een bepaald virus geïnfecteerde planten kan worden nagegaan in welke mate verschillen optreden. Identificatie van deze verschillen kan aanwijzingen leveren aangaande de veranderingen in het metabolisme van de waardplant die zich als gevolg van infectie voltrekken. De fysiologische betekenis hiervan bij de pathogenese en symptoomexpressie is van belang voor het inzicht in het tot stand komen van een bepaald type symptomen. Dit inzicht kan bijdragen tot begrip omtrent het mechanisme van de pathogenese en aanwijzingen leveren op welke wijze resistentie tegen virusziekten kan worden bevorderd.

Van tabaksmozaïekvirus (TMV) zijn een groot aantal verschillende stammen bekend die zich onderscheiden in de symptomen die zij teweegbrengen op verschillende waardplanten. Evenzo zijn van tabak (*Nicotiana tabacum* L.) verschillende natuurlijke of door kruising verkregen variëteiten beschikbaar die verschillen in hun reactie op infectie met TMV. De combinatie TMV - tabak vormt daardoor een aantrekkelijk model voor het hierboven geschetste soort onderzoek. Om die reden werd dit systeem als onderzoeksobject gekozen.

1.2. Genetische eigenschappen van tabaksmozaïekvirus

Op grond van de aanwezigheid van ongeveer 6400 nucleotiden in het enkelstrengige TMV-RNA kan verwacht worden dat het TMV-RNA kan coderen voor 12-14 eiwitten. Hiervan is echter alleen het uit 158 aminozuren bestaande manteleiwit bekend. De overeenkomst tussen plantevirussen en de kleine RNA-fagen in de wijze van RNA-vermeerdering, maakt het aannemelijk dat, naar analogie met deze laatste, het TMV-RNA informatie bevat voor een TMV-RNA afhankelijke RNA-polymerase (Mundry, 1967; Takahashi, 1967). Uit het feit dat mutanten bekend zijn die zich onderscheiden in de symptomen die zij teweegbrengen, maar eenzelfde aminozuurvolgorde in het manteleiwit bezitten als de uitgangsstam, lijkt de conclusie gerechtvaardigd dat één of meer door het virus-RNA gecodeerde eiwitten een rol spelen bij de symptoomvorming in geïnfecteerde planten (Wittmann, 1959).

Aanwijzingen, dat bepaalde gedeelten van het TMV-RNA direct of indirect een rol spelen bij het tot stand komen van de symptomen, stammen uit verschillende onderzoeken. Door Kado en Knight (1966) werd de eiwitmantel van het TMV-RNA in verschillende mate verwijderd en het gedeeltelijk ontmantelde RNA blootgesteld aan de mutagene werking van salpeterigzuur. Genoemde auteurs letten daarbij op de verandering van de eigenschap, systemische mozaïeksymptomen op *Nicotiana sylvestris* te veroorzaken, in de eigenschap lokale vlekken op deze soort te doen ontstaan. Zij verkregen een hoge mutatiesnelheid wanneer 75% van het RNA was ontmanteld en postuleerden daarom de aanwezigheid van een lokale vlekken gen dat gelegen was op ongeveer 3/4 van de lengte van het TMV-RNA, gerekend vanaf het 3'-einde.

Dezelfde overgang van systemische mozaïeksymptomen naar lokale vlekken op *N. tabacum* cv. Java, die eenzelfde genetische constitutie bezit als *N. sylvestris* (vgl. 1.3), werd reeds in 1958 gebruikt door Mundry en Gierer voor de isolatie van kunstmatige mutanten. Bij behandeling van TMV-RNA met salpeterigzuur, bleek dat deze overgang bewerkstelligd kon worden door één enkele van in totaal 180-200 desamineringen. Daar uridylzuur niet gedesamineerd kan worden, kan de omvang van dit cistron 250-300 nucleotiden bedragen (Mundry, 1965). Mundry veronderstelt, dat de in dit cistron aanwezige informatie het effect van het gen van de waardplant dat verantwoordelijk is voor een overgevoeligheidsreactie (vgl. 1.3), te niet doet, waardoor het virus zich door de gehele plant kan verspreiden. Terugmutatie van lokale vlekken naar systemische mozaïeksymptomen op *N. sylvestris* of Java tabak komt noch kunstmatig noch spontaan voor. De beschreven waarnemingen kunnen dus geïnterpreteerd worden als een verliesmutatie in een cistron dat bij de gegeven genetische constitutie van de waardplant, het systemisch worden van het virus, door onderdrukking van de overgevoeligheidsreactie, bewerkstelligt.

Behandeling van TMV met een mutagens levert ongeveer acht maal zo veel levensvatbare mutanten als het percentage overgang van systemische mozaïeksymptomen naar lokale vlekken op *N. sylvestris* (Mundry, 1965). De aanwezigheid van andere, bij de symptoominductie betrokken cistrons, is daarom meer dan waarschijnlijk.

Von Sengbusch (1965) is van mening dat ook de aminozuurvolgorde van het manteleiwit invloed heeft op het type symptomen dat ontstaat na infectie van tabak. Zo ontstaan sterk gele mozafeksymptomen wanneer de plant geïnfecteerd wordt met mutanten die ten opzichte van de uitgangsstam *vulgare* in alkalisch milieu een lagere elektroforetische mobiliteit vertonen. De mutant Ni 102 vormt hierop een uitzondering: deze migreert bij elektroforese wel langzamer, maar veroorzaakt normale symptomen. Door Jockusch (1966a,b, 1968) werd gevonden dat al deze mutanten temperatuursensitief zijn in de zin dat bij 32° slechts een fractie stabiel infectieus materiaal geproduceerd wordt in vergelijking met 23°. Omgekeerd vertonen echter niet alle temperatuursensitieve mutanten een veranderde elektroforetische mobiliteit en daarmee samenhangend sterk gele mozafeksymptomen. Al deze temperatuursensitieve mutanten veroorzaken systemische symptomen bij 32° (ts-I mutanten) en worden gekenmerkt door een defect in de assemblage van RNA en manteleiwit bij verhoogde temperatuur. Dit is het gevolg van een aminozuursubstitutie in het manteleiwit waardoor dit bij 32° in de cel in grote hoeveelheden aanwezig is in een onoplosbare, gedenatureerde vorm. Waar Von Sengbusch (1965) meende dat de mutanten die sterk gele symptomen veroorzaken, door hun veranderde oppervlaktelading de pH van de cel zouden kunnen beïnvloeden, waardoor de afbraak van chlorofyl versneld werd, komen Jockusch en Jockusch (1968) tot de uitspraak dat de vorming van onoplosbare aggregaten van manteleiwit of virusdeeltjes door adsorptie aan membraaneiwitten en vernietiging van celorganellen tot vergeling en afsterven van de cel leidt. Hierbij worden zij gesteund door het feit dat verhoging van de temperatuur tot meer uitgesproken gele symptomen leidt.

Het optreden van dergelijke mechanismen wordt bestreden door Fraser (1969) op grond van zijn waarneming dat afbraak van chloroplast-ribosomaal-RNA veel eerder begint dan die van chlorofyl in met TMV *flavum* geïnfecteerde bladeren, en het feit dat enkele mutanten bij verhoogde temperatuur wel onoplosbaar, gedenatureerd manteleiwit produceren, maar geen gele symptomen veroorzaken. Het gedrag van Ni 102 behoeft dan evenmin als een uitzondering opgevat te worden.

Naast mutanten uit de ts-I klasse werd door Jockusch (1966a,b, 1968) tenminste één mutant geïsoleerd die wordt gekenmerkt doordat bij infectie systemische symptomen wel optreden bij 23°, maar niet bij 32°. Deze mutant heeft geen aminozuursubstitutie in het manteleiwit en wordt gerekend tot de ts-II klasse. Hij onderscheidt zich reeds bij 23° van mutanten uit de ts-I klasse doordat hij aanleiding geeft tot de vorming van kleinere lokale vlekken op Xanthi-nc tabak (Jockusch, 1968). De thermolabiliteit lijkt in dit geval betrekking te hebben op een functie die nodig is voor het systemisch worden van het virus in de waardplant. Een mogelijke verklaring kan worden gezocht in het gevoelig zijn van de voor de vernenigvuldiging van het virus noodzakelijke RNA-polymerase voor verhoogde temperatuur.

De aard der symptomen die stammen en mutanten van TMV teweegbrengen, kan mede bepaald worden door de lokalisatie van het virus in de cel. Fractionering van organellen uit geïnfecteerde cellen en elektronenmicroscopische onderzoeken van geïnfecte-

teerde weefsels wijzen er op dat de U5 stam van TMV, die een zwak groen mozafek veroorzaakt, in chloroplasten voorkomt, terwijl dit niet het geval is met de U1 stam, die het normale lichtgroene-donkergroene mozafekpatroon veroorzaakt (Shalla, 1968). Grannett en Shalla (1970) vermelden echter dat ook verschillende U1 isolaten op verschillende plaatsen in de cel gelokaliseerd kunnen zijn. Elektronenmicroscopische preparaten toonden het ene isolaat in kernen, het andere in chloroplasten. Dit verschil in lokalisatie bleek gecorreleerd met een verschil in de hoeveelheid X-proteïne in de epidermis van geïnfecteerde planten: bij het isolaat dat in chloroplasten werd waargenomen, was deze hoeveelheid aanzienlijk groter. Deze onderzoeken kunnen echter niet uitwijzen of het virus daar wordt gesynthetiseerd waar het in de cel wordt waargenomen (vgl. 1.5). Een invloed van de plaats, bijv. in chloroplasten, op de symptomen lijkt echter niet onaannemelijk.

Daar het TMV-RNA klaarblijkelijk functies bevat die tot uitdrukking komen in de symptomen die het virus teweegbrengt, moet het in principe mogelijk zijn de hiervoor verantwoordelijke, door het TMV-RNA gecodeerde eiwitten, te synthetiseren in een celvrij systeem met TMV-RNA als boodschapper. TMV-RNA stimuleert in aanzienlijke mate de incorporatie van aminozuren in eiwit in een celvrij systeem uit *Escherichia coli* (Tsugita *et al.*, 1962; Aach *et al.*, 1964; Schwartz, 1967). De aanvankelijke bewering dat onder deze omstandigheden TMV-mantel-eiwit gesynthetiseerd wordt (Tsugita *et al.*, 1962) is later onjuist gebleken (Aach *et al.*, 1964). Schwartz (1967) beschreef de vorming van enkele produkten die werden gekarakteriseerd door „fingerprinting” en gelelektroforese, maar de aard hiervan is onduidelijk. Deze methode heeft bovendien vooralsnog het nadeel dat geen celvrij aminozuren incorporerend systeem uit de waardplant tabak beschikbaar is waarin TMV-RNA als boodschapper kan fungeren (vgl. Brouwer, 1970). Dit betekent dat men aangewezen is op een heteroloog systeem waarin initiatiemechanismen niet noodzakelijkerwijs vergelijkbaar zijn (Hoogendam *et al.*, 1968). Dit kan niet correcte translatie inhouden, terwijl het niet mogelijk is een biologische functie van eventueel gevormde produkten vast te stellen. Voor onderzoek naar eiwitten die een rol spelen bij de symptoomontwikkeling, lijkt deze methode daarom niet geschikt.

1.3. Genetische aspecten van tabak in verband met TMV-infectie

Alle variëteiten van tabak, *Nicotiana tabacum* L., zijn in meerdere of mindere mate vatbaar voor TMV (Holmes, 1960). De mate van vatbaarheid wordt bepaald door twee, onafhankelijk van elkaar overervende factoren die, in onvolledig recessieve vorm aanwezig, de plant verminderd vatbaar doen zijn voor infectie. Eenmaal geïnfecteerd, vertoont de plant echter dezelfde symptomen als planten waarin deze factoren ontbreken, terwijl aanzienlijke virusvermenigvuldiging kan plaatsvinden (Holmes, 1953, 1955, 1960). Dit kenmerk is aanwezig in de Franse lijn Java Isère x Cabot en in de Mexicaanse variëteit T.I. 245. De verminderde vatbaarheid is niet specifiek voor TMV, maar blijkt eveneens werkzaam ten opzichte van infectie met tal van andere virussen (Holmes, 1960).

Dit effect zou berusten op de eigenschap, dat de plant minder ectodesmata bezit in de epidermiscellen (Thomas en Fulton, 1968a). Behalve door deze factor wordt de mate van vatbaarheid mede beïnvloed door factoren die de aard van de gevoeligheid bepalen, en wel treedt een licht verminderde vatbaarheid op bij planten die tolerant zijn of hypersensitief reageren ten opzichte van TMV-infectie (zie onder).

De aard van de gevoeligheid wordt bepaald door twee groepen van erfelijke factoren (Valleau, 1952; Holmes, 1955, 1960). Gevoeligheid wordt bepaald door de A locus en berust op de aanwezigheid van het dominante allel A (Valleau, 1952). Het wordt gevonden in vele wilde soorten en in alle variëteiten van *N. tabacum*, met uitzondering van Ambalema, die nagenoeg tolerant is (Nolla, 1935). Deze tolerantie berust op de aanwezigheid van twee factoren in dubbel recessieve vorm, r_{m1} en r_{m2} (Nolla, 1938). Gezien het amfidiploïde karakter van *N. tabacum* worden deze factoren door Valleau (1952) als identiek beschouwd en aangeduid met het symbool a . Dit allel komt waarschijnlijk eveneens voor in *N. tomentosiformis* die hetzelfde type van resistentie vertoont als Ambalema, en misschien in andere soorten (Valleau, 1952).

Het optreden van overgevoelighedsreacties wordt bepaald door een groep factoren die aangeduid wordt met varianten van de letter N. Het ontstaan van lokale necrotische vlekjes op de geïnoculeerde bladeren na infectie met alle stammen van TMV bij temperaturen beneden 30° wordt toegeschreven aan de factor N. Deze factor is aanwezig in *N. glutinosa*, *N. rustica* en enkele andere soorten (Holmes, 1934). Het optreden van hetzelfde type reactie na infectie met tomateaucubamozaïekvirus (TAMV) of de Holmes' ribgrass stam van TMV (U8), doch het ontstaan van systemische mozaïeksymptomen op de jonge, zich ontwikkelende bladeren na infectie met de normale stam van TMV (U1, *vulgare*), berust op de aanwezigheid van de dominante factor N' (Valleau en Johnson, 1943). De eigenschap van *N. sylvestris* en de tabaksvariëteiten Clayton's TL 106 en Daruma lokale vlekken te vormen na infectie met de zwakke stam van TMV (U2), maar niet na inoculatie met de U1 stam, wordt toegeschreven aan een onvolledig dominante factor n^S (Weber, 1951). De overeenkomstige recessieve allelen n' en n bepalen, mits in homozygote vorm aanwezig, respectievelijk het ontstaan van semi-systemische kringvleksymptomen na inoculatie met de U8 stam, en de vorming van systemische mozaïeksymptomen na infectie met de U2 stam.

Waarschijnlijk zijn alle variëteiten van *N. tabacum* ($n=24$), mogelijk met uitzondering van Ambalema, ontstaan uit een amfidiploïd van voorouders van de huidige soorten *N. sylvestris* ($n=12$) en *N. tomentosiformis* ($n=12$) (Valleau, 1952; Holmes, 1955). *N. tabacum* bevat dus het allel A en is gevoelig voor TMV. *N. tomentosiformis* bevat de factor n (Holmes, 1938; Weber, 1951), welke evenals n' aanleiding geeft tot de vorming van systemische mozaïeksymptomen na infectie met nagenoeg alle stammen van TMV. Vele variëteiten van *N. tabacum* reageren met de vorming van lokale vlekken na inoculatie met de U2 stam en bezitten dus, evenals *N. sylvestris*, de factor n^S . In andere variëteiten is deze factor of verloren gegaan, of gemuteerd tot het recessieve allel n . Daarnaast is aangetoond dat vele, gedeeltelijk dezelfde, variëteiten de factor N'

bevatten.

Door terugkruising van *N. digluta* (*N. tabacum* x *N. glutinosa*, n=36) met *N. tabacum* cv. Connecticut Broadleaf en van de aldus verkregen F₁ met *N. tabacum* cv. Samsun, daarop volgende zelfvermeerdering en voortdurende selectie op de eigenschap lokale vlekken te vormen na infectie met TMV, verkreeg Holmes (1938) een Samsun variëteit met 24 paar chromosomen die bij verdere zelfvermeerdering op infectie met TMV uitsluitend reageerde met de vorming van lokale vlekken. Deze eigenschap scheen te berusten op de aanwezigheid van een enkel genenpaar, nl. de *NN* genen, afkomstig uit *N. glutinosa*. De verkregen Samsun variëteit was homozygoot voor dit genenpaar en werd Samsun NN genoemd.

Gerstel (1943, 1945) toonde aan, dat de variëteit Samsun NN in feite een substitutielij n van Samsun vertegenwoordigt, doordat in Samsun NN de beide H chromosomen vervangen zijn door twee Hg chromosomen uit *N. glutinosa*. Het Hg chromosoom uit *N. glutinosa* is functioneel homeoloog aan het H chromosoom van *N. tabacum*, maar is niet in staat hiermee te paren (Mallah, 1943). Hierdoor is een aparte koppelingsgroep ingevoerd, waardoor het niet mogelijk is te onderscheiden of de factor *N* één of meer genen omvat. Voorts waren noch Valteau (1942), noch Clayton (geciteerd door Gerstel, 1945) in staat een aantal minder gewenste eigenschappen van *N. glutinosa*, zoals langzame groei, lage opbrengst en kleiner bladoppervlak die moeten worden toegeschreven aan de aanwezigheid van het Hg chromosoom, uit de variëteit Samsun NN te doen verdwijnen.

Op grond van kruisingen tussen *N. tabacum* cv. Samsun NN en cv. Daruma (welke laatste het allel *n^S* bezit), meende Weber (1951) echter, dat paring van een H chromosoom met een Hg chromosoom regelmatig voorkomt. Zijn resultaten wijzen erop, dat de vorming van lokale vlekken op de variëteit Samsun NN na infectie met alle stammen van TMV bepaald wordt door hetzelfde genenpaar als de vorming van lokale vlekken met de U2, maar niet met de U1, stam op tabaksvariëteiten die de factor *n^S* bezitten, en dat de *NN* genen dominante allelen zijn van zowel de *n^Sn^S* als de *nn* genen. Volgens Valteau (1943) is de *N'* factor in *N. tabacum* waarschijnlijk allelomorf met de *N* factor in *N. glutinosa*. Hoewel de relatie tussen de *n^Sn^S* genen en de *N'N'* genen niet is onderzocht (Weber, 1951) en het allel *N'* volledig, maar het allel *n^S* onvolledig dominant is, schrijft Valteau (1952) het reactietype van *N. sylvestris* toe aan de factor *N'*, waaruit geconcludeerd kan worden dat hij de factoren *n^S* en *N'* als identiek beschouwt. Inderdaad werd in enkele gevallen door Weber (1951) volledige dominantie van het allel *n^S* en door Valteau (1943) onvolledige dominantie van het allel *N'* waargenomen, maar het feit, dat tenminste één tabaksvariëteit (*N. tabacum* cv. Judy's Pride) mozaïeksymptomen vertoonde na infectie met de U1 of de U2 stam, maar lokale vlekken na inoculatie met de U8 stam wijst wel degelijk op een verschil. Waar Weber (1951) een serie multiple allelen voorstelde, tenminste bestaande uit de genen *NN*, *n^Sn^S*, en *nn* en Valteau (1952) de allelen *N*, *N'* en *n'* onderscheidde, is het waarschijnlijk juist deze serie te schrijven als *NN*, *N'N'*, *n^Sn^S*, *n'n'* en *nn*. De aanwezigheid van het genenpaar *n'n'* is niet te onderscheiden van die van het paar *nn*.

Uit het bovenstaande volgt dat ook de mate van overgevoeligheid voor infectie met

TMV in de amfidiploïd *N. tabacum* bepaald wordt door de aanwezigheid van vier allelen. Twee hiervan zijn afkomstig van *N. sylvestris* ($n^S n^S$, of door mutatie hieruit ontstaan: nn) en twee uit *N. tomentosiformis* (eveneens nn). Indien men aanneemt dat de genen $N'N'$ en $n^S n^S$ niet identiek zijn, is de oorsprong van de genen $N'N'$ in vele variëteiten duister. Op grond van het feit dat de normale variëteit Samsun gevoelig is voor alle stammen van TMV, met uitzondering van enkele necrotiserende stammen die mogelijkwijs als defect moeten worden beschouwd (vgl. 3.12), kan de genetische constitutie hiervan worden weergegeven als $nnnn$ of $n'n'nn$. Daar de variëteit Samsun NN met lokale vlekken reageert na infectie met alle stammen van TMV als gevolg van de aanwezigheid van het genenpaar NN afkomstig uit *N. glutinosa*, is haar genetische constitutie $NNnn$ of $NNn'n'$.

Door Melchers *et al.* (1966) werd een Samsun variëteit beschreven die lokale vlekken vertoont na infectie met TMV BP 271 en TMV *dahlemense*. Deze variëteit gedroeg zich ten opzichte van 52 stammen van TMV als de tabaksvariëteit Java, die het allel N' bezit, en werd aangeduid als Samsun EN. Zij werd verkregen door zelfvermeerdering van een normale Samsun plant waarin blijkbaar een terugmutatie was opgetreden van een allel n' naar N' . Latere experimenten toonden aan dat de betrokken eigenschap inderdaad identiek is met die welke berust op de aanwezigheid van de factor N' (Melchers, persoonlijke mededeling), hetgeen impliceert dat de genetische constitutie van de normale Samsun variëteit $n'n'nn$ moet zijn. In tegenstelling tot de variëteit Samsun NN, die van Samsun verschilt in één paar chromosomen, verschilt de variëteit Samsun EN van Samsun slechts in een enkel genenpaar.

Door kruising, terugkruising en zelfvermeerdering werd in *N. tabacum* cv. Xanthi ($n^S n^S nn$, maar gewoonlijk weergegeven als $N'N'nn$) eveneens de factor N uit *N. glutinosa* ingevoerd (Takahashi, 1956). De verkregen variëteit ($NNN'N'$ of $NNnn$) werd Xanthi-nc genoemd.

De aard van de symptomen die ontstaan wanneer verschillende variëteiten van *N. tabacum* worden geïnfecteerd met verschillende stammen van TMV bij 20-25^o is weergegeven in tabel 1.1.

De symptoomexpressie in hypersensitief reagerende planten wordt beïnvloed door combinaties van de bovengenoemde factoren en door een tweetal factoren die aangeduid worden met de letter G. In recessieve vorm aanwezig bepalen de genen $g_1 g_1$ en $g_2 g_2$ het verbleken van oude stengels en onderste bladeren in lichte tabaksvariëteiten van het type White Burley (Henika, 1932). Hun aanwezigheid in variëteiten die lokale vlekken vormen blijkt uit de vorming van chlorotische ringen rondom de vlekken (Holmes, 1955). Eén of beide genen zijn in dominante vorm aanwezig in donkere tabaksvariëteiten zoals Samsun; chlorotische ringen treden hierin niet op.

Tabakspflanzen die gekenmerkt worden door de aanwezigheid van de factor N en het ontbreken van de factor A zijn in sterkere mate overgevoelig dan planten die zowel de factoren N als A bezitten: de als gevolg van infectie geïnduceerde lokale vlekken verschijnen later en blijven kleiner. Dergelijke planten zijn immuun voor sommige stammen van TMV (Holmes, 1960).

Tabel 1.1. Symptomen van verschillende variëteiten van *N. tabacum* na infectie met verschillende stammen en mutanten van TMV bij 20°

| Genetische constitutie ^a | <i>n'n'nn</i> | <i>N'N'nn</i> | <i>NN'n of NNnn</i> |
|--|--|--|--|
| <i>N. tabacum</i> cv. | Samsun | Samsun EN Xanthi Java | Samsun NN Xanthi-nc |
| TMV stam c.q. mutant | | | |
| „severe“, „common“, normaal (Johnson, 1926) = U1 (Siegel en Wildman, 1954) <i>vulgare</i> (Melchers, 1942) „Wageningen“ U1 (Van Loon en Van Kammen, 1970) | lichtgroen- donkergroen mozafek | lichtgroen- donkergroen mozafek | lokale vlekken |
| Ni 54 (Mundry en Gierer, 1958) | zeer zwak mozafek; vrijwel symptoomloos; semi-gemaskeerd | zeer zwak mozafek; vrijwel symptoomloos; semi-gemaskeerd | |
| „mild“, zwak (Singer <i>et al.</i> , 1951) = U2 (Siegel en Wildman, 1954) | zwak lichtgroen- donkergroen mozafek | lokale vlekken | lokale vlekken |
| <i>dahlemense</i> (Melchers <i>et al.</i> , 1940; Melchers, 1942) | zeer zwak lichtgroen mozafek | lokale vlekken | lokale vlekken |
| U5 (Siegel en Wildman, 1954) | zwak groen diepnervig mozafek | lokale vlekken | lokale vlekken |
| Ni 2519 (Jockusch, 1966a,b, 1968) | lichtgroen- donkergroen mozafek | | kleine lokale vlekken |
| Holmes' ribgrass (Holmes, 1941) = U8 (Siegel en Wildman, 1954) | gele necrotische ringetjes; semi-systemisch | lokale vlekken | zeer kleine lokale vlekken, uitsluitend op zeer jonge bladeren |
| „para“ (Köhler en Panjan, 1943) 1952 D (Holmes, 1952) Ni 2338 (Jockusch, 1966a) | lokale vlekken | | geen symptomen |

^a De van nature voorkomende stammen „mild“ (U2), *dahlemense* en Holmes' ribgrass (U8) vertonen een groot aantal aminozuursubstituties in het manteleiwit ten opzichte van dat van de normale stam (U1) en *vulgare*. Het manteleiwit van Holmes' ribgrass bevat bovendien twee aminozuren minder; dat van de van nature voorkomende stam U5 en Holmes' necrotiserende stam 1952 D zijn niet onderzocht. Het manteleiwit van de mutanten Ni 54 en Ni 2519 vertoont geen enkele aminozuursubstitutie (Wittmann, 1959; Jockusch, 1968). Eventuele veranderingen in het manteleiwit van de mutant Ni 2338 zijn niet onderzocht.

Bezitten zulke planten tevens de onvolledig recessieve genen voor verminderde vatbaarheid, dan worden minder vlekken gevormd en deze verschijnen nog later en zijn nog kleiner. Systemische uitbreiding van het virus bij verhoging van de temperatuur treedt bij een dergelijke constitutie niet op (Holmes, 1960). Verminderde vatbaarheid en verminderde uitbreiding van het virus lijken echter te berusten op twee verschillende mechanismen (Thomas en Fulton, 1968b), zodat nog een factor aanwezig moet zijn die de uitbreiding van het virus belemmert. Dit verschijnsel vertoont sterke overeenkomst met dat van verworven systemische resistentie (vgl. 1.4) (Thomas en Fulton 1966, 1968b). In hoeverre de hiervoor verantwoordelijke factor gekoppeld is met die voor verminderde vatbaarheid of dat deze factor eigen is aan T.I. 245 tabak, is niet onderzocht.

1.4. Veranderingen in eiwitconstitutie en enzymactiviteiten van tabak na infectie met TMV in verband met het symptoomtype

In vrijwel alle fysiologische processen treden veranderingen op na infectie van tabak met TMV (Goodman *et al.*, 1967). Deze veranderingen zijn voornamelijk bestudeerd bij vergelijking van het effect van verschillende, in de meeste gevallen niet verwante virussen op dezelfde waardplant. De met het verschil in symptoomtype samenhangende verschillen in de door de desbetreffende virussen veroorzaakte veranderingen in het metabolisme van de waardplant worden gewoonlijk als karakteristiek beschouwd voor de symptoomtypen zelf, waarbij de eventuele eigen bijdrage van de virussen verwaarloosd wordt. Meestal blijken virussen die op eenzelfde waardplant hetzelfde type symptomen verwekken echter inderdaad vergelijkbare metabolische veranderingen te bewerkstelligen.

Onderzoekingen die uitgevoerd zijn met één virus en twee verschillende waardplantsoorten of -variëteiten die een verschillend reactietype vertonen, lijden in principe nagenoeg alle aan de keuze van niet vergelijkbare soorten c.q. variëteiten. In zulke gevallen is de eventuele eigen bijdrage van de plant niet in de beschouwingen betrokken. In het geval van de slechts in één, goed gedefinieerd, chromosomenpaar verschillende variëteiten Samsun en Samsun NN van tabak en de verschillende typen van symptomen op beide variëteiten inducerende stammen van TMV kunnen de metabolische veranderingen in de diverse combinaties echter uitsluitel geven omtrent de eigen bijdrage van virus en plant bij het tot stand komen van een bepaald symptoomtype, en daarmee duidelijker inzicht verschaffen in de processen van pathogenese en symptoomexpressie. Onderzoek naar symptoomgebonden fysiologische en metabolische veranderingen bij vergelijking van beide bovengenoemde variëteiten is nog niet eerder beschreven, evenmin als dit het geval is voor de variëteiten Xanthi en Xanthi-nc. Individueel zijn deze variëteiten, naast andere, echter veelvuldig gebruikt voor onderzoek naar metabolische veranderingen als gevolg van virusinfecties, terwijl vooral *N. glutinosa* gebruikt is om het mechanisme van de hypersensitieve reactie te ontraadselen. Aannemende dat het symptoomtype een indicatie vormt voor de aard van de metabolische veranderingen, kan men de aldus verkregen resultaten als uitgangspunten nemen.

Een volledig overzicht van de fysiologische veranderingen die optreden na virusinfectie van tabak zou hier te veelomvattend zijn. Hiervoor zij verwezen naar overzichten van Farkas en Kiraly (1962), Diener (1963), Farkas en Solymosy (1965), Farkas *et al.* (1965), Goodman *et al.* (1967), Kosuge (1969) en Merrett en Bayley (1969).

De biochemische basis van de metabolische veranderingen in geïnfecteerde planten is vooral gezocht in veranderingen in enzymatische activiteit (vgl. Uritani, 1967), zonder dat aandacht is besteed aan het optreden van andere eiwitten die betrokken zouden kunnen zijn bij de pathogenese en symptoomexpressie. Een overzicht van de veranderingen die zich voordoen in combinaties die tot systemische mozaïeksymptomen leiden is weergegeven in tabel 1.2; veranderingen in variëteiten van *N. tabacum* waarin lokale vlekken geïnduceerd worden, hetzij als gevolg van de aanwezigheid van de factor *N*, hetzij door infectie met een necrotiserende stam, in tabel 1.3, en veranderingen in *N. glutinosa* na infectie met TMV in tabel 1.4.

In enkele gevallen zijn de namen van door de auteurs in de oorspronkelijke publicaties onderzochte enzymen gewijzigd, waar duidelijk was dat de gebruikte methode niet adequaat is voor het meten van de activiteit van het betrokken enzym (bijv. Wynd, 1942). Bij onderzoek naar veranderingen in de activiteiten van oxidatieve enzymen zijn zoveel mogelijk de gebruikte substraten c.q. waterstofdonoren opgenomen om verschillen duidelijk te maken.

In een aantal gevallen blijken door verschillende auteurs beschreven veranderingen in vergelijkbare virus - waardplant combinaties van tegengestelde aard te zijn (vgl. tabel 1.2: katalase, cytochroomoxidase, polyfenoloxidase. Dit kan het gevolg zijn van het gebruik van verschillende variëteiten van tabak en stammen van TMV, verschillen in temperatuur, belichting en monsternamen, en verschillen in de wijze van uitdrukken van de activiteit (vgl. Owen, 1955).

De overeenkomst tussen de veranderingen in enzymactiviteiten in hypersensitief reagerende variëteiten van *N. tabacum* en in *N. glutinosa* is opvallend. Deze veranderingen hangen klaarblijkelijk ten nauwste samen met het symptoomtype, ook indien de factor *N* niet aanwezig is (PTMV - *N. tabacum* cv. White Burley; Farkas *et al.*, 1960). Dit geeft aan dat deze veranderingen niet het directe gevolg zijn van de genetische activiteit van de *NV* genen, maar samenhangen met het optreden van necrose als zodanig. Het is daarom niet verwonderlijk dat vergelijkbare veranderingen ook optreden na infectie met schimmels en bacteriën, en in sommige gevallen na verwonding, wanneer vergelijkbare symptomen ontstaan (vgl. Farkas *et al.*, 1960, 1964).

In systemisch geïnfecteerde tabak kan TMV een aanzienlijk deel uitmaken van de totale hoeveelheid eiwit in het blad. Volgens Wildman *et al.* (1949) gaat deze overvloedige virussynthese ten koste van de voornaamste eiwitcomponent in de oplosbare fractie, het zgn. „fraction I protein“. Daar „fraction I protein“ ribulosedifosfaatcarboxylase-activiteit bezit (Trown, 1965), zou de afname hiervan een directe verklaring vormen voor de verminderde fotosynthetische activiteit in mozaïekzieke tabak, welke werd waargenomen door Owen (1957) en Zaitlin en Jagendorf (1960), maar niet door Duke

Tabel 1.2. Veranderingen in enzymactiviteiten in *N. tabacum* variëteiten die op

| Enzym | Substraat | Virusstam ^a | Waardplant- variëteit ^b | Aard ^c |
|-------------------------|-------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| chlorofyllase | | normaal | Wisconsin-Havana | 0 |
| chlorofyllase | | geel | Wisconsin-Havana | ++ |
| chlorofyllase | | zwak don- kergroen | Wisconsin-Havana | + |
| chlorofyllase | | zwak | Wisconsin-Havana | + |
| amylase | | normaal | Wisconsin-Havana | V |
| amylase | | geel | Wisconsin-Havana | V |
| amylase | | normaal | Bright Yellow | 0/+ |
| oxidasen | p-fenyleen- diamine/ α-naftol | - | - | V |
| oxidasen | | normaal | Bright Yellow ^d | - |
| katalase | | - | - | + |
| katalase | | - | - | - |
| katalase | | W U1 | Samsun | V |
| invertase | | - | - | - |
| protease | | - | White Burley | 0 |
| pectinase | | - | White Burley | 0 |
| dehydrogenasen | | - | - | + |
| dehydrogenasen | | normaal | Bright Yellow ^d | - |
| dehydrogenasen | | - | Trapesond | ++ |
| peroxidase ^e | | - | - | + |
| peroxidase | pyrogallol | - | Samsun | + |
| peroxidase | benzidine | normaal | Bright Yellow ^d | - |
| peroxidase | pyrogallol | - | Samsun | + |
| peroxidase | pyrogallol | aucuba | Ky Iso 1 Ky 16 | ++ |
| peroxidase | pyrogallol | geel | Ky Iso 1 Ky 16 | + |

infectie met TMV reageren met systemische mozaïeksymptomen

| Opmerkingen | Literatuur |
|--|------------------------------|
| 5 weken na inoculatie | Peterson en McKinney, 1938 |
| 5 weken na inoculatie | Peterson en McKinney, 1938 |
| 5 weken na inoculatie | Peterson en McKinney, 1938 |
| 5 weken na inoculatie | Peterson en McKinney, 1938 |
| 3-78 dagen na inoculatie; neemt aanvankelijk toe na inoculatie tot een maximum op dag 13 en vervolgens af tot een lager niveau dan in de controle | Balls en Martin, 1938 |
| afname 3 dagen, toename 78 dagen na inoculatie | Balls en Martin, 1938 |
| 0-5 dagen na inoculatie; toename alleen in het donker | Doke en Hirai, 1969 |
| afname voor het verschijnen van symptomen; minimum op dag 6 in de geïnoculeerde bladeren; toename na het verschijnen van symptomen; maximum op dag 14-18 in de geïnoculeerde bladeren | Wynd, 1942 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 0-21 dagen na inoculatie; neemt toe na inoculatie tot een maximum op dag 8, vervolgens af tot het niveau van de controle en daarna toe tot een maximum op dag 16-18 in de geïnoculeerde bladeren | Wynd, 1942 |
| na verschijnen van symptomen | Vager, 1955 |
| 0-28 dagen na inoculatie; neemt toe na inoculatie tot een maximum op dag 1, vervolgens af tot een zeer laag niveau en vanaf dag 14 geleidelijk weer toe tot op dag 28 het niveau van de controle weer bereikt is | Van Loon, niet gepubliceerd |
| 0-21 dagen na inoculatie; neemt af na inoculatie tot een minimum op dag 8, vervolgens toe tot het niveau van de controle en daarna af tot een minimum op dag 16-18 in de geïnoculeerde bladeren | Wynd, 1942 |
| 10-35 dagen na inoculatie | Holden en Tracey, 1948 |
| 10-35 dagen na inoculatie | Holden en Tracey, 1948 |
| na verschijnen van symptomen | Vager, 1955 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 24 en 48 uur na inoculatie | Rubin en Arcichovskaja, 1967 |
| na verschijnen van symptomen | Vager, 1955 |
| 0-13 dagen na inoculatie; neemt toe na inoculatie tot een maximum op dag 2, vervolgens af tot het niveau van de controle en bij het verschijnen der symptomen opnieuw toe tot een maximum op dag 8 | Martin, 1958b |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 5 weken na inoculatie | Loebenstein en Linsey, 1966 |
| toename na het verschijnen van symptomen tot een maximum 14 dagen na inoculatie | Suseno en Hampton, 1966 |
| idem | Suseno en Hampton, 1966 |

Tabel 1.2. (vervolg I)

| Enzym | Substraat | Virusstam ^a | Waardplant- variëteit ^b | Aard ^c |
|--|--------------------------|------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| peroxidase | pyrogallol | groen | Ky Iso 1 Ky 16 | 0 |
| peroxidase | | - | Trapesond | + |
| peroxidase | guaiacol | W U1 | Samsun | ++ |
| zure fosfatase | | geel | Samsun | + |
| zure fosfatase | | normaal | Bright Yellow ^d | - |
| zure fosfatase | | - | Ghimpati | V |
| cytochromoxydase | | - | Samsun | ++ |
| cytochromoxydase | | aucuba | White Burley | + |
| cytochromoxydase | | - | Bright Yellow | + |
| cytochromoxydase | | - | Trapesond | - |
| polyfenoloxidase ^f | catechol | - | Samsun | + |
| polyfenoloxidase | catechol/ hydrochinon | - | Samsun | 0 |
| polyfenoloxidase | DOPA | normaal | Bright Yellow ^d | - |
| polyfenoloxidase | catechol | vulgare | Xanthi-nc 32 ^o | + |
| polyfenoloxidase | chlorogeenzuur | aucuba | Ky Iso 1 Ky 16 | ++ |
| polyfenoloxidase | chlorogeenzuur | geel | Ky Iso 1 Ky 16 | ++ |
| polyfenoloxidase | chlorogeenzuur | groen | Ky Iso 1 Ky 16 | + |
| polyfenoloxidase | chlorogeenzuur | - | Trapesond | - |
| polyfenoloxidase | chlorogeenzuur | W U1 | Samsun | ++ |
| RNase | | - | Turkish | + |
| RNase | | normaal | Bright Yellow ^d | - |
| glutaminezuurdecarboxylase | | - | White Burley | + |
| glutaminezuur- alanine-transaminase | | - | White Burley | V |
| alkalische fosfatase | | normaal | Bright Yellow ^d | 0 |
| glucose-6-fosfatase | | normaal | Bright Yellow ^d | 0 |
| 5-nucleotidase | | normaal | Bright Yellow ^d | 0 |

Opmerkingen

Literatuur

| | |
|---|---|
| 0-20 dagen na inoculatie | Suseno en Hampton, 1966 |
| 24 en 48 uur na inoculatie | Rubin en Arcichovskaja, 1967 |
| 0-28 dagen na inoculatie; neemt toe na inoculatie tot een maximum op dag 2, vervolgens af tot het niveau van de controle op dag 7 en vanaf het verschijnen van symptomen op dag 8 geleidelijk toe tot zeer hoge waarden | Van Loon, niet gepubliceerd |
| vanaf 1-3 dagen na inoculatie | Wolffgang en Keck, 1958 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| afname tot 3 dagen na inoculatie, neemt vervolgens toe tot een hoger niveau dan in de controle met een maximum op dag 5-8, daarna af tot het niveau van de controle op dag 12 en tenslotte weer toe | Esanu, 1969 |
| na verschijnen van symptomen | Martin, 1958b |
| 4-12 dagen na inoculatie | Merrett, 1962 |
| 2-20 uur na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1965 |
| 24 uur na inoculatie | Rubin en Arcichovskaja, 1967 |
| 0-12 dagen na inoculatie; neemt toe na inoculatie tot een maximum op dag 2, vervolgens af tot het niveau van de controle en bij het verschijnen der symptomen opnieuw toe tot een blijvend hoog niveau vanaf dag 9 | Martin, 1958a,b |
| 2-3 dagen na inoculatie | Solymosy <i>et al.</i> , 1959; Farkas <i>et al.</i> , 1960 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 5 dagen na inoculatie | Jockusch, 1966c |
| toename na het verschijnen van symptomen tot een maximum 10 dagen na inoculatie | Suseno en Hampton, 1966 |
| idem | Suseno en Hampton, 1966 |
| lichte toename 8-12 dagen na inoculatie | Suseno en Hampton, 1966 |
| 24 en 48 uur na inoculatie | Rubin en Arcichovskaja, 1967 |
| 0-28 dagen na inoculatie; neemt toe na inoculatie tot een maximum op dag 4, vervolgens af tot het niveau van de controle op dag 7 en vanaf het verschijnen van symptomen op dag 8 geleidelijk toe tot hoge waarden | Van Loon, niet gepubliceerd |
| 5 dagen na inoculatie | Reddi, 1959 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 2-16 dagen na inoculatie; neemt toe vanaf dag 6 tot een maximum op dag 8-9, vervolgens af tot het niveau van de controle en vanaf dag 12 opnieuw toe | Gubanski, 1960, 1962 |
| neemt aanvankelijk toe na inoculatie tot een maximum op dag 2 en vervolgens af tot een zeer laag niveau | Gubanski en Kurstak, 1960 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |

Tabel 1.2. (vervolg II)

| Enzym | Substraat | Virusstam ^a | Waardplant- variëteit ^b | Aard ^c |
|----------------------------------|-----------|------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| lipase | | normaal | Bright Yellow ^d | 0 |
| fosfolipase | | normaal | Bright Yellow ^d | + |
| ATPase | | normaal | Bright Yellow ^d | - |
| ATPase | | - | Ghimpati | V |
| barnsteenzuurdehydrogenase | | normaal | Bright Yellow ^d | - |
| barnsteenzuurdehydrogenase | | - | Bright Yellow | + |
| appelzuurdehydrogenase | | normaal | Bright Yellow ^d | - |
| isocitroenzuurdehydrogenase | | normaal | Bright Yellow ^d | - |
| glutaminezuurdehydrogenase | | normaal | Bright Yellow ^d | - |
| glucose-1-fosfaatdehydrogenase | | normaal | Bright Yellow ^d | - |
| glucose-6-fosfaatdehydrogenase | | normaal | Bright Yellow ^d | - |
| glucose-6-fosfaatdehydrogenase | | - | Samsun ^g | 0 |
| glucose-6-fosfaatdehydrogenase | | OM | Bright Yellow ^h | 0 |
| fosforylase | | normaal | Bright Yellow ^d | - |
| fosforylase | | normaal | Bright Yellow | 0 |
| aldolase | | normaal | Bright Yellow ^d | 0 |
| glycolzuuroxidase | | - | - | - |
| NADH-cytochroom c reductase | | - | Bright Yellow | + |
| succinaat-cytochroom c reductase | | - | Bright Yellow | + |
| NADH-diaforase | | - | Bright Yellow | + |
| 6-fosfogluconaatdehydrogenase | | - | Samsun ^g | 0 |
| 6-fosfogluconaatdehydrogenase | | OM | Bright Yellow ^h | 0 |
| fosforiboisomerase | | - | Samsun ^g | 0 |
| shikimi zuurdehydrogenase | | - | Samsun | V |
| peptidase | | - | - | 0 |
| ascorbinezuofoxidase | | W U1 | Samsun | 0 |

^a - : niet aangegeven.

^b - : niet aangegeven.

^c ++ : toename groter dan 100%; + : toename kleiner dan 100%; 0 : geen verschil

^d cytochemisch onderzoek in geïsoleerde epidermisstrips.

^e peroxidase pyrogallol geel/groen N. glutinosa 30⁰/36⁰ -

^f polyfenoloxidase catechol/
hydrochinon - N. glutinosa 36⁰ +

^g in extracten van wortelweefsel.

^h in extracten van geïsoleerde epidermisstrips.

| Opmerkingen | Literatuur |
|---|-----------------------------|
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| neemt aanvankelijk af na inoculatie, bereikt het niveau van de controle op dag 4 en is hoger dan deze vanaf dag 5 | Esanu, 1969 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 0-20 uur na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1965 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 5 dagen na inoculatie | Baur <i>et al.</i> , 1967 |
| 0-95 uur na inoculatie | Takahashi, 1971 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| 3 dagen na inoculatie | Doke en Hirai, 1969 |
| 4 dagen na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1963 |
| na verschijnen van symptomen | Farkas en Solymosy, 1965 |
| 20 uur na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1965 |
| 20 uur na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1965 |
| 20 uur na inoculatie | Takahashi en Hirai, 1965 |
| 5 dagen na inoculatie | Baur <i>et al.</i> , 1967 |
| 0-95 uur na inoculatie | Takahashi, 1971 |
| 5 dagen na inoculatie | Baur <i>et al.</i> , 1967 |
| toename 1-3 weken na inoculatie; neemt af vanaf dag 21 en bereikt een niveau lager dan de controle na 45 dagen | Farkas, 1968 |
| na verschijnen van symptomen | Nemeth <i>et al.</i> , 1969 |
| 28 dagen na inoculatie | Van Loon, niet gepubliceerd |

met controle; - : afname; V : variabel.

5 dagen na inoculatie
3 dagen na inoculatie

Li en Schmelzer, 1964
Farkas *et al.*, 1960

Tabel 1.3. Veranderingen in enzymactiviteiten in *N. tabacum* variëteiten die hyper-

| Enzym | Substraat | Virusstam ^a | Waardplant- variëteit | Aard ^b |
|--------------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------|
| polyfenoloxidase | catechol/ hydrochinon | para | White Burley | ++ |
| polyfenoloxidase | chlorogeenzuur | - | Samsun NN | + |
| polyfenoloxidase | chlorogeenzuur | - | Xanthi-nc | + |
| polyfenoloxidase | chlorogeenzuur | W U1 | Samsun NN | ++ |
| glucose-6-fosfaatdehydrogenase | | para | White Burley | ++ |
| 6-fosfogluconaatdehydrogenase | | para | White Burley | ++ |
| cytochromoxydase | | para | White Burley | + |
| NADPH afh. chinonreductase | p-benzochinon | para | White Burley | + |
| NADH afh. chinonreductase | p-benzochinon | para | White Burley | + |
| NADPH-diaforase | | para | White Burley | + |
| fosfohexoisomerase | | para | White Burley | 0 |
| fosforiboisomerase | | para | White Burley | 0 |
| fosforiboisomerase | | para | White Burley | - |
| appelzuurdehydrogenase | | para | White Burley | 0 |
| appelzuurdehydrogenase | | para | White Burley | + |
| hexokinase | | para | White Burley | 0 |
| NADH-diaforase | | para | White Burley | + |
| aconitase | | para | White Burley | ++ |
| isocitroenzuurdehydrogenase | | para | White Burley | + |
| glycolzuuroxidase | | para | White Burley | - |
| RNase | | para | White Burley | + |
| RNase | | - | Xanthi-nc | + |
| shikimi zuurdehydrogenase | | - | Xanthi-nc | + |
| peptidase | | para | White Burley | + |
| peroxidase | pyrogallol | - | Samsun NN | + |
| peroxidase | pyrogallol | - | Xanthi-nc | + |

sensitief reageren op infectie met TMV

| Opmerkingen | Literatuur |
|--|---|
| 2-3 dagen na inoculatie | Farkas <i>et al.</i> , 1960; Farkas en Solymosy, 1962; Solymosy en Farkas, 1963 |
| toename bij het verschijnen van symptomen tot een maximum 4 dagen na inoculatie; toename 7 uur na inoculatie in de niet-geïnoculeerde bladgedeelten | Van Kammen en Brouwer, 1964 |
| toename bij het verschijnen van symptomen tot een maximum 4 dagen na inoculatie | Cabanne <i>et al.</i> , 1968, 1971 |
| 0-14 dagen na inoculatie; neemt toe na inoculatie tot een maximum op dag 2, vervolgens af tot het niveau van de con- trole op dag 3, daarna sterk toe tot een maximum op dag 5 en tenslotte af tot op dag 7 het niveau van de controle weer bereikt is | Van Loon en Geelen, 1972 |
| 4-6 dagen na inoculatie | Farkas en Solymosy, 1962; Solymosy en Farkas, 1962, 1963 |
| 4-6 dagen na inoculatie | Solymosy en Farkas, 1963 |
| 4-6 dagen na inoculatie | Farkas en Solymosy, 1962; Solymosy en Farkas, 1963 |
| 4-6 dagen na inoculatie | idem |
| 4-6 dagen na inoculatie | idem |
| 4-6 dagen na inoculatie | idem |
| 4-6 dagen na inoculatie | idem |
| na verschijnen van symptomen | Farkas en Solymosy, 1962 |
| 4-6 dagen na inoculatie | Solymosy en Farkas, 1963 |
| na verschijnen van symptomen | Farkas en Solymosy, 1962 |
| 8-10 dagen na inoculatie | Solymosy en Farkas, 1963 |
| 4-6 dagen na inoculatie | Solymosy en Farkas, 1963 |
| 4-6 dagen na inoculatie | Solymosy en Farkas, 1963 |
| 4-6 dagen na inoculatie | Solymosy en Farkas, 1963 |
| 8-10 dagen na inoculatie | Solymosy en Farkas, 1963 |
| na verschijnen van symptomen | Solymosy en Farkas, 1964 |
| 3 dagen na inoculatie | Farkas, 1968 |
| 3 dagen na inoculatie | Farkas, 1968 |
| 3 dagen na inoculatie | Farkas, 1968 |
| na verschijnen van symptomen | Nemeth <i>et al.</i> , 1969 |
| toename bij het verschijnen van symptomen | Simons en Ross, 1970 |
| toename bij het verschijnen van symptomen | Cabanne <i>et al.</i> , 1971 |

Tabel 1.3. (vervolg)

| Enzym | Substraat | Virusstam ^a | Waardplant- variëteit | Aard ^b |
|----------------------|-----------|------------------------|--------------------------|-------------------|
| peroxidase | guaiacol | - | Xanthi-nc | ++ |
| peroxidase | guaiacol | W U1 | Samsun NN | V |
| katalase | | W U1 | Samsun NN | V |
| ascorbinezuuroxidase | | W U1 | Samsun NN | 0 |

^a - : niet aangegeven.

^b ++ : toename groter dan 100%; + : toename kleiner dan 100%; 0 : geen verschil

en Hirai (1969, 1970a), en het optreden van chlorose. Op dit laatste wijst het feit dat ook stikstofgebrek chlorose teweegbrengt en de door TMV teweeggebrachte mozaïek-symptomen gemaskeerd kunnen worden door hoge stikstofgiften.

In systemisch geïnfecteerde planten treden tevens grote hoeveelheden „X-protein“ (Takahashi en Ishii, 1953) op, welke een overmaat van vrij manteleiwit van het virus vertegenwoordigen (Newmark en Fraser, 1956). Het is niet onmogelijk dat dit vrije manteleiwit een rol speelt bij het ontstaan van mozaïeksymptomen.

In hypersensitief reagerende tabak wordt zgn. lokale en systemische resistentie geïnduceerd, welke zich uitent in de vorming van kleinere en eventueel minder lokale vlekken bij een volgende infectie met hetzelfde virus of een virus dat dezelfde symptomen teweegbrengt (Ross, 1961a,b). Een vermindering van het aantal vlekken bij inoculatie met TMV 4 dagen na behandeling van *N. glutinosa* met TMV-eiwit werd beschreven door Loebenstein (1960). Dit effect was eveneens zowel lokaal als systemisch werkzaam (Loebenstein, 1962) en werd door hem toegeschreven aan de vorming van „beschermende stoffen“ in de plant, analoog aan het interferon in dierlijke cellen.

Ross (1961b, 1966) en Bozarth en Ross (1964) hebben aangetoond dat de ontwikkeling van systemische resistentie afhankelijk is van het transport van een of meer stoffen uit de geïnfecteerde naar de niet-geïnfecteerde delen van de plant. Loebenstein en Ross (1963) waren in staat, na inoculatie van de onderste helften van bladeren van *Datura stramonium* met TMV of TNV, uit de bovenste helften een extract te bereiden dat, bij menging met het inoculum, het aantal door TMV geïnduceerde vlekken op *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Samsun NN of *D. stramonium* met max. 92% verminderde. Extracten uit re-

Opmerkingen

Literatuur

| | |
|--|------------------------------|
| toename bij het verschijnen van symptomen | Cabanne <i>et al.</i> , 1971 |
| 0-14 dagen na inoculatie; neemt af tot een minimum op dag 2 en vervolgens bij het verschijnen van symptomen toe tot een maximum op dag 4-6, daarna geleidelijk iets af, maar het niveau blijft veel hoger dan in de controle | Van Loon en Geelen, 1972 |
| 0-14 dagen na inoculatie; neemt sterk toe tot een maximum op dag 1, vervolgens af tot een zeer laag niveau op dag 3 en vanaf dag 7 geleidelijk weer toe tot veel hogere waarden dan in de controle op dag 14 | Van Loon en Geelen, 1972 |
| 7 dagen na inoculatie | Van Loon, niet gepubliceerd |

met controle; - : afname.

sistente bladhelften van Samsun NN planten hadden soms wel, soms geen effect. Loebenstein en Ross (1963) en Loebenstein *et al.* (1966) voerden een aantal zuiveringsstappen uit met het doel een resistentie-inducerende factor te isoleren. De remmende activiteit was aanwezig in een fractie die precipiteerde tussen 75 en 90% verzadiging met ammoniumsulfaat. Deze vertoonde een aantal eigenschappen welke overeenkwamen met die van interferon (Loebenstein *et al.*, 1966). Laatstgenoemde auteurs suggereren dat het hier een eiwit betreft met een molecuulgewicht van 20.000-30.000. Daar verworven lokale en systemische resistentie beschouwd worden als varianten van eenzelfde mechanisme (Ross, 1966) zou een dergelijk eiwit ook verantwoordelijk kunnen zijn voor deze effecten in hypersensitief reagerende tabak.

Door Maia en Morel (1967) werd zowel uit doornappel als uit tabak, na behandeling met fytolzuur, een factor geïsoleerd die de gevoeligheid voor virusinfectie vermindert. Ook in dit geval lijkt het een eiwit te betreffen met een molecuulgewicht kleiner dan 30.000. Deze factor verschijnt 72-96 uur na behandeling. Het is interessant te speculeren op een mogelijke overeenkomst tussen deze factor en die welke verkregen werd door Loebenstein *et al.* (1966).

Sela en Applebaum (1962) toonden aan dat ruwe extracten uit bladgedeelten van *N. glutinosa* die lokale of systemische resistentie vertoonden, de lokale vlekvorming door TMV remden. Sela *et al.* (1964, 1966), zuiverden hieruit een anti-virus factor (AVF) waarvan de activiteit zou berusten op de aanwezigheid van RNA (vgl. Kimmins, 1969). Deze auteurs toetsten de werking van de AVF echter steeds op doornappel. Hoewel zij verklaren dat noch RNA-fracties uit niet-geïnfecteerde *N. glutinosa* planten, noch

Tabel 1.4. Veranderingen in enzymactiviteiten in *N. glutinosa* na infectie met TMV

| Enzym | Substraat | Virusstam ^a | Aard ^b |
|----------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------------|
| peroxidase | pyrogallol | - | + |
| peroxidase | pyrogallol | - | + |
| peroxidase | pyrogallol | groen/geel | + |
| peroxidase | pyrogallol | - | ++ |
| peroxidase | | - | + |
| peroxidase | pyrogallol | „legume” | ++ |
| peroxidase | <i>o</i> -dianisidine | - | V |
| polyfenoloxidase | catechol/hydrochinon | - | ++ |
| polyfenoloxidase | catechol/hydrochinon | - | ++ |
| polyfenoloxidase | catechol | - | + |
| polyfenoloxidase | galluszuur | - | ++ |
| polyfenoloxidase | | - | + |
| polyfenoloxidase | chlorogeenzuur | - | + |
| polyfenoloxidase | chlorogeenzuur | - | V |
| dehydrogenasen | trifenylnitroloziumchloride | - | + |
| dehydrogenasen | | - | - |
| glycolzuuroxidase | | - | 0 |
| glycolzuuroxidase | | - | 0 |
| barnsteenzuurdehydrogenase | | - | V |
| monofenoloxidase | tyrosine | - | N |
| cytochromoxidase | | - | + |
| cytochromoxidase | | - | - |
| RNase | | - | + |
| peptidase | | - | 0 |

^a - : niet aangegeven.

^b ++ : toename groter dan 100%; + : toename kleiner dan 100%; 0 : geen verschil

| Opmerkingen | Literatuur |
|--|--------------------------------|
| vanaf 36 uur na inoculatie; symptomen 80 uur na inoculatie | Martin, 1958b |
| 3 dagen na inoculatie | Farkas <i>et al.</i> , 1960 |
| toename vanaf 3 dagen na inoculatie tot een maximum op dag 5 | Li en Schmelzer, 1964 |
| 5 weken na inoculatie | Loebenstein en Linsey, 1966 |
| 24 en 48 uur na inoculatie | Rubin en Arcichovskaja, 1967 |
| toename na het verschijnen van symptomen tot een maximum 7-11 dagen na inoculatie | Chant en Bates, 1970 |
| afname 24 uur na inoculatie, neemt vervolgens toe tot een maximum na 48 uur en daarna af | Yasuda <i>et al.</i> , 1970 |
| 2-3 dagen na inoculatie | Solymosy <i>et al.</i> , 1959 |
| toename na het verschijnen van symptomen | Farkas <i>et al.</i> , 1960 |
| toename bij het verschijnen van symptomen | Kikuchi en Yamaguchi, 1960 |
| toename na het verschijnen van symptomen | Kikuchi en Yamaguchi, 1960 |
| 24 en 48 uur na inoculatie | Rubin en Arcichovskaja, 1967 |
| 48 uur na inoculatie | Pierpoint, 1968 |
| afname 24 uur na inoculatie, neemt vervolgens toe tot een maximum na 48 uur, daarna af tot het niveau van de controle op dag 5 | Yasuda <i>et al.</i> , 1970 |
| 3 dagen na inoculatie | Farkas <i>et al.</i> , 1960 |
| 24 en 48 uur na inoculatie | Rubin en Arcichovskaja, 1967 |
| 3 dagen na inoculatie | Farkas <i>et al.</i> , 1960 |
| 48 uur na inoculatie | Pierpoint, 1968 |
| toename 36 uur na inoculatie, afname ten opzichte van het controleniveau 50 uur na inoculatie | Weintraub <i>et al.</i> , 1964 |
| na het verschijnen van symptomen | John en Weintraub, 1967 |
| 24 uur na inoculatie | Rubin en Arcichovskaja, 1967 |
| 48 uur na inoculatie | Pierpoint, 1968 |
| 3 dagen na inoculatie | Farkas, 1968 |
| na verschijnen van symptomen | Nemeth <i>et al.</i> , 1969 |

met controle; - : afname; V : variabel; N : nieuwe enzymactiviteit.

gist-RNA werkzaam waren, is bekend dat heteroloog RNA en ook gist-RNA een met systemische resistentie vergelijkbaar verschijnsel oproepen in *N. glutinosa* en *N. tabacum* cv. Samsun NN (Cheo *et al.*, 1968; Gicherman en Loebenstein, 1968; Meneghini *et al.*, 1969). Daarenboven kan, noch wat de eiwitfactor van Loebenstein *et al.* (1966), noch wat de AVF van Sela *et al.* (1966) betreft, gesteld worden dat remming van het aantal vlekken een criterium kan zijn voor werkzaamheid in een mechanisme dat primair gekenmerkt wordt door een reductie van de vlek diameter, temeer daar remmers van infectie ook aanwezig zijn in niet-geïnfecteerde tabak (vgl. Palm, 1967).

Verder onderzoek van de groep van Loebenstein is er op gericht geweest indirecte aanwijzingen te verkrijgen omtrent het eiwitkarakter van de factor die verantwoordelijk is voor verworven resistentie. Zo beschreven Loebenstein *et al.* (1968) dat de ontwikkeling van verworven lokale resistentie in *N. tabacum* cv. Samsun NN geheel of gedeeltelijk geremd wordt door actinomycine D (AMD). Naar analogie met het mechanisme van de vlek vorming na een eerste inoculatie (Ross, 1966) mag worden aangenomen dat de ontwikkeling eveneens geremd wordt door chlooramfenicol (Sela *et al.*, 1969) en bestraling met U.V. licht (Loebenstein *et al.*, 1970), terwijl resistentie, evenals interferon, geïnduceerd kan worden door poly I-poly C (Stein en Loebenstein, 1970).

Zoals gezegd, is verworven resistentie niet specifiek voor het virus waarmee voor de eerste maal lokale vlekken geïnduceerd zijn. Het manifesteert zich echter uitsluitend bij inoculatie met een tweede virus dat lokale vlekken veroorzaakt. Inductie kan echter ook op andere wijze plaatsvinden dan door virussen die een hypersensitieve reactie oproepen, en wel door aardappelvirus X (Davis en Ross, 1968), schimmels die een hypersensitieve reactie teweegbrengen als *Thielaviopsis basicola* (Hecht en Bateman, 1964), lokale vlekken inducerende bacteriën als *Pseudomonas tabaci* (vgl. Lovrekovich *et al.*, 1968) en *P. lachrymans* of *P. solanacearum* (vgl. Lozano en Sequeira, 1970) op bepaalde variëteiten van tabak, en door hitte gedode cellen van laatstgenoemde bacterie en *P. syringae* (Loebenstein en Lovrekovich, 1966). Bij genoemde schimmel- en bacterieïnfecties is in een aantal gevallen aanmerkelijk gemaakt dat de geïnduceerde resistentie berust op de vorming van stoffen met anti-virus activiteit door het pathogeen (Harpaz *et al.*, 1969; Mann, 1969; vgl. Sequeira, 1971).

Het feit dat door virussen geïnduceerde verworven resistentie aspecifiek is en resulteert in een verminderde vatbaarheid en versterkte overgevoeligheid, wijst op een overeenkomst met de genetische eigenschappen van T.I. 245 tabak (vgl. 1.3). Door Thomas en Fulton (1966; 1968b) wordt dan ook aangenomen dat deze variëteit dit verschijnsel van nature in sterkere mate vertoont dan andere overgevoelige variëteiten. Deze opvatting wordt gesteund door het feit dat verworven resistentie in deze variëteit niet kan worden geïnduceerd. Daar het hier klaarblijkelijk een recessieve eigenschap betreft (vgl. 1.3), zou verworven resistentie dus ook kunnen berusten op de afwezigheid in plaats van op de aanwezigheid van een bepaald eiwit.

1.5. Keuze van de oplosbare eiwitfractie voor onderzoek naar veranderingen in eiwit-constitutie na infectie met TMV

Uit een overzichtartikel van Schlegel *et al.* (1967) blijkt dat men op dat moment aannam dat het RNA van een aantal plantevirussen, waaronder TMV, zich vermenigvuldigt in de kern en wel voornamelijk in de nucleolus, terwijl daarentegen de synthese van het manteleiwit en de assemblage van het virus zouden geschieden in het cytoplasma, mogelijk in contact met membraanoppervlakken. De veronderstelling dat de vermeerdering van TMV-RNA zich afspeelt in de kern, was voornamelijk gebaseerd op cytologisch onderzoek (Bald, 1964) en op het feit dat AMD de incorporatie van ^{14}C -uracil in de kernfractie remde in niet-geïnfecteerde, maar in veel mindere mate in geïnfecteerde planten, terwijl ook autoradiografie op een voor AMD ongevoelige incorporatie in vooral de nucleoli wees (Smith en Schlegel, 1964, 1965). Door Babos en Shearer (1969) is echter aangetoond dat geïnfecteerde planten in aanwezigheid van AMD aanzienlijk meer niet-virus-RNA synthetiseren dan niet-geïnfecteerde planten. Tezelfdertijd werd door Ralph and Wojcik (1969) aangetoond dat dubbelstrengig TMV-RNA aanwezig is in een fractie die sedimenteert met de mitochondriën en waarschijnlijk bestaat uit cytoplasmatische membraanstructuren (Ralph *et al.*, 1971). Dit resultaat is bevestigd door Senal (1969).

Hoewel TMV voorkomt in chloroplasten, zijn deze, mogelijk uitgezonderd voor de US stam (Shalla, 1968), niet de plaats van de TMV-synthese (Cech, 1967). Dit is meer recent bewezen met behulp van antibiotica die selectief de eiwitsynthese van 70 S (chloroplast) of 80 S (cytoplasma) ribosomen remmen. De vermenigvuldiging van TMV wordt niet geremd door chlooramfenicol (specifiek voor 70 S ribosomen; Ellis, 1969), maar wel door cycloheximide (specifiek voor 80 S ribosomen) (Zaitlin *et al.*, 1967; Albouy en Lapierre, 1969; Ouchi *et al.*, 1969; Furusawa *et al.*, 1970) en puromycine (specifiek voor 80 S ribosomen) (Kataoka *et al.*, 1969). Hoewel Langenberg en Schlegel (1969) primair de kern beschouwen als de plaats waar TMV-manteleiwit gevormd wordt, geven hun resultaten evengoed aanleiding te veronderstellen dat dit in het cytoplasma plaatsvindt. Experimenten van Hirai en Wildman (1967) wijzen eveneens op een assemblage van TMV-RNA en -eiwit in het cytoplasma.

Uit het bovenstaande volgt dat de cytoplasmatische ribosomen naar alle waarschijnlijkheid betrokken zijn bij de synthese van de voor de vermenigvuldiging van het virus-RNA benodigde enzymen en van het manteleiwit. De aanwezigheid van TMV-RNA op cytoplasmatische ribosomen is vastgesteld door Van Kammen (1963) en Babos (1971). Men kan dus verwachten dat in het cytoplasma, behalve bovengenoemde eiwitten, ook virus-specifieke eiwitten gevonden kunnen worden die mogelijk een rol spelen bij het tot stand komen van de symptomen. Hoewel het allerminst noodzakelijk is dat deze eiwitten vrij in het cytoplasma aanwezig zijn en daar ook hun werking uitoefenen, lijkt één van de mogelijkheden om deze eiwitten aan te tonen de isolering en karakterisering van de oplosbare eiwitfractie. Na infectie van een plant met een virus veranderen ook juist

de activiteiten van een groot aantal enzymen uit deze fractie (vgl. 1.4), terwijl beschadigingen van celorganellen zullen worden weerspiegeld in het verschijnen van orgaanel-specifieke eiwitten in het cytoplasma. Het is dus waarschijnlijk dat zowel virus-specifieke als verschillende soorten van waardplant-specifieke veranderingen in deze fractie tot uiting zullen komen in de vorm van veranderingen in de patronen der oplosbare eiwitten. Deze kunnen vervolgens worden onderscheiden doordat virus-specifieke eiwitten ook verschijnen na behandelingen van de planten met AMD, daar dit antibioticum de synthese van TMV-RNA nagenoeg niet beïnvloedt (Sänger en Knight, 1963; Kubo, 1966), en niet verschijnen na infectie van de planten met andere virussen. *De novo* gesynthetiseerde waardplant-specifieke eiwitten worden geremd door AMD, terwijl door beschadiging van organellen vrijkomende eiwitten kunnen worden onderscheiden, doordat zij ook verschijnen na infectie van de waardplant met andere virussen die dezelfde symptomen veroorzaken, maar niet in andere waardplanten na infectie met het oorspronkelijke virus.

Doordat bacterie- en diervirussen veelal de eiwitsynthese van de gastheer cel blokkeren, waardoor toediening van AMD niet noodzakelijk is, en goed gedefinieerde gastheer celculturen beschikbaar zijn, heeft men met behulp van elektroforese in polyacrylamidegel van een aantal van deze virussen de gedurende een infectiecyclus door het virus gecodeerde eiwitten kunnen onderscheiden en eventueel karakteriseren en isoleren bijv. van poliovirus (Summers *et al.*, 1965), MS-2 (Nathans *et al.*, 1966; Vinuela *et al.*, 1967), semliki forest virus (Hay *et al.*, 1968), mengovirus (Holland, 1968), herpesvirus (Spear en Roizman, 1968), T5 (McCorquodale en Buchanan, 1968) ϕ X-174 (Shimono *et al.*, 1969), vesicular stomatitis virus (Mudd en Summers, 1970), reovirus (Zweerink en Joklik, 1970).

Veranderingen in enzym patronen na infectie met plantevirussen zijn, eveneens met behulp van elektroforese in polyacrylamidegel, aangetoond door Farkas en Stahmann (1966) (zuidelijk bonemozaïekvirus op *Phaseolus vulgaris*), Solymosy *et al.* (1967) (TMV, tabaksnecrosevirus en luzernemozaïekvirus op *P. vulgaris* en *N. glutinosa*), Novacky en Hampton (1968) (TMV, tabaks-etsvirus, tabaksstrepenvirus, tabakskringvlekkenvirus, komkommermozaïekvirus en zuidelijk bonemozaïekvirus op *N. tabacum*, *Vigna sinensis*, *P. aureus* en *P. vulgaris*), Bates en Chant (1970) (TMV en tabaksnecrosevirus op *P. vulgaris* en *V. sinensis*), Chant en Bates (1970) (TMV en aardappelvirus X op *N. glutinosa*), Nienhaus en Hoogen (1970) (TMV op *P. vulgaris*), Marcinka (1970) (vlekkerigheidsvirus van rode klaver op *P. vulgaris*), Kato en Yamaguchi (1971) (gerstestrepemozaïekvirus op *H. vulgare*) en Wood (1971) (komkommermozaïekvirus op *Cucumis sativus* en *N. tabacum*). Het betreft hier in alle gevallen waardplant-specifieke veranderingen.

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1. Planten

Tabaksplanten (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun, Samsun EN en Samsun NN, en *N. glutinosa* L.) werden gezaaid en opgekweekt in een plantengroei-kamer onder geconditioneerde omstandigheden (daglengte 16 uur, lichtintensiteit ongeveer $25.000 \text{ erg. sec.}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ op planthoogte; temperatuur $18-20^{\circ}$; relatieve vochtigheid 65-80%.

Voor experimenten bij 30° werden de planten twee dagen na het oppotten overgebracht in Sherer klimaatkasten Model 255-6 onder dezelfde omstandigheden van daglengte, lichtintensiteit en relatieve vochtigheid.

De planten werden geïnfecteerd door de bladeren te bestuiven met Carborundum (600 mesh) en te inoculeren met een virusbevattende suspensie met behulp van een stuk hydrofielgas. Vervolgens werden de bladeren met kraanwater afgespoeld. Indien in de desbetreffende virus - waardplant combinatie systemische symptomen zouden optreden, werden de planten 6-8 weken na de zaaidatum geïnoculeerd; indien slechts de geïnoculeerde bladeren symptomen zouden vertonen, vond inoculatie 10-11 weken na de zaaidatum plaats. Met gedemineraliseerd water (gedem. water) geïnoculeerde planten werden in alle experimenten gebruikt als controle.

Voor vermeerdering van virussen werden de planten (*N. tabacum* cv. Samsun, Samsun NN en White Burley, en *N. sylvestris* Spegaz et Comes) opgekweekt in de kas, en na oppotten geïnfecteerd in het voor de vermenigvuldiging van het betrokken virus meest geschikte stadium.

2.2. Virussen

2.2.1. Tabaksmozaïekvirus

Een TMV-stam met de eigenschappen van U1 werd verkregen uitgaande van het in ons laboratorium gewoonlijk gebruikte isolaat „Wageningen" door afwisselende passage over Samsun NN en *N. sylvestris*, totdat geen lokale vlekken meer werden waargenomen bij herhaalde passage over laatstgenoemde soort. De aldus verkregen stam wordt in het vervolg aangeduid als W U1.

Het virus werd gezuiverd uit *N. sylvestris* via een combinatie van de methoden van Knight (1962) en Hebert (1963). 100 g bevroren bladmateriaal werd ontdooid en in een mixer gemalen tezamen met 3% vast K_2HPO_4 en 100 ml 0,01 M K-fosfaatbuffer pH 7,0. Het homogenaat werd uitgeperst door twee lagen kaasdoek. Het residu werd opnieuw gemalen, ditmaal met 50 ml 0,1 M fosfaatbuffer pH 7,0, en het homogenaat uitgeperst. De gecombineerde extracten werden 15 min. gecentrifugeerd bij 10.000 g. De supernatant werd bevroren bij -20° , na 1 uur ontdooid en opnieuw 15 min. gecentrifugeerd bij 10.000 g. Aan de aldus verkregen supernatant werd onder roeren toegevoegd polyethyleenglycol en

NaCl tot een eindconcentratie van respectievelijk 4% en 0,2 M. Na nog 15 min. roeren werd de oplossing 15 min. gecentrifugeerd bij 10.000 g. Het precipitaat werd overgoten met 25 ml 0,01 M fosfaatbuffer pH 7,0 en ingevroren bij -20° . Na ontdooien werden twee cycli van differentieel centrifugeren uitgevoerd. Het laatste precipitaat werd opgenomen in 5-10 ml gedem. water en na centrifugeren bij laag toerental als gezuiverde virusoplossing bewaard bij $0-2^{\circ}$. De concentratie aan TMV werd bepaald op grond van de optische dichtheid bij 260 nm, uitgaande van een extinctiecoëfficiënt $E_{260}^{1\text{ cm}} = 0,1\%$ = 2,8. De opbrengst was gemiddeld 400 mg per 100 g bladmateriaal.

TMV *vulgare* en de Holmes' ribgrass stam van TMV (TMV HR) waren afkomstig van het Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Melchers, Tübingen. Zij werden vermeerderd in tabak cv. Samsun en gezuiverd als beschreven voor TMV W U1. Holmes' necrotiserende stam 1952 D van TMV werd verkregen door bemiddeling van Dr. A.F. Ross.

2.2.2. Tabaksnecrosevirus

Tabaksnecrosevirus (TNV) werd vermeerderd in tabak cv. White Burley en gezuiverd volgens Kassanis (1964). De gezuiverde virusoplossing werd bewaard bij $0-2^{\circ}$. De concentratie aan TNV werd bepaald op grond van de optische dichtheid bij 260 nm, uitgaande van een extinctiecoëfficiënt $E_{260}^{1\text{ cm}} = 0,1\%$ = 5,5 (Babos en Kassanis, 1963).

2.2.3. Tabaksratelvirus

Een gezuiverd preparaat van tabaksratelvirus (TRV) werd verkregen van Ir. H. Huttinga. Na een cyclus van differentieel centrifugeren en resuspenderen in gedem. water werd het virus bewaard bij $0-2^{\circ}$. De concentratie aan TRV werd bepaald op grond van de optische dichtheid bij 260 nm, uitgaande van een extinctiecoëfficiënt $E_{260}^{1\text{ cm}} = 0,1\%$ = 2,0 (Huttinga, persoonlijke mededeling).

2.2.4. Komkommermozaïekvirus

Komkommermozaïekvirus (CMV) gele stam (Price, 1934) werd in stand gehouden en vermeerderd op tabak cv. Samsun NN.

2.2.5. Aardappelvirus X

Aardappelvirus X (PVX) werd vermeerderd op tabak cv. Samsun NN. Vier weken na inoculatie werden de bladeren geoogst en ingevroren bij -20° .

2.2.6. Aardappelvirus Y

Van aardappelvirus Y (PVY) werden de stammen Y^0 en Y^n gebruikt. PVY^0 was afkomstig

van Dr. J.A. de Bokx en werd vermeerderd op tabak cv. White Burley. Geïnfectedeerde bladeren werden ingevroren bewaard bij -20° . PVYⁿ werd bewaard in aardappelknollen. Voor inoculatie werd het virus eenmaal vermeerderd op tabak cv. Samsun of Samsun NN.

Vóór inoculatie op proefplanten werden alle virussen genoemd onder 2.2.2 en volgende paragrafen getoetst op afwezigheid van TMV door een verdunde virusoplossing of een extract van geïnfectedeerde bladeren uit te strijken op bladeren van *N. glutinosa*.

2.3. TMV-eiwit

2.3.1. Bereiding

TMV-manteleiwit (A-proteïne) van de stammen W U1 en Holmes' ribgrass werd bereid, uitgaande van een gezuiverde virussuspensie, volgens Fraenkel-Conrat (1957). Na dialyse en centrifugeren werd het neerslag opgenomen in 10 maal verdunde elektroforesebuffer.

2.3.2. Serologie

Voor het aantonen van TMV-manteleieit in eiwitextracten of op polyacrylamidegels werd gebruik gemaakt van immunodiffusie in 1% agar die 0,9% NaCl bevatte.

Polyacrylamidegels werden met een scheermesje afgesneden op de plaats van de broomfenolblauw band (vgl. 2.6.3). Zij werden direct na elektroforese of na 1 uur incubatie in 0,9% NaCl in de lengterichting gehalveerd met een door Fairbanks *et al.* (1965) beschreven gelsnijder. De gelhelften werden met hun vlakke kant op een objectglaasje gelegd dat bedekt was met een 1 mm dik laagje agar. Langs de staafjes werden 1 mm brede sleuven gesneden op een afstand van 4 mm. De sleuven werden gevuld met TMV-antiserum en de glaasjes werden gedurende 3 dagen bij 20° geïncubeerd in vochtige petrischalen.

2.4. Bereiding van oplosbare eiwitten uit tabak

2.4.1. Procedure; criteria voor zuiverheid; opbrengst

Onderzoek naar de invloed van verschillende omstandigheden op de extractie en zuivering van de oplosbare eiwitten uit tabaksbladeren met als doel het verkrijgen van een optimale scheiding en minimale achtergrondkleuring bij elektroforese van gezuiverde eiwitpreparaten in polyacrylamidegel (vgl. 2.6) is reeds eerder beschreven (Van Loon en Van Kammen, 1968). Daarom zij op deze plaats volstaan met een korte weergave van de bij de bereiding toegepaste werkwijze.

Van 10-13 weken oude planten werden tussen 8.30 en 10.00 uur de jonge en twee volledig volgroeide bladeren geoogst, tenzij anders is aangegeven. De bladeren werden

gewassen met gedem. water, van de middennerf ontdaan en vervolgens gedroogd tussen filtreerpapier.

Alle verdere behandelingen werden uitgevoerd bij 0-2°.

Het bladmateriaal werd 15 min. voorgekoeld en vervolgens in een mortier fijngeveven in 1,25 vol. (v/w) vers bereide extractiebuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,5 M saccharose, 0,1% ascorbinezuur, 0,1% cysteine, pH 8,0; Staples en Stahmann, 1964). Het aldus verkregen homogenaat werd uitgeperst door een aantal lagen hydrofielgaas, waarna celorganellen uit het filtraat werden verwijderd door drie opeenvolgende centrifugeringen (15 min. 15.000 g; 30 min. 30.000 g; 120 min. 150.000 g). De oplosbare eiwitfractie bevattende, gele bovenstaande vloeistof van de laatste centrifugering (S III) werd of wel direct gebruikt in elektroforeseexperimenten, of wel verder gezuiverd door gel-filtratie over Sephadex G 50 en concentratie van de eiwitbevattende fracties door toevoeging van vast ammoniumsulfaat (95% verz.) of door middel van ultrafiltratie in een Amicon cel voorzien van een UM 10 membraan. In het eerste geval werd het eiwit na precipitatie opgelost in 0,005 M Tris-glycinebuffer pH 8,6, afhankelijk van de verdere experimenten met of zonder 0,05% mercaptoëthanol (MCE). In beide gevallen werden de geconcentreerde eiwitoplossingen gedurende 20 uur gedialyseerd tegen twee maal 200 vol. van genoemde buffer. Na centrifugering bij laag toerental werd de bovenstaande vloeistof gebruikt als gezuiverde eiwitoplossing. Deze oplossing werd voor de elektroforeseexperimenten op 0,5 M saccharose gebracht door toevoeging van vaste saccharose of verdunning met een oplossing van 1 M saccharose in buffer.

De gezuiverde eiwitfractie was vrijwel kleurloos en vertoonde een U.V. spectrum dat karakteristiek is voor eiwit (max. 279 nm; min. 251 nm; gemiddelde verhouding van $A_{280} : A_{260} = 1,50$).

Eiwitconcentraties werden bepaald volgens de methode van Lowry *et al.* (1951), en uit de optische dichtheid bij 280 nm, uitgaande van een berekende extinctiecoëfficiënt $E_{280}^{1\text{ cm}} 0,1\% = 1,18$ bij gebruik van drooggevroren gezuiverd oplosbaar eiwit uit tabak als standaard. Het N-gehalte van tabakseiwit bedroeg 15,31%.

De gezuiverde eiwitoplossing bevatte minder dan 5% RNA, bepaald volgens de orcinol methode van Dische en Schwarz (1937), en slechts 0,5% volgens de spectrofotometrische bepaling van Warburg en Christian (1942). Deze laatste methode werd gebruikt voor correctie van de eiwitconcentratie in te vergelijken eiwitpreparaten met verschillende verhoudingen van $A_{280} : A_{260}$. De gemiddelde opbrengst was ongeveer 2 mg eiwit per g bladmateriaal.

2.4.2. Bereiding van radioactief gemerkte oplosbare eiwitten

Ter verkrijging van met ^{35}S -methionine of ^{14}C -leucine gemerkte oplosbare eiwitten werd gebruik gemaakt van de volgende procedure. Van tabaksplanten werden alle bladeren, op drie jong volgroeide na, verwijderd. Na 24 uur werden deze planten onder het oudste aanwezige blad afgesneden en met de onderkant van de stengel in een buisje ge-

plaatst waarin zich het gemerkte aminozuur bevond in 1 ml eenmaal verdunde Hoagland oplossing (Hoagland en Arnon, 1950), in een klimaatkast bij 20^o bij normale belichting en een relatieve vochtigheid van 90%. Nadat de gemerkte oplossing was opgenomen werd eenmaal verdunde Hoagland oplossing toegevoegd. In modelproeven was gebleken dat onder deze condities geen selectieve ophoping van radioactiviteit plaatsvond op de door afsnijden van de bladeren ontstane wondvlakken langs de stengel.

Na 24 uur werden de bladeren geoogst, geëxtraheerd en het extract gecentrifugeerd als boven beschreven. Aan 2 ml S III werd 2 ml 5% TCA-oplossing toegevoegd welke 1% van het betrokken aminozuur bevatte. Het neerslag werd verzameld op Millipore filters en tweemaal gewassen met TCA-aminozuuroplossing. Vervolgens werd het eiwitneerslag opgelost in 0,1 N NaOH. In de aldus verkregen oplossing werd de hoeveelheid radioactiviteit bepaald door vloeistofscintillatiespectrometrie (vgl. 2.6.2) en de hoeveelheid eiwit volgens Lowry *et al.* (1951).

2.5. Fractionering van de gezuiverde eiwitfractie

2.5.1. Gefractioneerde precipitatie met ammoniumsulfaat

De na gelfiltratie verzamelde eiwitbevattende fracties (vgl. 2.4.1) werden gecombineerd en achtereenvolgens op 20, 40, 60, 80 en 100% verzaadiging met ammoniumsulfaat gebracht. De gevormde precipitaten werden verzameld door centrifugering bij 30.000 *g* gedurende 10 min., opgenomen in 0,005 M Tris-glycine buffer pH 8,6 en gedialyseerd gedurende een nacht.

Voor fractionering van de gezuiverde eiwitfractie volgens 2.5.2 of 2.5.3 werd het precipitaat, verkregen door behandeling met ammoniumsulfaat (vgl. 2.4.1), opgenomen in en gedialyseerd tegen 0,05 M Tris-HCl buffer pH 7,5.

2.5.2. Gelfiltratie over Sephadex G 100

Tien ml gezuiverde eiwitoplossing werd gebracht op een Sephadex G 100 kolom (75 x 5 cm diam.), en geëluëerd met 0,05 M Tris-HCl pH 7,5. De pompsnelheid bedroeg 25 ml per uur. Fracties werden opgevangen om de 10 min. Geschikte fracties werden verzameld, geconcentreerd met behulp van ultrafiltratie en gedialyseerd tegen 0,005 M Tris-glycine buffer pH 8,6.

2.5.3. Chromatografie op DEAE-cellulose

Twee à drie ml gezuiverde eiwitoplossing werd gebracht op een kolom (21,5 x 1,8 cm diam.) van DEAE-cellulose, in de OH⁻ vorm, voorbehandeld volgens de aanwijzingen van de fabrikant, en geëquilibreerd met 0,05 M Tris-HCl pH 7,5. De pompsnelheid bedroeg 60 ml per uur. Fracties werden opgevangen om de 5 min. Trapsgewijze elutie vond plaats

met bufferoplossingen die 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,5, 1 en 2 M NaCl bevatten, waarbij de oplossingen steeds na 4 uur vervangen werden. Continue elutie vond plaats door na 4 uur elutie met bufferoplossing een lineaire zoutgradient van 0-0,4 M NaCl te starten.

Tabel 2.1. Gebruikte oplossingen voor elektroforese in polyacrylamidegel ^a

| Oplossing A | | Oplossing C | | Oplossing P | |
|------------------------------------|---------|------------------------|--------|-----------------------------|---|
| 1 N HCl | 48 ml | Acrylamide | 30,0 g | Ammoniumpersulfaat | 0,14 g |
| Tris | 36,6 g | Bis | 0,8 g | gedem. water tot | 100 ml |
| TEMED | 0,23 g | gedem. water tot | 100 ml | | |
| gedem. water tot | 100 ml | | | | |
| pH 8,9 | | | | | |
| Oplossing B | | Oplossing D | | Oplossing E | |
| 1 M H ₃ PO ₄ | 16 ml | Acrylamide | 10,0 g | Riboflavine | 4 mg |
| Tris | 5,7 g | Bis | 2,5 g | gedem. water tot | 100 ml |
| TEMED | 0,46 ml | gedem. water tot | 100 ml | | |
| gedem. water tot | 100 ml | | | | |
| pH 6,9-7,0 | | | | | |
| Elektroforesebuffer | | Loopkleurstofoplossing | | Ontkleuringsoplossing | |
| Tris | 6,0 g | Broomfenolblauw | 1 mg | Acrylamide | 6,0 g |
| Glycine | 28,8 g | gedem. water tot | 100 ml | Riboflavine | 0,5 mg |
| (MCE | 5 ml) | | | TEMED | 0,05 ml |
| gedem. water tot | 1 l | | | gedem. water tot | 100 ml |
| pH 8,6 | | | | Fotopolymerisatie gedurende | 6 uur; vervolgens verdunnen met 100 ml gedem. water |

^a Alle oplossingen werden bewaard bij 0-2^o; zij zijn bij die temperatuur vele maanden houdbaar.

Voor een aantal experimenten werden acrylamide en Bis hergekrystalliseerd uit chloroform, respectievelijk aceton (Maurer, 1968).

2.6. Elektroforese in polyacrylamidegel

2.6.1. Uitvoering

Elektroforese in polyacrylamidegel werd uitgevoerd volgens Ornstein (1964) en Davis (1964) met enkele wijzigingen. De scheiding in dit systeem vindt plaats bij pH 9,5, waardoor de aanwezige eiwitten negatief geladen zijn en zich naar de anode bewegen.

De gebruikte oplossingen zijn weergegeven in tabel 2.1.

Standaard 7,5% polyacrylamidegels werden bereid door 1,4 ml van een oplossing bestaande uit 1 deel A, 2 delen C, 1 deel gedem. water en 4 delen P te pipetteren in Pyrex buisjes met een lengte van 65 mm en een binnendiameter van 6 mm. Gels van 5 en 10% polyacrylamide werden op dezelfde wijze bereid door de hoeveelheid C in de oplossing proportioneel te verlagen, respectievelijk te verhogen bij gelijkblijvende concentraties van A en P. De oplossingen werden afgedekt met een laagje gedem. water van ca. 6 mm hoogte, waarna polymerisatie plaatsvond in 20-45 min.

De 2,5% polyacrylamide bevattende concentratiegel werd na de kleinporige scheidingsgel daar bovenop gepolymeriseerd en bevatte geen saccharose. In plaats van een Tris-HCl buffer pH 6,7 werd in de concentratiegel een buffer gebruikt van 0,16 M Tris-fosfaat pH 6,9-7,0. Deze buffer vergemakkelijkt polymerisatie van de gel en heeft een hogere buffercapaciteit (Ornstein en Davis, 1960). Na twee maal wassen met de geloplossing bestaande uit 1 deel B, 2 delen D, 1 deel E en 4 delen gedem. water, werd 0,3 ml op de scheidingsgel gepipetteerd en overdekt met een laagje gedem. water van ca. 3 mm hoogte. Polymerisatie onder invloed van daglicht vond plaats in 15-30 min.

Aanvankelijke pogingen om de te onderzoeken eiwitmonsters op te brengen in een monstergel – deze heeft de samenstelling van de concentratiegel, maar het water is geheel of gedeeltelijk vervangen door eiwitoplossing – hadden weinig succes. De aanwezigheid van MCE in de buffer van de eiwitoplossing verhinderde polymerisatie van de gels. Bovendien werden bij daaropvolgende elektroforese in de scheidingsgel minder scherpe banden verkregen, klaarblijkelijk als gevolg van het blootstellen van de eiwitoplossingen aan kamertemperaturen gedurende de polymerisatie. In veel gevallen bleef eiwit achter in de concentratiegel als gevolg van het polymerisatieproces, neerslaan en/of denaturatie. Daarom werden de gels na polymerisatie van de concentratiegel gekoeld tot 4°. Monsters in 0,5 M saccharose – 0,10 ml S III of 300 µg gezuiverde eiwitoplossing – werden door de buffer heen direct op de concentratiegels gepipetteerd.

De elektroforesebuffer bevatte 0,5% MCE en werd 1 : 10 verdund voor gebruik. Aan het bovenste buffervat (kathode) werd voor de run 0,5 ml broomfenolblauwoplossing toegevoegd.

Elektroforese vond plaats in een Acrylophor elektroforeseapparaat (Pleuger, Amstelveen) gedurende 20 min. bij een stroomsterkte van 2 mA per buisje en vervolgens gedurende ongeveer een uur bij een stroomsterkte van 4,5 mA per buisje (ongeveer 40 V

per cm), totdat de loopkleurstofband de onderkant van de gels tot op een paar mm genaderd was. Na afloop van de elektroforese werden de gels onder water uit de buisjes losgemaakt met een prepareernaald, en onmiddellijk overgebracht in oplossingen voor kleuring of incubatie.

Wanneer specifieke kleuringsreacties voor het aantonen van enzymen op de gels werden toegepast, werd elektroforese uitgevoerd in afwezigheid van MCE in de elektroforesebuffer. Van iedere serie werd tenminste één gel gekleurd met amidoblack (vgl. 2.6.2) ter referentie. De hierbij verkregen patronen kwamen overeen met die waarbij wel MCE gebruikt was; zij waren doorgaans echter enigszins diffuser en de met de in 3.1 beschreven band nummer 22 overeenkomende zone vertoonde onder die omstandigheden een duidelijke splitsing in twee dicht naast elkaar liggende banden. In de overige gels werd de positie van de broomfenolblauwband gemerkt door de gels aan te prikken met een naald met Oostindische inkt. Hierdoor was het mogelijk naderhand nauwkeurig de R_f waarden van de waargenomen banden te bepalen.

Door Brewer (1967), Mitchell (1967) en Fantès en Furringer (1967) werd een inactiverende invloed van ammoniumpersulfaat in de scheidingsgel ten aanzien van de activiteit van verschillende eiwitten vastgesteld. Brewer beveelt daarom fotopolymerisatie van de scheidingsgel met riboflavine aan. Bij polymerisatie van deze gels met riboflavine bleken de ontstane patronen echter een tamelijk diffuus beeld op te leveren, terwijl de R_f waarden van de individuele banden verhoogd waren. Daar bekend is, dat onder invloed van riboflavine grotere en onregelmatige poriën ontstaan (Davis, 1964), is polymerisatie met riboflavine minder geschikt indien een zeer hoge resolutie vereist is. Een mogelijke inactivering kan echter alleen optreden indien direct contact tussen eiwit en persulfaat mogelijk is. Dit gevaar is in het door ons gebruikte systeem minimaal: doordat de concentratiegel gepolymeriseerd werd met riboflavine, zal ook het snelstlopende eiwit het onder het grensvlak chloride-fosfaat aanwezige persulfaat niet bereiken.

Hjertén *et al.* (1965) wijzen er op dat het concentreringseffect van de concentratiegel ook bereikt kan worden wanneer men het monster in een buffer met een lager geleidingsvermogen dan dat van de elektroforesebuffer direct op de scheidingsgel brengt. In een experiment met een gezuiverde eiwitoplossing werden gels met en zonder concentratiegel vergeleken terwijl in het laatste geval de elektroforesebuffer slechts 1 : 2 verdund was. De verkregen patronen waren in beide gevallen wezenlijk gelijk, ofschoon weglaten van de concentratiegel tot een iets minder duidelijk beeld en iets bredere banden leidde. Hoewel aanvaardbaar in het geval van gezuiverde eiwitoplossingen, zijn de resultaten bij elektroforese van S III zeer onbevredigend. Deze oplossing bezit een hoog geleidingsvermogen en onder deze omstandigheden ontstonden slechts enkele brede banden. Gebruik van een concentratiegel was daarom bij elektroforese van S III absoluut noodzakelijk om het complexe eiwitmengsel in smalle, scherpe banden te scheiden, terwijl het bij elektroforese van gezuiverde eiwitoplossingen doorgaans een iets betere resolutie bewerkstelligde.

In enkele experimenten werd nagegaan of, uitgaande van S III, in dit vereenvoudigde systeem een bevredigende scheiding tot stand gebracht kon worden, wanneer S III direct na centrifugering gedurende een nacht gedialyseerd werd tegen 0,005 M Tris-glycine buffer pH 8,6. Zelfs bij enige malen verversen en voortgezette dialyse bleef de eiwitbevattende oplossing geel van kleur, terwijl in een aantal gevallen, vooral in extracten van planten die symptomen van necrose vertoonden, bruinkleuring optrad ten gevolge van oxidatie van fenolische verbindingen. Na elektroforese bleken de patronen van aldus gedialyseerde S III betrekkelijk diffuus, zowel bij gebruik van het vereenvoudigde, als van het eerder beschreven normale systeem. Een nadelig effect van voorafgaande dialyse op de resolutie bij elektroforese in polyacrylamidegel is ook door andere auteurs beschreven (vgl. Polter, 1967).

Daar de hoge osmotische waarde van S III het volume bij dialyse sterk deed toenemen, was bij lage eiwitconcentraties het invoeren van een concentratiestap gewenst. Aangezien de patronen van de gezuiverde, via gelfiltratie verkregen, eiwitoplossing aanzienlijk scherper waren dan die van gedialyseerde S III, kon een dergelijke bewerking de vergelijking met de in 2.4.1 beschreven methode niet doorstaan.

Bij gebruik van een Tris-boraatbuffer pH 8,6 (Welling, persoonlijke mededeling) kunnen interferenties van reagentia die noodzakelijk zijn voor het zichtbaar maken van hydrolytische enzymen op de gels, met in de gels aanwezig glycine worden vermeden. Aldus verkregen patronen weken wat de verdeling der banden betreft enigszins af van die verkregen bij gebruik van het Tris-glycine systeem; een zware band op het grensvlak van concentratiegel en scheidingsgel wees er op, dat een gedeelte van het eiwit de scheidingsgel niet was binnengedrongen. Wanneer in dit systeem de eiwitmonsters worden opgebracht in saccharose, treedt bovendien complexvorming op van boraat met saccharose en eventueel aanwezige glycoproteïnen, hetgeen leidt tot het ontstaan van artefacten (Lerch en Stegemann, 1969). Om deze redenen werd er van afgezien een Tris-boraatsysteem te gebruiken.

In het door Ornstein en Davis beschreven systeem worden wel zure, maar geen basische eiwitten gescheiden. Daarom werd nagegaan of de verkregen eiwitoplossingen ook in componenten konden worden gescheiden in systemen waarbij elektroforese plaatsvindt bij lage pH-waarden. Zowel het systeem van Reisfeld *et al.* (1962) als dat van Shepherd en Gurley (1966) werd beproefd. In deze systemen vindt de scheiding plaats bij respectievelijk pH 3,8 en pH 2,3. Daar de concentratie- en scheidingsgels van deze systemen echter pH's bezitten van 6,7 en 4,3, respectievelijk 5,9 en 2,9, en het isoëlektrisch punt van verreweg de meeste plante-eiwitten tussen deze beide pH-waarden ligt, sloeg bij elektroforese steeds het grootste deel van het opgebrachte eiwit neer op het grensvlak van concentratiegel en scheidingsgel. In de scheidingsgel waren enkele zwakke, zeer diffuse banden zichtbaar, doch deze droegen weinig bij tot karakterisering van de onderzochte eiwitfracties.

2.6.2. Zichtbaar maken van eiwitten op de gels na elektroforese

Eiwitbanden werden zichtbaar gemaakt door de gels direct na elektroforese gedurende tenminste 1 uur bij kamertemperatuur te leggen in een verzadigde oplossing van amidoblack 10 B of 0,25% lightgreen in 5% TCA. Kleuringstijden tot 24 uur werden toegepast zonder merkbaar nadelige invloed op het ontstane eiwitpatroon. Bij gebruik van deze kleuringsmethode werd een betere resolutie verkregen dan met de standaardmethode (Davis, 1964) waarbij als kleuringsoplossing 1% amidoblack in 7% azijnzuur aanbevolen wordt.

Na kleuring werden de gels 5 min. gewassen met kraanwater en geëquilibreerd met 7% azijnzuur, waarbij eenmaal werd ververscht. Bij gebruik van verse kleuringsoplossingen waren de banden na equilibreren met azijnzuur reeds duidelijk zichtbaar op een licht gekleurde achtergrond. Indien weinig, relatief intens gekleurde banden aanwezig waren, was verdere ontkleuring overbodig en werden de gels direct overgebracht in een verse oplossing van 7% azijnzuur en hierin bewaard. In alle andere gevallen werden de gels verder elektroforetisch ontcleurd op de door Davis (1964) beschreven wijze, in 30-60 min. bij een stroomsterkte van 8 mA per gel en bij 0-2°.

Voor amidoblack is de hoeveelheid opgenomen kleurstof evenredig met de hoeveelheid eiwit in een bepaalde band over een reeks van 0-40 µg, als bepaald aan TMV A-proteïne. Voor lightgreen is dit niet helemaal het geval, daar kleine hoeveelheden eiwit relatief sterker gekleurd worden. De kleuring met amidoblack vervaagt weinig in de loop van enkele jaren; de kleuring met lightgreen vrijwel geheel binnen enkele weken. Daarentegen is door de betrekkelijk lage intensiteit van de kleuring met lightgreen de resolutie op relatief hoge concentraties eiwit bevattende gels of gelgedeelten bijzonder hoog en dikwijls tenminste zo goed als met amidoblack, doordat dicht naast elkaar liggende banden beter als zodanig te herkennen zijn bij kleuring met lightgreen.

De bij kleuring met amidoblack verkregen patronen vertoonden dezelfde onderlinge kwantitatieve verhoudingen der eiwitbanden als patronen die gekleurd waren met 0,5% procionblue in 7% azijnzuur. Het is bekend dat procionblue zeer homogeen aan verschillende eiwitten wordt gebonden (Fazekas de St. Groth *et al.*, 1963), maar de intensiteit van deze kleuring was in onze experimenten te laag om steeds alle aantoonbare eiwitbanden zichtbaar te maken. Procionblue bleek daarom niet geschikt voor routinematige eiwitkleuringen. Doordat de onderlinge intensiteiten der banden echter vergelijkbaar waren met die van bij kleuring met amidoblack verkregen patronen, mag worden aangenomen dat laatstgenoemde kleuring de verdeling van het eiwit over de gels tamelijk nauwkeurig weergaf. Met lightgreen werden sommige eiwitbanden sterker gekleurd dan met amidoblack, andere met amidoblack sterker dan met lightgreen (vgl. Van Loon en Van Kammen, 1968).

Kleuring met coomassieblue (Fazekas de St. Groth *et al.*, 1963) volgens Chrambach *et al.* (1967) leverde een aanzienlijk minder duidelijk beeld dan amidoblack en lightgreen in die gedeelten van de gel, waar zeer veel banden zeer dicht naast elkaar ge-

leggen zijn. Met deze zeer gevoelige kleuring werden echter zwakke banden in gedeelten met een relatief gering aantal eiwitbanden intenser gekleurd, waardoor een duidelijker karakterisering van de patronen mogelijk was. Kleuring met coomassieblue leek daarom bij uitstek geschikt als aanvulling op kleuring met amidoblack of lightgreen. Hiertoe werden de gels na elektroforese 4 uur gekleurd in een oplossing van 0,05% coomassieblue in 12,5% TCA en vervolgens ontkleurd door wassen met 10% TCA (Stegemann, 1968).

Indien radioactief gemerkt eiwit was onderworpen aan elektroforese, werd de verdeling van de radioactiviteit over de gel als volgt nagegaan. Na elektroforese werden de gels in dwarse plakjes met een dikte van 1,25 mm gesneden met behulp van een apparaat bestaande uit 50 ronde scheermesjes op gelijke afstand van elkaar (Goldberger, 1968). ^{35}S bevattende gelschijfjes werden opgelost met behulp van 0,1 ml 30% H_2O_2 gedurende een nacht bij 37° (Young en Fulhorst, 1965). Aan de verkregen oplossingen werd 10 ml Brays oplossing (Bray, 1960) zonder POPOP toegevoegd, waarna ze geteld werden in een Nuclear Chicago Mark I vloeistofscintillatiespectrometer. De „efficiency“, bepaald aan de hand van de kanalenverhoudingsmethode, bedroeg voor alle monsters 82-83%. Een correctie om het aantal dpm te verkrijgen werd daarom niet toegepast.

Bij elektroforese van ^{14}C bevattend eiwit werd voor de bereiding van de scheidingsgel in oplossing C Bis vervangen door 2 g ethyleendiacylaat. De verkregen gelschijfjes werden opgelost in 0,5 ml 1 M piperidine in 10% ethanol gedurende 24 uur bij kamertemperatuur (Choules en Zimm, 1965). Aan de oplossingen werd 10 ml Kinards telvloeistof (Kinard, 1957) toegevoegd, waarna ze geteld werden als beschreven voor ^{35}S .

2.6.3. Zichtbaar maken van enzymen op de gels na elektroforese

Heterogene eiwitcomponenten en specifieke enzymbanden op de gels werden zichtbaar gemaakt met behulp van histochemische kleuringstechnieken. Glycoproteïnen werden op de gels gelokaliseerd volgens de methode van Maurer (1968) met enkele modificaties (vgl. Bobbitt, 1956), lipoproteïnen volgens Linskens (1959) en nucleoproteïnen en RNA volgens Peacock en Dingman (1967). Enzymatronen werden zichtbaar gemaakt met een enkele, verschillende of een combinatie van methoden. Onderzocht werden alcoholdehydrogenase, melkzuurdehydrogenase, NAD en NADP afh. appelzuurdehydrogenase en isocitroenzuurdehydrogenase, 6-fosfogluconzuurdehydrogenase, glucose-6-fosfaatdehydrogenase, α -oxoglutaarzuurdehydrogenase, barnsteenzuurdehydrogenase, glutaminezuurdehydrogenase (alle volgens Honold *et al.*, 1966), glycerol-3-fosfaatdehydrogenase (Grell, 1967; Honold *et al.*, 1966), shikimizuurdehydrogenase (Fric en Fricova, 1968; Honold *et al.*, 1966), diaforase (Johnson *et al.*, 1966; Fric en Fricova, 1968), oxidasen (Nadi-reactie) (Burstone, 1962; Weber *et al.*, 1967), *o*- en *p*-difenoxidase (Van Loon, 1971), ascorbinezuuroxidase (Amon en Markakis, 1969; Möller en Van Poucke, 1970), katalase (Scandalios, 1964; Macko *et al.*, 1967), peroxidase (Macko *et al.*, 1967; vgl. 5.8.2), fosforylase en amylase (beide volgens Siepman en Stegemann, 1967), hexokinase (Knowles en Fristrom, 1967), polynucleotidfosforylase (Thang *et al.*, 1967; Stegemann,

1968; Fitt en Wille, 1969), ribonuclease (Burstone, 1962; Wolf, 1968; vgl. 5.8.1), esterase (Weber *et al.*, 1967), alkalische fosfatase (Burstone, 1962; Rudolph en Stahmann, 1966; Stahmann *et al.*, 1966), zure fosfatase (Rudolph en Stahmann, 1966; Burstone, 1962; Weber *et al.*, 1967), fosfodiesterase (Lerch, 1968), desoxyribonuclease (Boyd en Mitchell, 1965), leucine-aminopeptidase (Scandalios, 1964), protease (Fottrell, 1968; Riedel en Wünsch, 1959; Stegemann, 1968) en glucosefosfaatisomerase (Carter en Parr, 1967).

Geen banden werden waargenomen in de reacties op alkalische fosfatase, glycerol-3-fosfaatdehydrogenase, NAD afh. isocitroenzuurdehydrogenase, barnsteen-zuurdehydrogenase, ascorbinezuuroxidase; fosforylase als zetmeelafbrekend enzym en protease met gelatine als substraat. Niet specifiek bleken de reacties op α -oxoglutaarzuurdehydrogenase, *p*-difenoloxidase, hexokinase en glucosefosfaatisomerase.

2.6.4. Evaluatie

De patronen verkregen bij kleuring van de gels op eiwitten of enzymen werden vastgelegd in densitometergrafieken. Verschillende in de handel verkrijgbare apparaten werden onderzocht op hun geschiktheid voor het scannen van cilindrische gels en het scheidend vermogen. De gunstigste resultaten werden verkregen met een Photovolt model 520-A densitometer, gekoppeld aan een Varicord 43 linear/log recorder. De bijgeleverde spleet van 0,1 mm werd vernauwd tot 0,05 mm met behulp van scheermesjes. Met amidoblack of coomassieblue gekleurde patronen werden gescand zonder filter; voor de met lightgreen gekleurde patronen werd een oranje filter met een maximale transmissie bij 595 nm gebruikt. Enzympatronen werden in een aantal gevallen gescand met een filter van contrasterende kleur. De verkregen resultaten werden vergeleken met de visueel waarneembare patronen.

De patronen waren goed reproduceerbaar. Wanneer dezelfde gel in verschillende posities werd gescand, traden geen of, indien de banden op de gel niet geheel recht waren, slechts kleine verschuivingen in de onderlinge verhoudingen der eiwitbanden in de grafieken op. Ditzelfde gold voor duplo gels, waarop hetzelfde eiwitmonster in dezelfde run aan elektroforese was onderworpen. Voorts konden geen significante verschillen worden waargenomen in gels uit verschillende experimenten, indien vergelijkbare eiwitmonsters waren gebruikt. Dank zij de verbeterde methode voor het kleuren van eiwitten in gels (vgl. 2.6.2) waren enkele banden meer waarneembaar met het blote oog dan in de densitometergrafieken, daar smalle, dicht tegen elkaar gelegen banden niet in alle gevallen afzonderlijk werden weergegeven. Een relatief klein aantal banden werd als enkelvoudige pieken weergegeven; verreweg de meeste als meer of minder prominente schouders als gevolg van een enorme concentratie van eiwitcomponenten in het bovenste gedeelte van de gels. De relatief lage achtergrondskleuring maakte het echter mogelijk zwakke banden steeds, zowel visueel als door densitometrie, waar te nemen. In enkele gevallen werden de relatieve hoeveelheden eiwit in bepaalde banden

vastgesteld door meting van de oppervlakten van de pieken in de densitometergrafieken met behulp van een planimeter.

De positie van de eiwitbanden op de gels werd uitgedrukt door de R_f waarde, waarbij de afstand waarover de broomfenolblauwband gelopen had, op 1,00 gesteld werd. Bij alle gebruikte gelconcentraties migreerde een eiwitband samen met het kleurstofffront. Deze eiwitband vertegenwoordigt daarom positie 1,00 in de densitometergrafieken. De R_f waarden van alle overige banden varieerden enigszins, afhankelijk van de aard van het opgebrachte monster, hoeveelheid eiwit en experimentele omstandigheden. Bij elektroforese van de gezuiverde eiwitfractie waren de R_f waarden doorgaans iets hoger dan bij elektroforese van S III. De hoeveelheid en samenstelling van het monster hadden met name invloed indien bepaalde componenten sterk in concentratie varieerden in verschillende monsters, doch alleen in het gebied waar de betrokken component zich bevond op de gel. Voorts was een variatie van experiment tot experiment niet uit te sluiten, daar de gels steeds afzonderlijk moesten worden bereid.

In een aantal gevallen werden de patronen tevens fotografisch vastgelegd. De gels werden horizontaal in glazen schaaltes of verticaal in reageerbuizen gevuld met 7% azijnzuur gefotografeerd met diffuus, doervallend licht (Van der Kamp en Bloemendal, 1966). De horizontale opstelling had het voordeel dat streping over de gels door lichtbreking werd voorkomen. Bevredigende fotografische patronen werden verkregen wanneer slechts enkele of een aantal banden van ongeveer gelijke intensiteit op de gel aanwezig waren. Daar de patronen van tabakseiwitten zowel zeer intense als zeer zwakke banden bevatten, was het echter moeilijk bij het afdrukken deze verschillen in intensiteit te behouden. Indien zwakke banden juist werden weergegeven, leek de achtergrondskleuring aanzienlijk verhoogd, en waren een aantal banden in het bovenste gedeelte van de gel niet meer afzonderlijk te herkennen.

2.7. Toetsen van het effect van verschillende eiwitfracties en chemische verbindingen

In een aantal experimenten werd het effect bestudeerd van verschillende eiwitfracties en chemische verbindingen op de symptoominductie en -expressie en de eiwitsamenstelling van met TMV W U1 geïnfecteerde tabaksplanten. Ter controle werden dezelfde bewerkingen uitgevoerd met planten die met gedem. water waren geïnoculeerd. Vóór de behandeling werden van de planten alle bladeren onder de laatste vier volgroeide, ca. 15 cm lange bladeren verwijderd, en in de meeste gevallen tevens de toppen tot en met het jongste volgroeide blad.

Actinomycine D (AMD) werd in de overgebleven bladeren ingespoten met een injectienaald (Klement, 1963; Loebenstein *et al.*, 1968) in een concentratie van 20 μg per ml. De bladeren werden 15-40 maal aangeprikt. Afhankelijk van het bladoppervlak werd 2-4 ml in elk blad ingespoten. Op dezelfde wijze werden gecentrifugeerde (S III) en gezuiverde oplosbare eiwitfracties uit tabaksbladeren ingespoten.

HgCl_2 werd in een concentratie van 0,1% op de bladeren gespoten met een verstuiver.

Het effect van verschillende eiwitfracties op de infectiositeit van TMV werd bepaald door een mengsel van de te toetsen oplossing en gezuiverd virus uit te strijken op bladheften van *N. glutinosa*, als beschreven door Van Kammen (1963).

2.8. Chemicaliën

Agar, Difco special agar-noble. Difco Labs., Detroit.
Albumine, Bovine serum albumin, Sigma, fraction I, powder.
Acrylamide, Koch-Light Labs. Ltd.
Actinomycine D, Merck, Sharp & Dohme, Haarlem.
Amidoblack 10 B, Merck, Darmstadt.
Bis, N,N-methyleenbisacrylamide, Koch-Light Labs. Ltd.
Coomassieblue, Supranolcyanin 6 B extra, Bayer, Leverkusen.
DEAE-cellulose, Whatman, type DE 52.
Ethyleendiacrylaat, K & K rare chemicals.
Lightgreen, BDH Chemicals Ltd.
Mercaptoëthanol, Koch-Light Labs. Ltd.
Polyethyleenglycol, Carbowax 6000, Heybroek, Amsterdam.
Polyuridylzuur, Calbiochem, K-salt, A grade.
Procionblue, Procion brilliant blue M RS, ICI.
Pyronine Y, K & K rare chemicals.
RNA, Sigma, type XI, from Baker's yeast.
Sephadex G 50, G 100, Pharmacia, Stockholm.
TEMED, N,N,N',N'-tetramethylethyleendiamine, Koch-Light Labs. Ltd.
Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethaan, Fluka.

³⁵S-methionine en ¹⁴C-leucine waren afkomstig van The Radiochemical Centre, Amersham, Engeland.

Alle andere gebruikte chemicaliën waren afkomstig van Merck, Darmstadt of van BDH Chemicals Ltd., met uitzondering van een aantal substraten, coënzymen en koppelingsreagentia voor het zichtbaar maken van isoënzym patronen op de gels, die werden verkregen van Sigma en Koch-Light Labs. Ltd.

Dialysehuls Visking 20/32 en 32/32 van Höfelft, 's-Gravenhage, werd voor gebruik uitgekookt in 10^{-4} M Na₃EDTA.

3. VERANDERINGEN IN EIWIJTPATRONEN VAN VERSCHILLENDE TABAKSVARIËTEITEN NA INFECTIE MET VERSCHILLENDE TMV-STAMMEN BIJ VERSCHILLENDE TEMPERATUREN

3.1. Vergelijking van de eiwitpatronen van tabak cv. Samsun en Samsun NN

Gegeven het verschil in genetische constitutie tussen de variëteiten Samsun en Samsun NN van tabak, werd nagegaan of verschillen in de constitutie van de oplosbare eiwitfractie van deze variëteiten konden worden vastgesteld die mogelijkwijs een rol zouden kunnen spelen bij de specifieke reactie van de waardplant na infectie met TMV. De habitus van de Samsun NN planten tijdens de opkweek verschilde enigszins van die van Samsun planten, hetgeen, overeenkomstig het in 1.3 beschrevene, mag worden toegeschreven aan de aanwezigheid van de Hg chromosomen: Vergeleken met Samsun planten waren Samsun NN planten enigszins gedrongen, met steviger stengels en kortere internodiën; de bladeren waren iets donkerder groen met een iets kleinere lengte-breedte verhouding, maar niet duidelijk kleiner dan die van Samsun planten.

In inleidende experimenten werden de gezuiverde eiwitfracties onderworpen aan elektroforese in agar-gel in veronalbuffer pH 8,4 volgens Wieme (1959), gevolgd door kleuring met amidoblack of nigrosine als beschreven door Zwartz (1967). Met deze methode

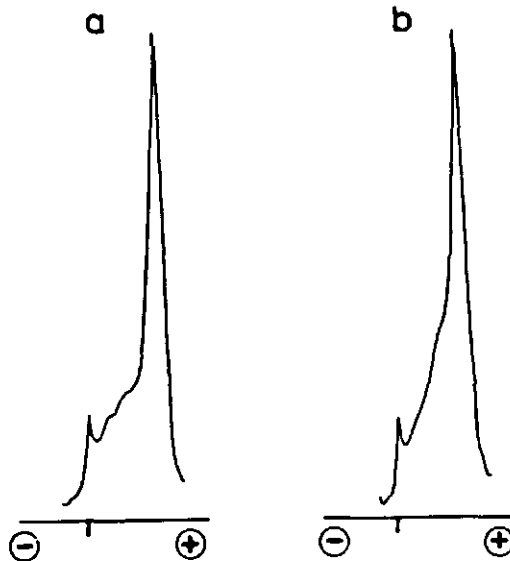


Fig. 3.1. Densitometergrafieken van elektroforesepatronen in agar-gel van gezuiverd oplosbaar eiwit uit tabak cv. Samsun (a) en Samsun NN (b). Elektroforese van 200 μ g eiwit vond plaats gedurende 90 min. bij een stroomsterkte van 24 mA per plaatje (ca. 20 V per cm). De gels werden gedurende 1 uur gefixeerd in ethanol-azijnzuur-water 14 : 1 : 5 en vervolgens 1 uur gekleurd in een oplossing van 0,5% amidoblack - 5% $HgCl_2$ in 5% azijnzuur.

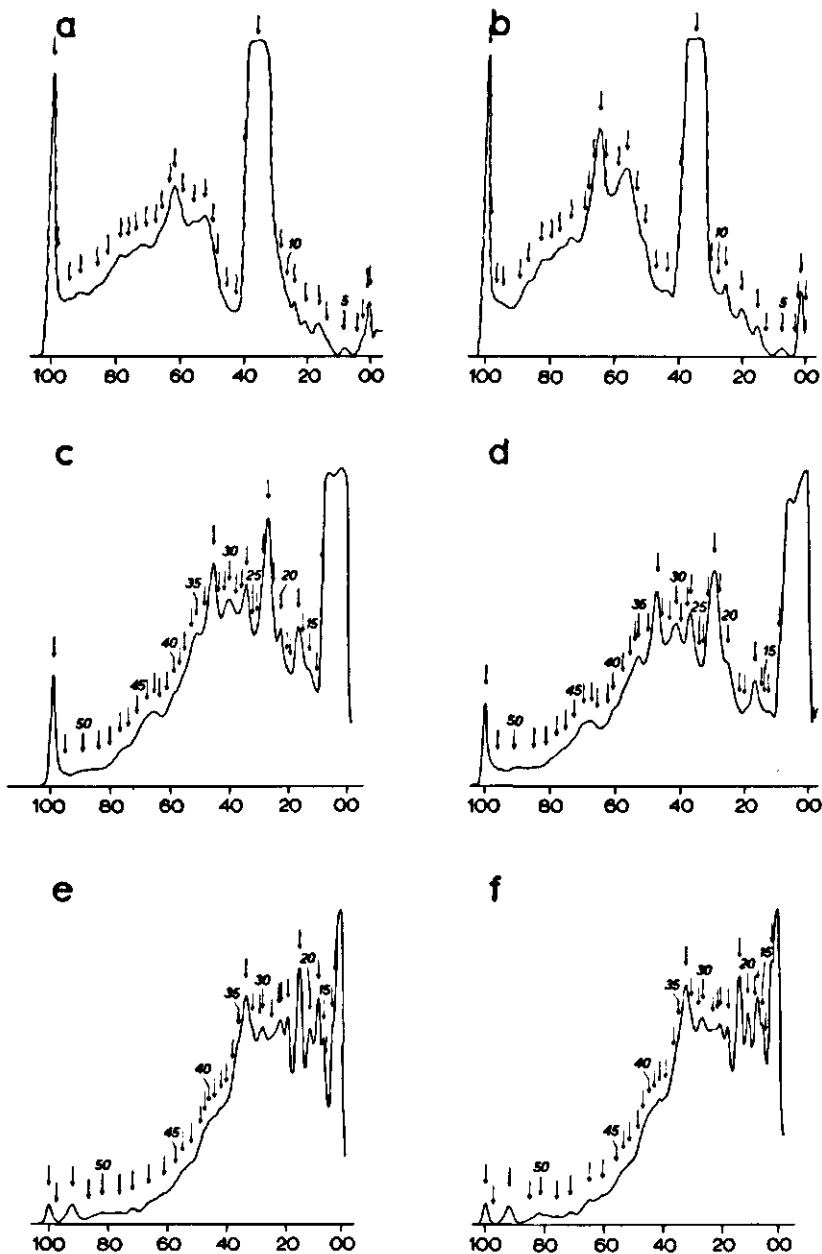


Fig. 3.2. Densitometergrafieken van elektroforesepatronen in polyacrylamidegel van 300 µg gezuiverd oplosbaar eiwit uit tabak cv. Samsun (a,c,e) en Samsun NN (b,d,f). Elektroforese vond plaats in 5 (a,b), 7,5 (c,d) en 10% (e,f) gels. De gels werden gekleurd in een verzadigde oplossing van amidoblack in 5% TCA. De eiwitbanden zijn genummerd naar toenemende mobiliteit. In deze en volgende figuren zijn in de grafieken de posities der banden aangegeven door middel van hun respectievelijke R_f waarden x 100.

werd een scheiding in slechts drie duidelijke componenten verkregen: zowel bij Samsun als bij Samsun NN planten werd één zeer sterk gekleurde eiwitband met twee relatief zwak gekleurde schouders van langzamer migrerend eiwitmateriaal waargenomen (Fig. 3.1). Daarentegen kon met behulp van elektroforese in 7,5% polyacrylamidegel in de regel een scheiding worden verkregen in ruim dertig duidelijke banden (Fig. 3.2 c,d).

Uit de met elektroforese in agargel verkregen resultaten is af te leiden dat de oplosbare eiwitten uit tabak weinig verschilden in negatieve lading bij de bij elektroforese gebruikte pH. Daaruit mag geconcludeerd worden dat de met behulp van elektroforese in polyacrylamidegel bereikte scheiding voornamelijk een gevolg was van de moleculaire zeefwerking van de gel. Dit werd in grote trekken bevestigd in experimenten waarin gelfiltratie en chromatografie op DEAE-cellulose werden toegepast (vgl. 5.7.2 en 5.7.3). Gegeven de geringe ladingsverschillen tussen de verschillende aanwezige eiwitten, heeft variatie van de gelconcentratie tussen 5 en 10% geen belangrijke invloed op de volgorde van de eiwitten in de gels (Zwaan, 1967). Het was nu mogelijk meer inzicht te verkrijgen door elektroforese gelijktijdig uit te voeren in 5, 7,5 en 10% polyacrylamidegels. Eiwitten die langzaam migreerden in 7,5% gels werden beter gescheiden in 5% gels, terwijl eiwitten die snel migreerden in 7,5% gels duidelijker als zodanig herkenbaar waren in 10% gels (vgl. Fig. 3.2).

Ter vergelijking werden de banden genummerd naar toenemende mobiliteit in 7,5% gel. Door intense banden met R_f waarden van 0,29 en 0,47 in 7,5% gels als referentie te gebruiken, was het mogelijk de eiwitbanden in de drie verschillende concentraties polyacrylamide bevattende gels met elkaar te vergelijken. De nummering der banden werd daarop uitgebreid tot die banden die beter gescheiden waren in 5 en 10% gel. Op deze wijze werden tot vijftig duidelijk verschillende eiwitbanden waargenomen (Fig. 3.2).

Figuur 3.2 laat voorts zien dat er geen kwalitatieve verschillen tussen eiwitextracten uit Samsun en Samsun NN planten aan de dag traden bij gebruik van amidoblack als algemene eiwitkleurstof. Dit was evenmin het geval bij kleuring met lightgreen of coomassieblue. Substitutie van de H chromosomen door de Hg chromosomen werd dus niet weerspiegeld door een aantoonbare verandering in de constitutie van de oplosbare eiwitfractie. Het verschil in reactie na infectie met TMV lijkt daarom hoogstwaarschijnlijk niet het gevolg van de werkzaamheid van een reeds aanwezig specifiek eiwit. Veel eerder kan verwacht worden dat verschillen geïnduceerd zullen worden als gevolg van de interactie tussen pathogeen en waardplant. De mogelijkheid dat een specifiek eiwit aanwezig is in een zeer kleine, met deze methode niet aantoonbare hoeveelheid, kan echter niet worden uitgesloten.

3.2. Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun na infectie met TMV W U1 bij 20°

Tien tot veertien dagen na infectie met TMV W U1 werden op Samsun tabak systemische mozaïeksymptomen zichtbaar op de jonge, zich ontwikkelende bladeren. Bladeren met ka-

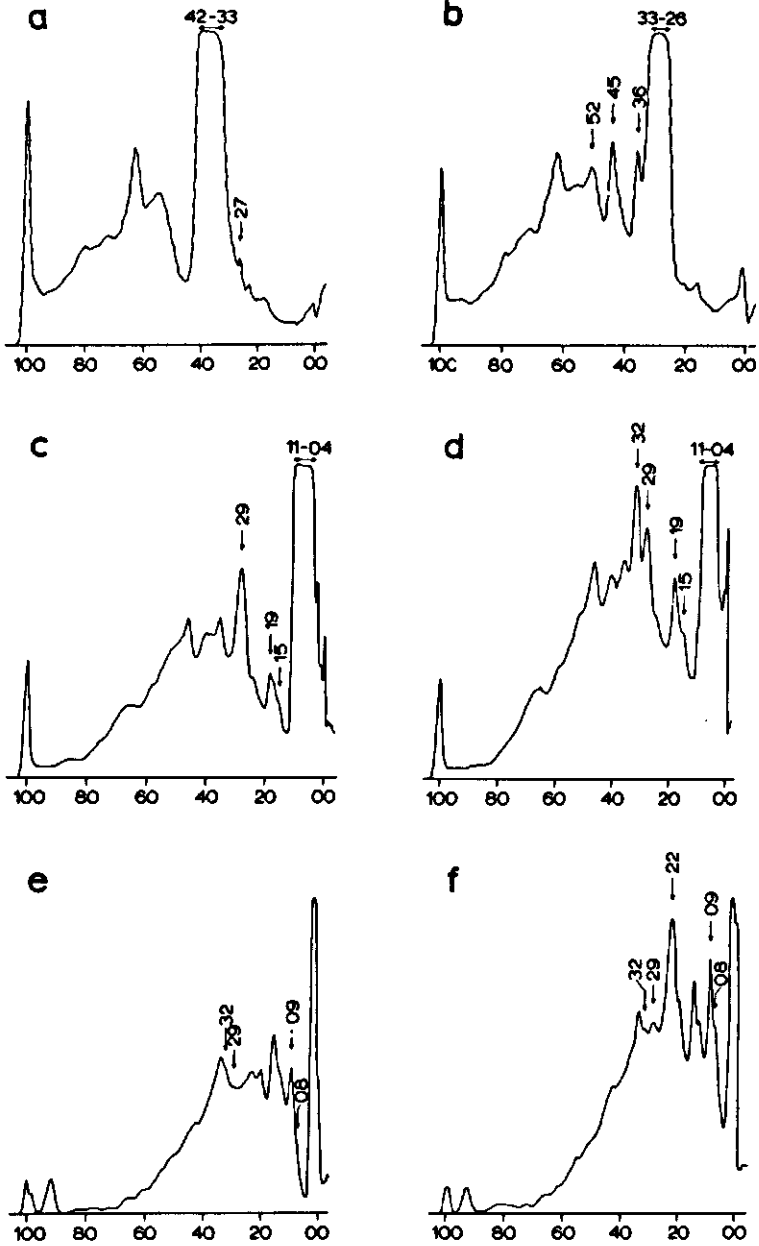


Fig. 3.3. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van tabak cv. Samsun, 28 dagen na inoculatie met gedem. water (a,c,e) of 100 µg TMV W U1 per ml (b,d,f) bij 20°. Elektroforese van 300 µg gezuiverd oplosbaar eiwit vond plaats in 5 (a,b), 7,5 (c,d) en 10% (e,f) polyacrylamidegels; kleuring met amidoblack.

rakteristische lichtgroene-donkergroene mozaïeksymptomen en in de meeste gevallen secundaire misvormingen werden 28 dagen na infectie geoogst voor de extractie van oplosbare eiwitten. Niet-geïnfecteerde planten waren groter, met meer en grotere bladeren. Hiervan werden de overeenkomstige bladeren geoogst, gerekend vanaf de toppen der planten. In het algemeen werd minder eiwit geëxtraheerd uit met TMV geïnfecteerde dan uit niet-geïnfecteerde planten.

Fig. 3.3 c,d geeft de patronen weer die verkregen werden wanneer gelijke hoeveelheden van de gezuiverde oplosbare eiwitfractie (0,3 mg), geëxtraheerd uit niet-geïnfecteerde en met TMV geïnfecteerde planten, werden gescheiden op 7,5% gels. Vergelijken met niet-geïnfecteerd materiaal, werd in de geïnfecteerde planten een relatieve afname waargenomen in de hoeveelheid eiwit in de voornaamste band 0,04-0,11 en in de intense band 0,29, en een relatieve toename in alle andere eiwitbanden in het gebied 0,11-0,80, in het bijzonder in de banden 0,15 en 0,19.

Een nieuwe band 0,32 was aanwezig in met TMV geïnfecteerde Samsun planten (Fig. 3.3 d). Deze positie was identiek met die van gezuiverd TMV-manteleiwit (A-proteïne) wanneer dit onderworpen werd aan elektroforese onder dezelfde omstandigheden. Daarnaast werd door co-elektroforese van een mengsel van 0,3 mg eiwit uit niet-geïnfecteerde Samsun planten en 25 µg A-proteïne, een eiwitpatroon verkregen dat kwalitatief gelijk was aan dat van geïnfecteerde planten. Tenslotte werd de identiteit van de nieuw verschenen band bevestigd met serologische methoden. Figuur 3.4 a,b laat zien dat precipitatielijnen verschenen rondom positie 0,32, zowel wanneer eiwit uit geïnfecteerde planten als wanneer A-proteïne onderworpen was aan elektroforese. In het eerste geval werden geen precipitatielijnen op andere plaatsen waargenomen. Hieruit blijkt dat in geïnfecteerde Samsun planten TMV-manteleiwit in grote overmaat aanwezig is, in overeenstemming met de resultaten van Takahashi en Ishii (1953) en Commoner en Yamada (1955).

Figuur 3.3 a,b toont de patronen in 5% gels. In met TMV geïnfecteerde planten was de intensiteit van de voornaamste band 0,33-0,42 – identiek met de voornaamste band 0,04-0,11 in 7,5% gels – verlaagd. Deze band vertoonde in de meeste experimenten ook een duidelijke verschuiving naar boven, d.w.z. in de richting van de kathode, hetgeen in dit geval resulteerde in een positie 0,26-0,33. Hiermee gepaard ging het verdwijnen van een betrekkelijk zwakke band 0,27 en het verschijnen van een band 0,36 (Fig. 3.3 a,b).

In vele experimenten werd gevonden dat de voornaamste band in niet-geïnfecteerde planten bestond uit twee zones van ongeveer gelijke intensiteit. Men zou zich kunnen voorstellen dat de nieuwe band 0,36 in met TMV geïnfecteerde Samsun planten één van deze eiwitten vertegenwoordigde in sterk gereduceerde hoeveelheid, terwijl de hoeveelheid van het andere relatief onveranderd was. Er werd echter ook een dubbele band waargenomen wanneer relatief kleine hoeveelheden eiwitbevattende extracten van met TMV geïnfecteerde planten aan elektroforese werden onderworpen. Daarom zou dit verschijnsel kunnen worden toegeschreven aan een zeer sterke stijging van de hoeveelheid

eiwit in de langzamer migrerende band 0,27. Een andere verklaring zou zijn dat de nieuwe band 0,36 een eiwit vertegenwoordigt dat reeds aanwezig was in niet-geïnfecteerde planten, maar verborgen werd door de aanwezigheid van één van de voornaamste eiwitcomponenten, terwijl band 0,27 als zodanig aanwezig was in geïnfecteerde planten en in dat geval verborgen werd door het bovenste gedeelte van de voornaamste band. Voor dit laatste pleit het feit dat bij elektroforese van een relatief kleine hoeveelheid eiwit in S III uit niet-geïnfecteerde Samsun planten, waarbij de voornaamste eiwitband een veel geringer gebied besloeg, in een aantal gevallen een duidelijke band 0,36 direct onder de voornaamste eiwitband werd waargenomen. Tevens was in experimenten waarin geen of een geringe verschuiving van de voornaamste band optrad in geïnfecteerd materiaal, steeds een duidelijke band 0,27 te zien (vgl. Fig. 3.5 b).

De aard en de functie van de klaarblijkelijke reductie in elektroforetische mobiliteit van de voornaamste band in met TMV geïnfecteerde Samsun planten is niet duidelijk, temeer daar deze niet in alle experimenten in gelijke mate optrad. Sommige auteurs (Mácko *et al.*, 1967; Stegemann, persoonlijke mededeling) beschouwen deze band als „fraction I protein”, aangezien eenzelfde band gevonden wordt in alle eiwitextracten uit groene plantedelen. Daar „fraction I protein” ribulosedifosfaatcarboxylase-activiteit bezit (Trown, 1965) kan de in een aantal gevallen waargenomen reductie in elektroforetische mobiliteit samenhangen met veranderingen in het fotosyntheseapparaat, die in het lichtgroen-donkergroene mozaïekpatroon tot uiting komen.

Bij elektroforese in 5% gels werden in met TMV geïnfecteerde Samsun planten tevens nieuwe banden waargenomen met R_f waarden 0,45 en 0,52 (Fig. 3.3 b). Band 0,45 viel sa-

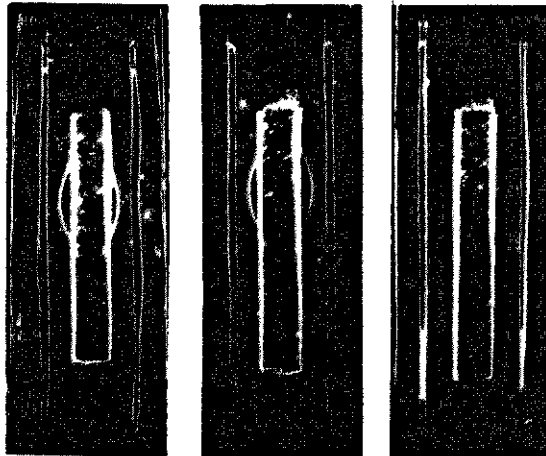


Fig. 3.4. Immunodiffusiepatronen, verkregen na elektroforese van 300 μ g gezuiverd oplosbaar eiwit uit tabak cv. Samsun (a), 25 μ g TMV-manteleiwit (b) en 1 mg gezuiverd oplosbaar eiwit uit tabak cv. Samsun NN (c) in 7,5% polyacrylamidegels. Gelhelften werden geplaatst op agarplaatjes tussen twee spleten die gevuld werden met TMV-antiserum.

men met TMV-manteleiwit en reageerde met TMV-antiserum. De aard van band 0,52 is niet duidelijk. Daar het scheidend vermogen van 5% gels relatief laag was en een aantal snel migrerende eiwitten in kleine hoeveelheden in dit gebied aanwezig was in niet-geïnfecteerde planten, is het optreden van deze band waarschijnlijk het gevolg van een stijging in de hoeveelheid van enkele eiwitcomponenten die gezamenlijk migreren bij deze gelconcentratie (vgl. Fig. 3.2 a).

De patronen in 10% gels zijn weergegeven in Fig. 3.3 e,f. De intense band 0,22 in geïnfecteerde planten werd geïdentificeerd als TMV-manteleiwit. Deze band vertegenwoordigde daarom een kwalitatief verschil en geen kwantitatief zoals men zou kunnen veronderstellen op grond van de aanwezigheid van een duidelijke band, bestaande uit een aantal dicht naast elkaar gelegen eiwitcomponenten, bij deze R_f waarde in niet-geïnfecteerde planten. Kwantitatieve verschillen analoog aan die welke werden waargenomen in 7,5% gels, werden geconstateerd in de vorm van een toename in alle eiwitbanden in het gebied 0,04-0,70, in het bijzonder in de banden 0,08 en 0,09, in geïnfecteerd materiaal. Voorts was hierin een relatieve stijging opgetreden in band 0,29 en een relatieve daling in band 0,32.

3.3. Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun na infectie met TMV W U1 bij 30°

Infectie van tabak cv. Samsun met TMV W U1 bij 30° leidt tot hetzelfde type symptomen als bij 20°. Reeds na 7-10 dagen werden symptomen zichtbaar en deze waren heviger dan bij 20°. Op het tijdstip van de oogst, 21 dagen na infectie, vertoonden de planten een zeer uitgesproken lichtgroen-donkergroen mozaïek en sterke secundaire misvormingen, vaak in de vorm van waaierervige bladeren met onregelmatige randen. Niet-geïnfecteerde planten hadden, vergeleken met die bij 20°, kleine, ronde bladeren. Bij 30° vertoonden geïnfecteerde planten ten opzichte hiervan slechts een geringe reductie in groei.

Om een indruk te krijgen of bij 30° de veranderingen in eiwitpatronen na infectie met TMV W U1 vergelijkbaar waren met die bij 20°, werden gelijke volumina (0,1 ml) van gecentrifugeerde extracten (S III) direct onderworpen aan elektroforese.

Figuur 3.5 a-d geeft de patronen weer in 5 en 7,5% gels. In 7,5% gels (Fig. 3.5 c, d) viel direct op dat uit geïnfecteerde planten veel minder eiwit geëxtraheerd was dan uit niet-geïnfecteerd materiaal. De verkregen patronen stemden echter, afgezien van kleine wijzigingen in de R_f waarden der banden die moeten worden toegeschreven aan de andere samenstelling van het opgebrachte monster (vgl. 2.6.3; 3.5), kwalitatief goed overeen met die uit Fig. 3.3. Een TMV-eiwitband was aanwezig, doch minder opvallend dan bij 20°. Het manteleiwit migreerde hier tot R_f 0,30. In de grafiek vormde het één piek met de in Fig. 3.5 c herkenbare band 0,32 (Fig. 3.5 d).

Figuur 3.5 a,b bevestigt de aanwezigheid van een relatief kleine hoeveelheid TMV-eiwit met R_f 0,43 bij elektroforese in 5% gels. De voornaamste eiwitband had in dit

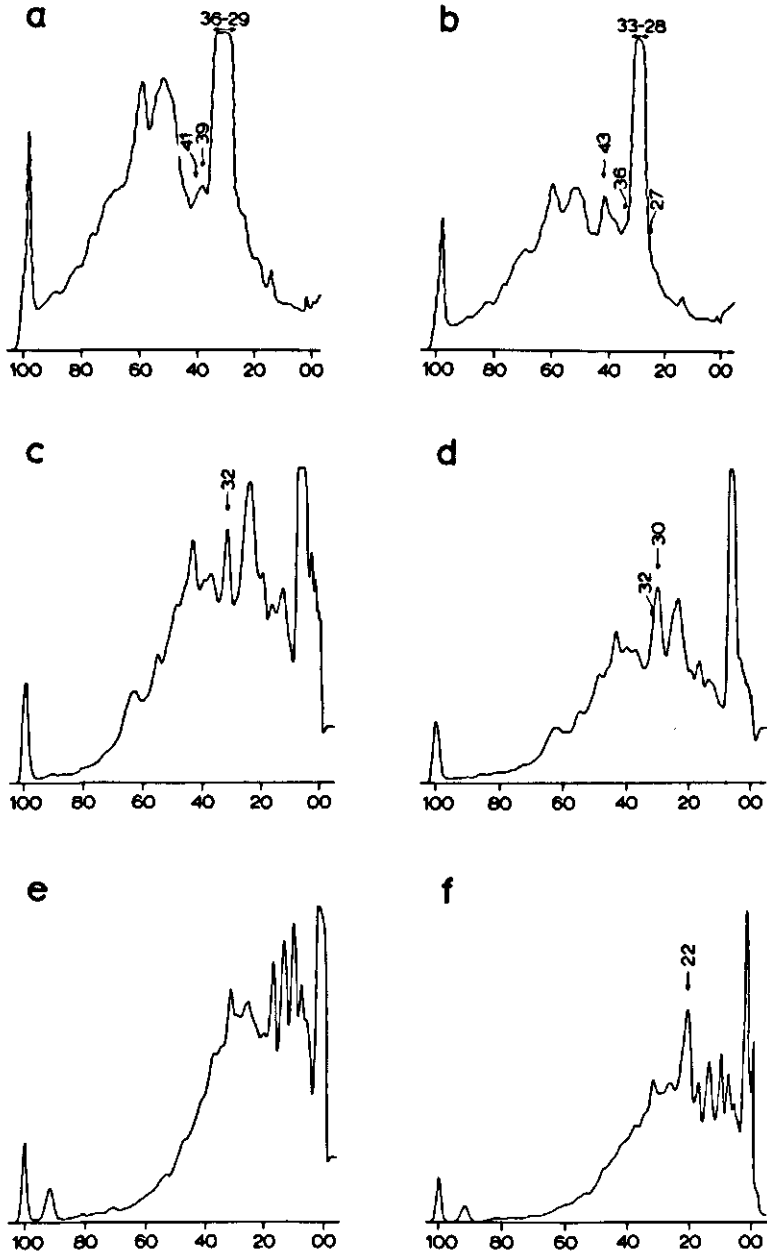


Fig. 3.5. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van tabak cv. Samsun (a-d) en Samsun NN (e,f), 21 dagen na inoculatie met gedem. water (a,c,e) of 100 µg TMV W U1 per ml (b,d,f) bij 30°. Elektroforese van 0,1 ml gecentrifugeerd extract vond plaats in 5 (a, b), 7,5 (c,d) en 10% (e,f) polyacrylamidegels; kleuring met amidoblack.

experiment een R_f waarde van 0,29-0,36 in niet-geïnfecteerde en van 0,28-0,33 in geïnfecteerde planten, hetgeen een relatief geringe vermindering in elektroforetische mobiliteit vertegenwoordigde. Doordat deze band zich voor wat betreft niet-geïnfecteerd materiaal slechts uitstreckte tot R_f 0,36, waren twee banden met R_f waarden 0,39, respectievelijk 0,41, zichtbaar die niet opgemerkt konden worden in Fig. 3.3. Voor wat betreft geïnfecteerd materiaal werd geen „nieuwe" band waargenomen die zou kunnen overeenkomen met band 0,52 in Fig. 3.3 b. Wel was een zwakke, doch duidelijke band 0,36 waarneembaar, terwijl band 0,27 niet werd verborgen wegens de geringe vermindering in mobiliteit van de voornaamste eiwitband.

In 10% gels werden, met uitzondering van de aanwezigheid van een duidelijke TMV-eiwitband 0,22 in geïnfecteerde Samsun planten, geen wezenlijke verschillen waargenomen.

Hieruit volgt dat infectie van tabak cv. Samsun met TMV W U1 bij 30° behalve tot dezelfde symptomen ook tot in wezen dezelfde veranderingen in oplosbare eiwitten leidt als infectie bij 20°. Kwantitatief bezien is de aanwezige hoeveelheid vrij manteleiwit echter kleiner dan bij 20°.

3.4. Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun EN na infectie met TMV W U1 bij 20°

Bij infectie van tabak cv. Samsun EN met TMV W U1 ontstaan dezelfde symptomen als in geïnfecteerde Samsun planten. Dit werd in onze experimenten bevestigd. Bij elektroforese van 0,1 ml van S III in 5, 7,5 en 10% gels bleek dat het eiwitpatroon van niet-geïnfecteerde Samsun EN planten zich kwalitatief niet onderscheidde van dat van Samsun of Samsun NN planten. De veranderingen in de patronen op 7,5 en 10% gels na infectie met TMV kwamen geheel overeen met die welke in 3.2 beschreven zijn voor geïnfecteerde Samsun planten; als enig kwalitatief verschil werd de aanwezigheid van TMV-eiwit geconstateerd in geïnfecteerd materiaal. In 5% gels werd geen verandering in de elektroforetische mobiliteit van de voornaamste eiwitband waargenomen, echter wel een extreme verlaging in intensiteit. Een band overeenkomend met TMV-eiwit was direct onder deze band te zien en vormde een schouder in de densitometergrafieken.

3.5. Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun NN na infectie met TMV W U1 bij 20°

Bij 20° ontstaan op de variëteit Samsun NN 3 dagen na inoculatie met TMV W U1 ronde, lokale necrotische vlekjes (lokale vlekken) op de geïnoculeerde bladeren. Op de oudere bladeren ontstonden relatief veel vlekken; zij bleven klein en waren gewoonlijk egaal grijsbruin van kleur. Op de jongere bladeren werden relatief weinig vlekken gevormd; de diameter hiervan nam na het zichtbaar worden nog enkele dagen toe, waarbij meestal een donkerbruine rand ontstond om een licht-grijsbruin centrum. Door de ne-

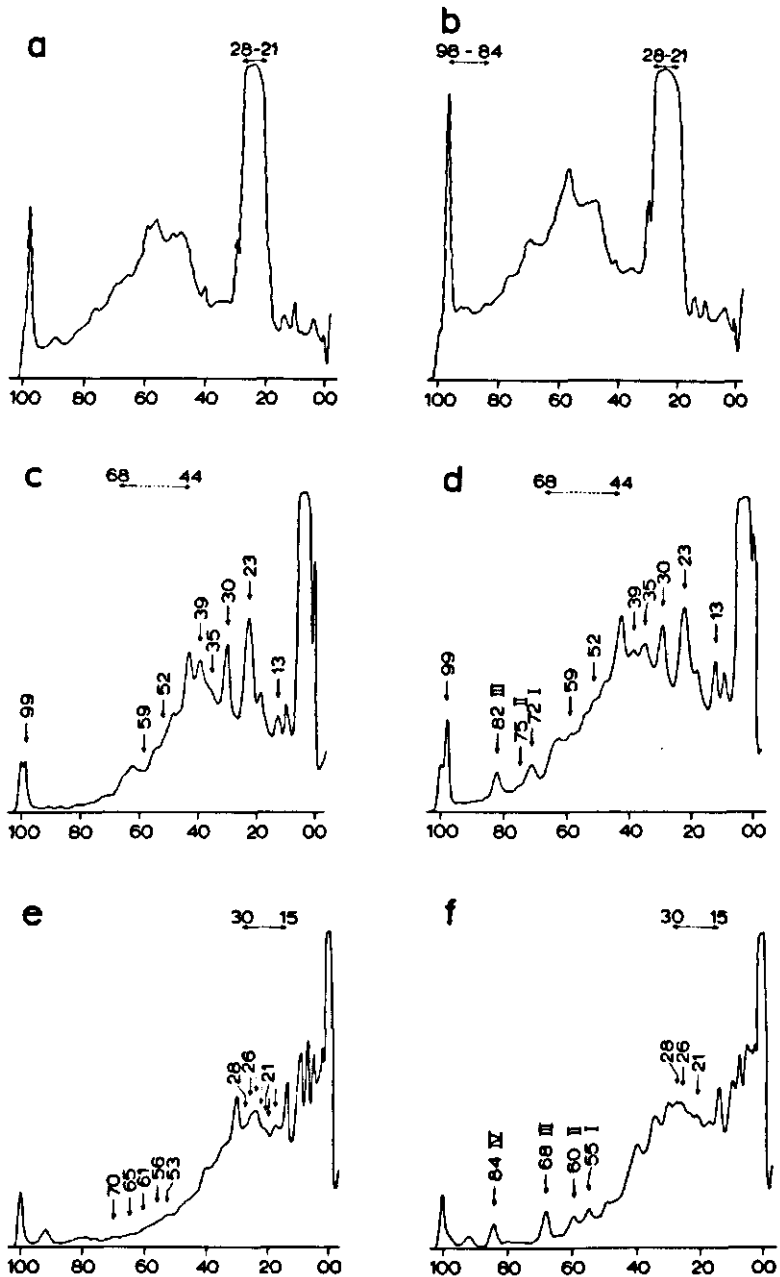


Fig. 3.6. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van tabak cv. Samsun NN, 7 dagen na inoculatie met gedem. water (a,c,e) of 100 µg TMV W UI per ml (b,d,f) bij 20°. Elektrofese van 0,1 ml gecentrifugeerd extract vond plaats in 5 (a,b), 7,5 (c,d) en 10% (e,f) polyacrylamidegels; kleuring met amidoblack.

crotisering van het weefsel tussen de nerven, en het doorgroeien van de nerven zelf ontstonden in de jongere bladeren opbollingen van de nerven en lichte bladdeformaties. Als gevolg van infectie trad geen reductie in de groei van de planten op.

Door Martin en Gallet (1966b,c) is aangetoond dat het virus niet ingesloten wordt in de vlekken, maar daar buiten aanwezig is in een smalle kring. Het is echter niet in staat zich van daaruit te verspreiden en de jonge, zich ontwikkelde bladeren binnen te dringen. Uit deze bladeren is geen virus te extraheren en zij vertonen geen symptomen, maar zijn wat uiterlijk betreft volledig vergelijkbaar met bladeren van niet-geïnfecteerd materiaal.

Voor het onderzoek naar de constitutie van de oplosbare eiwitfractie werden geheel met vlekken overdekte bladeren 7 dagen na inoculatie geoogst voor extractie.

De elektroforesepatronen van de gezuiverde oplosbare eiwitfractie uit met TMV geïnfecteerde Samsun NN planten vertoonden een minder goede scheiding in componenten dan die uit niet-geïnfecteerde planten. Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt door het hoge gehalte aan fenolische verbindingen in de geïnfecteerde bladeren, daar deze zich gemakkelijk aan eiwitten kunnen hechten in de latere stappen van de zuiveringsprocedure. Een goede scheiding kon echter worden verkregen bij elektroforese van S III, onmiddellijk na centrifugering. Onder deze omstandigheden was het niet mogelijk gelijke hoeveelheden eiwit uit geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde planten op te brengen. Daarom werden gelijke volumina van de eiwit bevattende extracten, welke gelijke hoeveelheden vers bladmateriaal (vers gewicht) vertegenwoordigden, op de gels gepipetteerd. De aldus verkregen patronen waren wezenlijk gelijk aan die van gezuiverde extracten (vgl. Van Loon en Van Kammen, 1968), maar de R_f waarden waren voor alle eiwitbanden vergelijkenderwijs lager. Dit resulteerde in een kleine, reproduceerbare verschuiving van de patronen naar de oorsprong.

Figuur 3.6 geeft de patronen weer die verkregen werden wanneer 0,1 ml gecentrifugeerd extract uit niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde Samsun NN planten onderworpen werd aan elektroforese in 5, 7,5 en 10% gels. Uit de patronen blijkt dat vrijwel alle eiwitcomponenten in geïnfecteerde planten in grotere hoeveelheden aanwezig waren dan in niet-geïnfecteerde planten. Dit is in overeenstemming met onze waarneming, dat in de meeste experimenten meer eiwit geëxtraheerd werd uit met TMV geïnfecteerde dan uit niet-geïnfecteerde Samsun NN planten.

Zoals blijkt uit de patronen op 7,5% gels (Fig. 3.6 c,d) nam in geïnfecteerde planten de hoeveelheid eiwit in de banden 0,13, 0,35, 0,52, 0,59 en 0,99 toe en in band 0,39 aanzienlijk af. De intensiteit van de banden 0,23 en 0,30 was eveneens verminderd. Kleine verschillen werden gesignaleerd in de relatieve hoeveelheden van de meeste andere eiwitbanden.

In geïnfecteerde planten resulteerde de aanwezigheid in toegenomen hoeveelheden van de eiwitten in het gebied 0,44-0,68 in een duidelijker scheiding in dit gedeelte van de gel (Fig. 3.6 d). Dit gebied bleek een groep isoënzymen van peroxidase te bevatten en de toename in de intensiteit van de kleuring van deze eiwitten met amido-

black weerspiegelde daarom mogelijkwijs een toename in de hoeveelheid der peroxidasen (vgl. Fig. 5.8; Novacky en Hampton, 1967).

Figuur 3.6 laat zien dat nieuwe eiwitcomponenten met R_f waarden 0,72, 0,75 en 0,82 aanwezig bleken in geïnfecteerde planten. Deze banden werden respectievelijk band I, II en III genoemd. De banden I en II waren volledig van elkaar gescheiden op de gels, maar band II vormde doorgaans een schouder van band I in de densitometergrafieken. Figuur 3.6 f en 3.7 b laten zien dat elektroforese in 10% gels de aanwezigheid van deze drie componenten in geïnfecteerde planten bevestigde, zowel bij kleuring met amido-black (Fig. 3.6 f) als bij kleuring met coomassieblue (Fig. 3.7 b). In het laatste geval werd een minder duidelijk beeld verkregen voor het gebied 0,00-0,50, doch banden in het gebied 0,50-1,00 waren intens gekleurd en door de aanwezigheid van een relatief gering aantal banden zeer duidelijk herkenbaar.

Bij deze gelconcentratie had band I een R_f waarde van 0,55. In niet-geïnfecteerde planten was een zwakke band aanwezig met R_f 0,56 (Fig. 3.6 e en 3,7 a). Het is niet duidelijk of de hoeveelheid van dit eiwit zodanig was toegenomen dat de indruk van een nieuwe band gewekt werd, of dat een component verschenen was waarvan de aanwezigheid niet kon worden vastgesteld in niet-geïnfecteerde planten. In het eerste geval zou tenminste een zeer opmerkelijke kwantitatieve verandering in deze band moeten zijn opgetreden. In experimenten waarin de R_f waarden van alle banden relatief laag waren en een zeer goede scheiding was bereikt, was echter in de grafieken een aanwijzing te vinden voor het optreden van een schouder van band 0,55 (Fig. 3.7 b). Uitgaande van zijn positie op de gel kon band I eveneens worden onderscheiden van de duidelijker waarneembare band 0,53, weergegeven in Fig. 3.6 e en Fig. 3.7 a,b. Daarom wordt aangenomen, dat band I een eiwit vertegenwoordigde dat pas na infectie verschijnt.

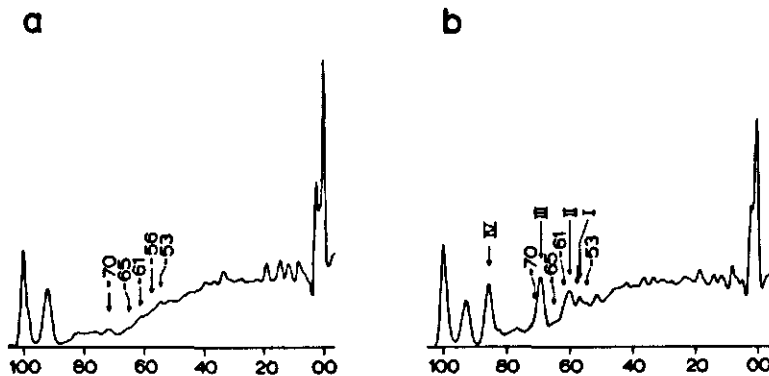


Fig. 3.7. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van tabak cv. Samsun NN, 7 dagen na inoculatie met gedem. water (a) of 100 μ g TMV W UI per ml (b) bij 20°. Elektroforese van 0,1 ml gecentrifugeerd extract vond plaats in 10% polyacrylamidegels; kleuring met coomassieblue.

Band II vormde een duidelijke piek bij R_f 0,60 en band III migreerde opnieuw als een enkele band en wel tot R_f 0,68 in 10% gels (Fig. 3.6 f). In niet-geïnfecteerde planten waren zeer zwakke banden te onderscheiden met R_f waarden 0,61, 0,65 en 0,70 (Fig. 3.6 e en 3.7 a). Deze banden waren altijd gekarakteriseerd door enigszins verschillende posities ten opzichte van die van de banden II en III (Fig. 3.7 b); zij waren als afzonderlijke banden op de gels te zien, maar verschenen meestal als vlakke schouder in de densitometergrafieken.

De figuren 3.6 f en 3.7 b laten zien dat in geïnfecteerde planten een vierde nieuwe band (band IV) gevonden werd met een R_f waarde van 0,84. In de densitometergrafieken correspondeerde de oppervlakte onder deze piek precies met de toename in de oppervlakte onder band 0,99 in 7,5% gels (Fig. 3.6 d). Voorts werden in 10% gels geen kwantitatieve verschillen in de drie verder dan band IV migrerende eiwitbanden waargenomen tussen niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde planten. De waargenomen kwantitatieve verandering in band 0,99 in 7,5% gels was dus in feite veroorzaakt door een kwalitatief verschil tussen niet-geïnfecteerde en met TMV geïnfecteerde planten; het verschijnen van een nieuwe eiwitcomponent als gevolg van infectie.

De kwantitatieve verschillen tussen niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde planten die werden waargenomen in de in Fig. 3.6 e,f weergegeven patronen, kunnen grotendeels analoog geacht worden aan die welke gevonden werden in 7,5% gels (Fig. 3.6 c,d). De veranderingen in de banden 0,35 en 0,39 in 7,5% gels bleken te berusten op veranderingen in tenminste drie van de zes of zeven componenten in het gebied 0,15-0,30 in 10% gels; een relatief belangrijke stijging was opgetreden in de banden 0,21, 0,26 en 0,28 (Fig. 3.6 e,f).

Uit Fig. 3.8 blijkt dat alle waargenomen kwantitatieve verschillen direct samenhangen met de hoeveelheid virus waarmee de planten waren geïnoculeerd, en daarmee met de hevigheid der symptomen. Weergegeven zijn de eiwitpatronen in 10% gels van S III, verkregen uit Samsun NN planten die 7 dagen tevoren geïnoculeerd waren met resp. gedem. water, 0,1, 1,0, 10 en 100 μg TMV per ml (Fig. 3.8 a-e). In deze reeks nam het aantal lokale vlekken evenredig toe met de virusconcentratie, uitgezonderd bij de hoogste waarde (vgl. Tabel 5.1). Ter vergelijking is tevens een patroon weergegeven van 14 dagen tevoren met 100 μg TMV per ml geïnoculeerde bladeren, die op het moment van extractie grotendeels genecrotiseerd en verder geheel vergeeld waren (Fig. 3.8 f).

Infectie met de laagste virusconcentratie (0,1 μg TMV per ml) leidde bij vergelijking met met water geïnoculeerde planten tot een lichte daling in band 0,17 en een lichte stijging in de banden 0,06, 0,08 en 0,40. Van de componenten I-IV waren slechts sporen aanwezig (Fig. 3.8 b). Dezelfde veranderingen waren in sterkere mate opgetreden in de planten die geïnfecteerd waren met 1 μg TMV per ml. Tevens was in dit geval een stijging opgetreden in de banden 0,04, 0,20, 0,21, 0,24, 0,26, 0,28, 0,34 en 0,48. Band 0,40 was relatief sterk gestegen. Nieuwe componenten waren duidelijk herkenbaar (Fig. 3.8 c). Infectie met 10 μg TMV per ml leidde tot voortzetting van de beschreven veranderingen. Opvallend sterk gestegen waren de banden 0,28, 0,34, 0,40 en 0,48,

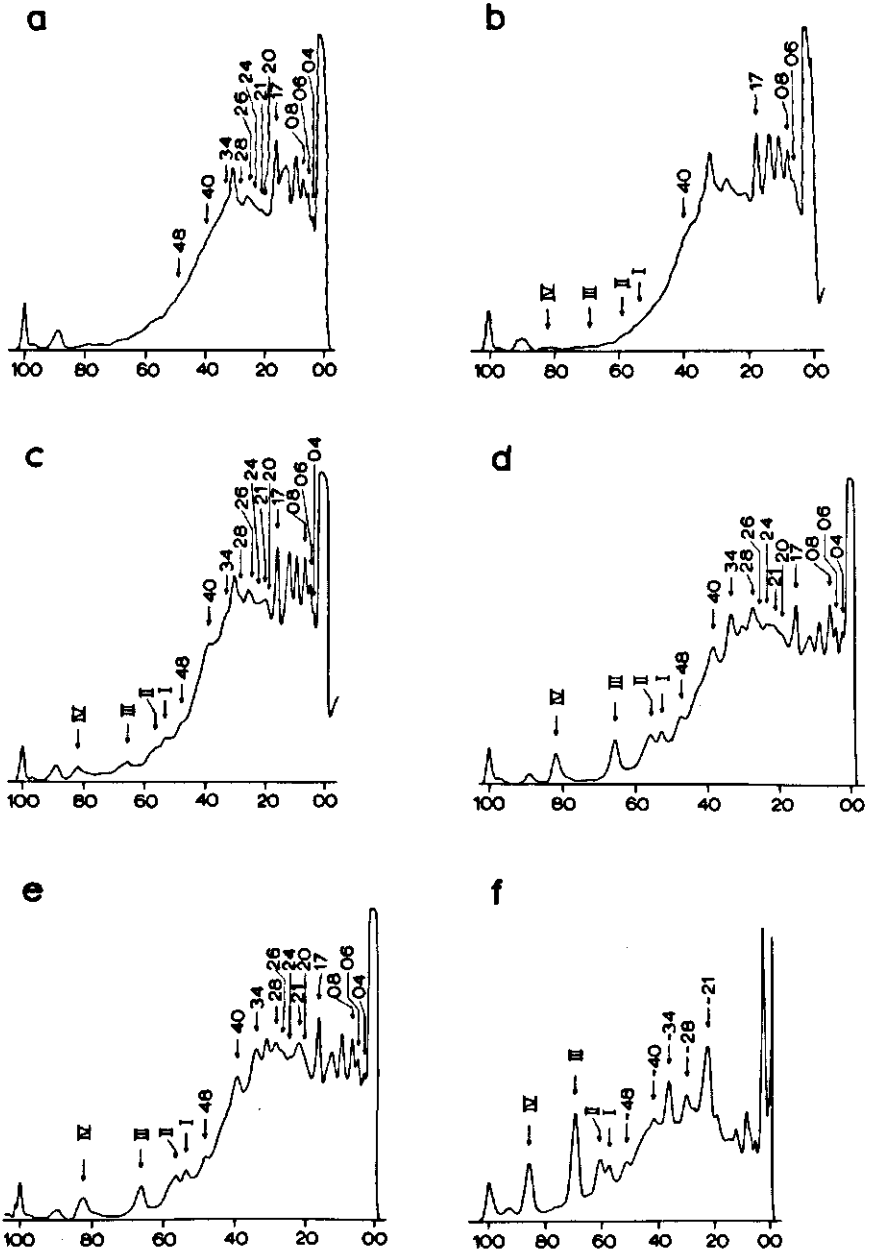


Fig. 3.8. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van tabak cv. Samsun NN, 7 (a-e) en 14 (f) dagen na inoculatie met gedem. water (a) of 0,1 (b), 1 (c), 10 (d) of 100 μ g TMV W U1 per ml (e,f) bij 20°. Elektroforese van 0,1 ml gecentrifugeerd extract vond plaats in 10% polyacrylamidegels; kleuring met amidoblack.

evenals de nieuwe componenten (Fig. 3.8 d). Nagenoeg dezelfde patronen werden verkregen bij elektroforese van extracten uit planten die geïnfecteerd waren met 100 μ g TMV per ml. Een sterke stijging werd in dit geval nog waargenomen in band 0,21 (Fig. 3.8 e). Uit 14 dagen tevoren geïnfecteerde bladeren kon slechts een relatief kleine hoeveelheid eiwit worden geëxtraheerd. Afgezien van de nieuwe componenten die hierin in aanzienlijke hoeveelheden voorhanden waren, kwamen de belangrijkste hierin aanwezige componenten overeen met de banden 0,21, 0,28, 0,34, 0,40 en 0,48 (Fig. 3.8 f). Met de voortschrijdende necrose en veroudering van de bladeren nam de hoeveelheid van de componenten die sterk geactiveerd werden na infectie, dus nog sterk toe, terwijl de hoeveelheid eiwit in alle overige banden sterk was afgenomen.

Figuur 3.6 a,b laat zien dat, afgezien van kwantitatieve veranderingen analoog aan de hierboven beschrevene, in 5% gels geen verdere verschillen werden waargenomen tussen extracten uit niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde Samsun NN planten. Een verandering in de elektroforetische mobiliteit van de voornaamste band 0,21-0,28 – welke correspondeert met de voornaamste band 0,33-0,42 in Fig. 3.3 a – werd niet waargenomen na infectie. Geen van de voor met TMV geïnfecteerde Samsun NN planten karakteristieke nieuwe banden I-IV is te zien in Fig. 3.6 b. De opmerkelijke stijging in de hoeveelheid eiwit in het gebied 0,84-0,98 laat echter vermoeden dat de nieuwe eiwitcomponenten samen met hier aanwezige eiwitten migreerden wanneer extracten van met TMV geïnfecteerde Samsun NN planten werden onderworpen aan elektroforese in 5% gels.

Op grond van co-elektroforese van A-proteïne met extracten uit niet-geïnfecteerde Samsun NN planten in 7,5% gels, werd de positie van TMV-manteleiwit onder deze omstandigheden bepaald op 0,29. Bij deze R_f waarde werd geen nieuwe band gevonden in geïnfecteerde planten en ook werden geen precipitatielijnen waargenomen wanneer gelhelften in de dubbele diffusietest getoetst werden op de aanwezigheid van TMV-manteleiwit. Alleen wanneer geconcentreerde eiwitextracten aan elektroforese werden onderworpen, werden zwakke precipitatielijnen rondom deze positie op de gels verkregen (Fig. 3.4 c). Er schijnt dus slechts een zeer kleine hoeveelheid vrij TMV-manteleiwit aanwezig te zijn in geïnfecteerde Samsun NN planten. Voorts blijkt hieruit dat de vier banden die na infectie verschijnen, geen relatie bezitten tot TMV-manteleiwit.

3.6. Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun NN na infectie met TMV W U1 bij 30°

In tegenstelling tot bij 20° ontstaan na infectie van tabak cv. Samsun NN met TMV W U1 bij 30° systemische mozaïeksymptomen, evenals op de variëteit Samsun: door verhoging van de temperatuur wordt de expressie van de aanwezige NN genen teniet gedaan. In hetzelfde experiment waarin Samsun planten werden geïnoculeerd bij 30° (vgl. 3.3) werden ook Samsun NN planten aan dezelfde behandeling onderworpen. Zowel de symptoomontwikkeling als de elektroforesepatronen van S III in 5, 7,5 en 10% polyacrylamidegels waren volledig vergelijkbaar met die van Samsun planten. In 5% gels werd in ge-

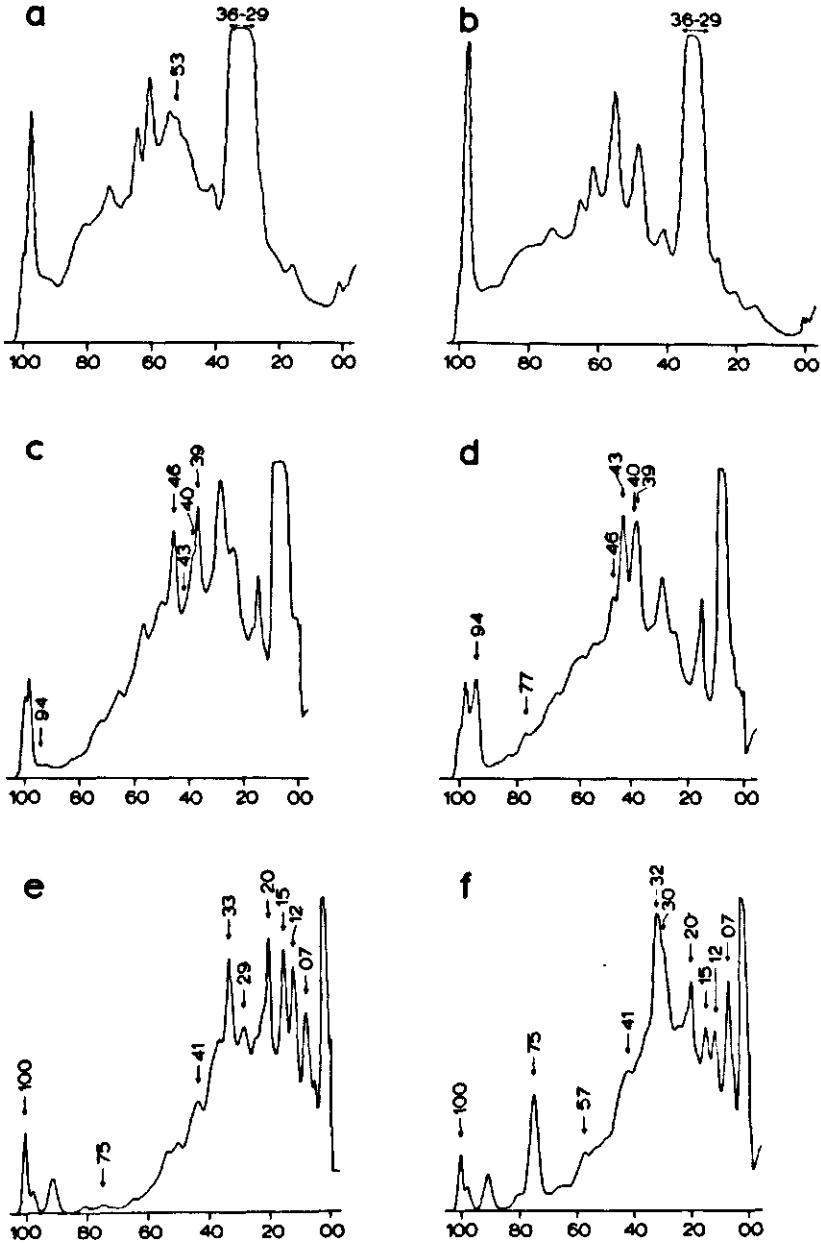


Fig. 3.9. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van *N. glutinosa*, 7 dagen na inoculatie met gedem. water (a,c,e) of 100 µg TMV W U I per ml (b,d,f) bij 20°. Elektroforese van 0,1 ml gecentrifugeerd extract vond plaats in 5 (a,b), 7,5 (c,d) en 10% (e,f) polyacrylamidegels; kleuring met amidoblack.

infecteerde Samsun NN planten een zeer opvallende TMV-eiwitband waargenomen bij R_f 0,43, terwijl de mobiliteit van de voornaamste eiwitband ten opzichte van gezond materiaal was gedaald van R_f 0,30-0,38 naar 0,29-0,33, waarbij een band 0,36 zichtbaar geworden was. In 7,5 en 10% gels werd eveneens de TMV-eiwitband waargenomen, en wel bij R_f waarden van respectievelijk 0,30 en 0,22. Behalve TMV-eiwit werden geen nieuwe componenten waargenomen in 10% gels (Fig. 3.5 e,f).

Onder condities waarbij systemische mozaïeksymptomen ontstaan, worden klaarblijkelijk dezelfde veranderingen in oplosbare eiwitten geïnduceerd in Samsun NN als in Samsun planten. Wanneer de variëteit Samsun NN echter bij 20⁰ met lokale vlekken reageert, treden andere veranderingen in de eiwitpatronen op. De waargenomen veranderingen schijnen derhalve symptoomspecifiek; zij zijn gecompliceerder in het geval dat Samsun NN planten met lokale vlekken reageren, dan wanneer systemische mozaïeksymptomen optreden. Het lijkt niet waarschijnlijk dat de vier nieuwe eiwitcomponenten in met TMV geïnfecteerde Samsun NN planten virusspecifieke functies vertegenwoordigen, omdat zij niet gevonden werden in geïnfecteerde Samsun planten, waarin het virus zich juist sterk vermeerdert. Het lijkt daarom aannemelijk dat deze componenten afkomstig zijn van de waardplant, en gevormd worden als reactie op de infectie met het virus, evenals alle overige beschreven veranderingen met uitzondering van het verschijnen van TMV-mantel-eiwit, waardplanteffecten zijn.

3.7. Veranderingen in eiwitpatronen van *N. glutinosa* na infectie met TMV W U1 bij 20⁰

Daar vier nieuwe eiwitten werden gesignaleerd in bij 20⁰ met TMV geïnfecteerde Samsun NN planten en deze componenten niet aanwezig waren in met TMV geïnfecteerde Samsun planten, leek het mogelijk dat één van deze eiwitten het produkt vormt van de NN genen, c.q. één of meer van deze eiwitten produkten zijn van genen die gelegen zijn op de Hg chromosomen. In dat geval zou men verwachten dat hetzelfde eiwit aanwezig is in met TMV geïnfecteerde *N. glutinosa* planten bij 20⁰.

Bij 20⁰ ontstaan op *N. glutinosa* na infectie met TMV U1 dezelfde symptomen als op Samsun NN planten. De gevormde lokale vlekken waren echter dikwijls wat hoekiger dan op laatstgenoemde variëteit, terwijl het geen uitzondering was wanneer de vlekken zwartachtig gepigmenteerd waren. Evenals bij de variëteit Samsun NN traden bij overgang van 20 naar 30⁰ systemische mozaïeksymptomen op in de jonge bladeren.

Figuur 3.9 e,f geeft de patronen weer die verkregen werden wanneer gelijke volumina (0,1 ml) van gecentrifugeerde extracten uit niet-geïnfecteerde en met TMV geïnfecteerde *N. glutinosa* bladeren werden onderworpen aan elektroforese in 10% gels. De eiwitbanden 0,07 en 0,41 waren aanzienlijk intenser in geïnfecteerde planten dan in niet-geïnfecteerd materiaal, terwijl de banden 0,12, 0,15, 0,20 en 1,00 aanzienlijk gereduceerd waren. De hoeveelheid eiwit in de banden 0,29 en 0,33 nam ook aanzienlijk toe na infectie, maar de posities van de toppen waren enigszins gewijzigd. Bij elektroforese van extracten uit geïnfecteerde planten migreerden deze banden tot R_f 0,30, res-

pectievelijk 0,32.

In geïnfecteerde planten werd een zeer intense band gevonden bij R_f 0,75 (Fig. 3.9 f). Dit scheen een extreme kwantitatieve verandering te vertegenwoordigen, daar een zeer zwakke band met dezelfde R_f waarde werd waargenomen in extracten uit niet-geïnfecteerde planten (Fig. 3.9 e). De enige nieuwe band die in met TMV geïnfecteerde *N. glutinosa* verscheen, was niet erg intens, en had een R_f waarde van 0,57.

Een vergelijking met Fig. 3.9 c,d doet blijken dat de banden 0,29-0,30 en 0,32-0,33 in 10% gels, in feite vier banden vormden op 7,5% gels, met R_f waarden van respectievelijk 0,39, 0,40, 0,43 en 0,46. Hiervan nam band 0,40 sterk toe na infectie, terwijl band 0,46 sterk afnam. Deze kwantitatieve veranderingen vormen een verklaring waarom de posities van de banden op 10% gels enigszins verschillend waren voor niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde planten. Het is niet duidelijk of band 0,43 aanwezig was in niet-geïnfecteerde planten. Een zwakke band leek herkenbaar, maar in geïnfecteerde planten werd een zeer intense band op deze positie waargenomen. Een zeer opvallende kwantitatieve verandering bleek ook bij R_f 0,94, vergelijkbaar met die bij R_f 0,75 in 10% gels. Een nieuwe band werd waargenomen bij R_f 0,77, overeenkomend met de nieuwe band 0,57 in 10% gels.

Zoals blijkt uit Fig. 3.9 a,b, traden in 5% gels kwantitatieve veranderingen op tussen niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde planten, terwijl tevens band 0,53 was verdwenen uit het eiwitpatroon van met TMV geïnfecteerde *N. glutinosa* planten. Hoewel de hoeveelheid eiwit in de voornaamste band 0,29-0,36 verminderd was in geïnfecteerde weefsels, werd geen verandering in de elektroforetische mobiliteit als gevolg van TMV-infectie waargenomen. De banden 0,77 en 0,94 op 7,5% gels waren niet zichtbaar in Fig. 3.9 b, daar deze samen met of dicht achter de frontpiek 1,00 migreerden in 5% gels. Dit werd weerspiegeld door de sterke toename in deze band in geïnfecteerde, vergeleken met niet-geïnfecteerde planten. Evenals in met TMV geïnfecteerde Samsun NN planten werd geen nieuwe band overeenkomend met TMV-manteleiwit gevonden na infectie van *N. glutinosa*. Er kan dus slechts een zeer kleine hoeveelheid vrij TMV-manteleiwit aanwezig zijn.

De posities van de banden die kwantitatief in sterke mate verschilden in met TMV geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde *N. glutinosa*, en die van de vier nieuwe componenten welke gevonden werden in Samsun NN planten na infectie, zijn opgenomen in tabel 3.1. Door vergelijking van deze posities in 7,5 en 10% gels werd duidelijk dat de drie banden in *N. glutinosa* en in het bijzonder de nieuwe band die werd gevonden na infectie met TMV, niet identiek kunnen zijn met die welke gevonden werden in geïnfecteerde Samsun NN planten. Daar de variëteit Samsun NN en *N. glutinosa* de factor *N* gemeenschappelijk hebben, kan geen van deze componenten beschouwd worden als het produkt van deze, noch als produkt van andere op de Hg chromosomen gelegen genen.

Tabel 3.1. Posities van kwalitatieve en zeer sterke kwantitatieve veranderingen in eiwitpatronen van Samsun NN en *N. glutinosa* planten na infectie met TMV W U1 in 7,5 en 10% gels ^a

| Band nummer ^b | Samsun NN | | <i>N. glutinosa</i> | |
|--------------------------|-----------|------|---------------------|------|
| | 7,5% | 10% | 7,5% | 10% |
| | | | 0,43 | 0,31 |
| I | 0,72 | 0,55 | | |
| II | 0,75 | 0,60 | | |
| . | | | 0,77 | 0,57 |
| III | 0,82 | 0,68 | | |
| | | | 0,94 | 0,75 |
| IV | 0,99 | 0,84 | | |

^a De positie van de eiwitbanden op de gels werd uitgedrukt in de R_f waarde, waarbij de afstand die de loopkleurstof broomfenolblauw had afgelegd voor iedere gelconcentratie op 1,00 werd gesteld.

^b De nummers van de banden hebben betrekking op eiwitcomponenten die na infectie met TMV verschijnen in de variëteit Samsun NN.

3.8. Veranderingen in eiwitpatronen van tabak na infectie met TMV *vulgare*

In de onderzochte gevallen (infectie van de variëteiten Samsun en Samsun NN met TMV *vulgare* bij 20°) waren symtroomontwikkeling en elektroforesepatronen van S III volledig vergelijkbaar met de resultaten die verkregen werden na infectie met TMV W U1 (vgl. 3.2 en 3.5). De mobiliteit van het manteleiwit van TMV *vulgare* was gelijk aan die van het TMV W U1-eiwit.

3.9. Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun na infectie met TMV HR (U8) bij 20°

Vijf tot zeven dagen na infectie met TMV HR werden op Samsun tabak symptomen zichtbaar op de geïnoculeerde en de direct daarboven aanwezige bladeren. In onze experimenten verschilden de ontstane symptomen met het bladniveau. Op de onderste geïnoculeerde bladeren ontstond een groot aantal zeer kleine, necrotische stippen omgeven door geelgekleurd weefsel. De daarboven gelegen bladeren vertoonden opvallende gele, necrotische ringetjes, die met het stijgen van de bladpositie in diameter toenamen en voornamelijk in de tophelft der bladeren geconcentreerd raakten. Op jonge, niet geïnoculeerde bladeren werd een klein aantal ronde, gele vlekken waargenomen. Bij het ouder

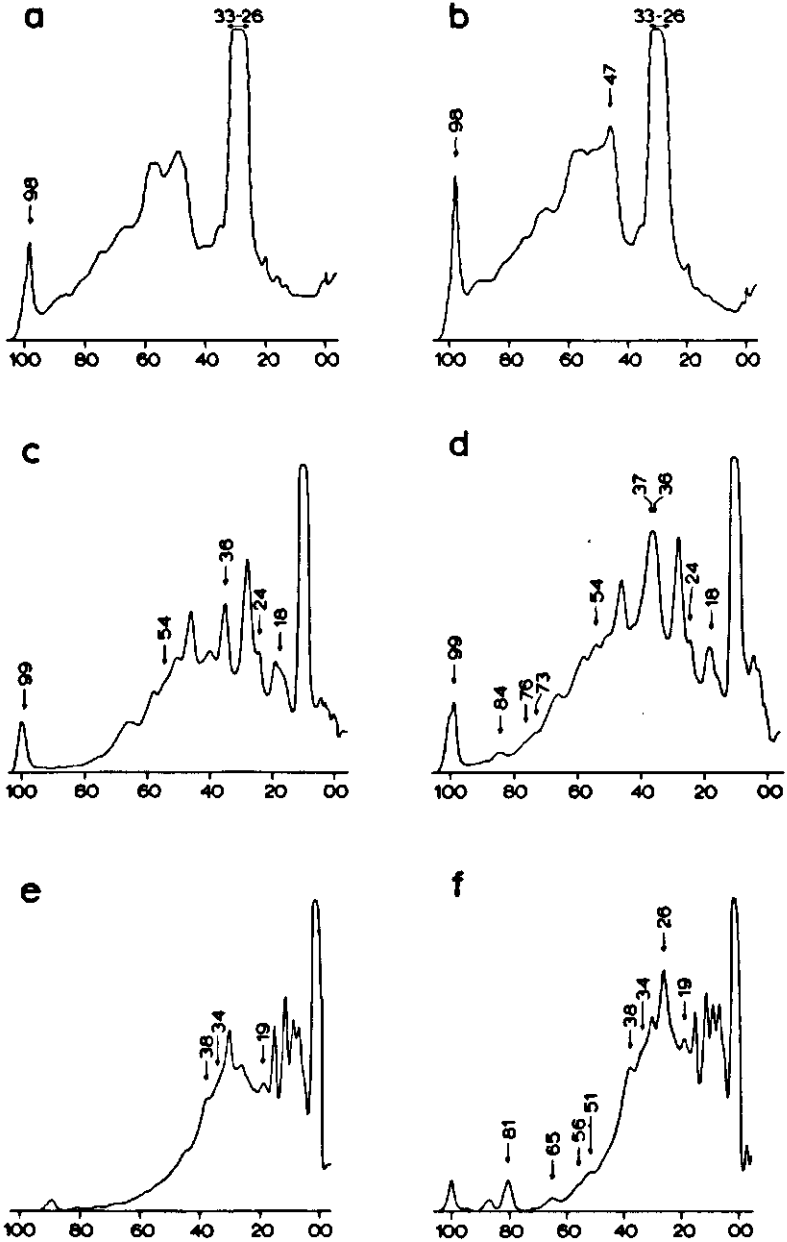


Fig. 3.10. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van tabak cv. Samsun, 14 dagen na inoculatie met gedem. water (a,c,e) of 100 µg TMV HR per ml (b,d,f) bij 20°. Elektroforese van 0,1 ml gecentrifugeerd extract vond plaats in 5 (a,b), 7,5 (c,d) en 10% (e,f) polyacrylamidegels; kleuring met amidoblack.

worden van de plant ontwikkelden zich vervolgens volledig normaal uitziende, jonge bladeren. Als gevolg van infectie trad geen reductie in de groei van de planten op.

De virusconcentratie in met TMV HR geïnfecteerde Samsun planten is veel lager dan na infectie met TMV W U1. Het is gebleken dat bij 20° alleen virus aanwezig is binnen de necrotische ringetjes (De Jong, niet gepubliceerd) en waarschijnlijk ook in de gele vlekken op de jongere bladeren. De jonge, zich enige dagen na inoculatie ontwikkelende bladeren bevatten geen virus meer. Daar het virus klaarblijkelijk niet in staat is volledig systemisch te worden, werd dit type van infectie semi-systemisch genoemd.

Figuur 3.10 geeft de patronen weer die verkegen werden wanneer 0,1 ml gecentrifugeerd extract uit niet-geïnfecteerde en 14 dagen tevoren geïnfecteerde, necrotische ringetjes vertonende, bladeren van Samsun planten werd onderworpen aan elektroforese in 5, 7,5 en 10% gels. Over het gehele patroon werd een lichte stijging in de hoeveelheid eiwit waargenomen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat vrijwel alle eiwitcomponenten in iets grotere hoeveelheid aanwezig waren in geïnfecteerde dan in niet-geïnfecteerde planten.

In 7,5% gels (Fig. 3.10 c,d) bleken de banden 0,18, 0,36, 0,54 en 0,99 relatief sterk te zijn toegenomen als gevolg van infectie. De toename van band 0,36 bleek gepaard te gaan met een verdubbeling als gevolg van de aanwezigheid van een nieuwe band bij R_f 0,37. Deze positie was identiek met die van het gezuiverde manteleiwit van TMV HR, en co-elektroforese en serologie bevestigden de identiteit van deze band. Opvallend was dat wanneer planten onder kasomstandigheden werden opgekweekt en geïnoculeerd, een aanzienlijk kleinere hoeveelheid vrij TMV HR-manteleiwit werd gevonden, terwijl bovendien een relatieve daling was opgetreden in band 0,24.

Nieuwe componenten in tamelijk lage concentratie werden waargenomen bij R_f 0,73, 0,76 en 0,84. Deze componenten leken volledig overeen te komen met die welke gevonden werden in met TMV W U1 geïnfecteerde Samsun NN planten. De stijging in band 0,99 liet vermoeden dat ook een vierde component aanwezig zou zijn. Dit werd bevestigd in 10% gels (Fig. 3.10 e,f), waarin vier nieuwe componenten werden waargenomen met R_f waarden 0,51, 0,56, 0,65 en 0,81. In dit experiment waren de R_f waarden van alle banden iets lager dan gewoonlijk, zodat het aannemelijk lijkt dat de waargenomen vier nieuwe componenten identiek zijn met die welke ontstaan in de variëteit Samsun NN na infectie met TMV W U1 bij 20°. De opvallende band 0,26 in geïnfecteerde Samsun planten werd geïdentificeerd als TMV HR-manteleiwit. Van de kwantitatieve verschillen tussen niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde planten was een stijging in de banden 0,19, 0,34 en 0,38 het opvallendst. De overige verschillen waren betrekkelijk gering. Zij kunnen grotendeels analoog geacht worden aan die welke werden waargenomen in 7,5% gels.

In 5% gels (Fig. 3.10 a,b) migreerde TMV HR-eiwit tot R_f 0,47, waar het praktisch samenviel met ook in niet-geïnfecteerde bladeren aanwezige eiwitbanden. Een reductie in de elektroforetische mobiliteit van de voornaamste eiwitband 0,26-0,33 werd niet waargenomen. De hogere intensiteit van band 0,98 in geïnfecteerde Samsun planten weer spiegelt waarschijnlijk de aanwezigheid van de nieuwe eiwitcomponenten.

Veranderingen in de eiwitpatronen na infectie bij 30° werden niet onderzocht. Bij deze temperatuur weken de symptomen af van die bij 20°. Er traden in het geheel geen symptomen van necrose op, doch er ontstonden vrijwel ronde, zwak gele vlekken op de bladeren. Vier weken na infectie kon uit de jonge topbladeren een grote hoeveelheid TMV HR worden geëxtraheerd. Klaarblijkelijk is Samsun tabak in staat de verspreiding van TMV HR te beperken bij 20°, maar niet bij 30°.

Afgezien van de aanwezigheid van TMV HR-manteleiwit, vertoonden de eiwitpatronen van bij 20° met TMV HR geïnfecteerde Samsun planten een grote overeenkomst met die van bij 20° met TMV W U1 geïnfecteerde Samsun NN planten. Daarentegen waren de symptomen in beide gevallen sterk verschillend, hoewel zowel in het ene als het andere geval necrose optrad. De waargenomen veranderingen ten opzichte van niet-geïnfecteerd materiaal zouden dus gecorreleerd kunnen zijn met het optreden van necrose. Daar de vier nieuwe componenten ook in de variëteit Samsun bleken te kunnen ontstaan als gevolg van infectie, maar na infectie met een andere virusstam, is het wederom aannemelijk dat het waardplantcomponenten zijn. Dat één of meer van de vier componenten geen produkt vormen van de *NN* genen, of van genen op de Hg chromosomen, is hiermee bewezen.

3.10. Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun EN na infectie met TMV HR (U8) bij 20°

Infectie van Samsun EN tabak met TMV HR deed na 3-4 dagen een tamelijk groot aantal, door een opvallende gele hof omgeven, kleine, necrotische vlekjes ontstaan op de geïnoculeerde bladeren.

Bij elektroforese van 0,1 ml van S III uit niet-geïnfecteerde en 7 dagen tevoren geïnfecteerde planten in 5, 7,5 en 10% gels, bleken in 5% gels noch kwalitatieve, noch kwantitatieve verschillen te onderscheiden. In 7,5% gels werden als verschil in geïnfecteerd materiaal slechts sporen van banden waargenomen die zouden kunnen overeenkomen met de componenten I, II en III in geïnfecteerde Samsun planten. Tevens was band 0,98 duidelijk verhoogd. Een nieuwe component IV was duidelijk zichtbaar bij elektroforese van het extract uit geïnfecteerde planten in 10% gels; de aanwezigheid van de overige nieuwe componenten bij deze gelconcentratie kon niet onomstotelijk worden vastgesteld. Kwantitatieve verschillen tussen niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde Samsun EN planten in de overige banden werden ook in 10% gels niet waargenomen.

Wanneer bij 20° met TMV HR geïnfecteerde Samsun EN planten gedurende 14 dagen bij 30° geplaatst werden, bleven de jonge, zich ontwikkelende bladeren symptomeloos en was het niet mogelijk hieruit virus te extraheren. In tegenstelling tot de andere onderzochte combinaties is hier dus sprake van een absolute beperking van de verspreiding van het virus in de plant.

3.11. Veranderingen in eiwitpatronen van tabak cv. Samsun NN na infectie met TMV HR (U8) bij 20°

Infectie van zeer jonge Samsun NN planten met TMV HR doet onder kasomstandigheden zeer kleine lokale vlekken ontstaan op de geïnoculeerde bladeren. Bij infectie van planten van in onze experimenten gebruikelijke ouderdom ontstond onder deze omstandigheden slechts een groot aantal uiterst kleine, witte stippen op de jongste geïnoculeerde bladeren, terwijl in de plantengroei-kamer in het geheel geen symptomen verschenen. Na 7 dagen was uit deze planten geen virus te extraheren. Elektroforese van 0,1 ml van S III en vergelijking van de patronen in 5, 7,5 en 10% gels toonde geen enkel wezenlijk verschil tussen niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde planten. Daar het virus zich in deze variëteit onder de gegeven omstandigheden niet vermeerderde, lijkt het waarschijnlijk dat het proces van interactie tussen virus en waardplant reeds op een veel vroeger tijdstip beëindigd was. Het behoeft daarom geen verwondering te wekken dat veranderingen in eiwitpatronen 7 dagen na infectie niet konden worden waargenomen.

3.12. Symptomen van Holmes' necrotiserende stam 1952 D op tabak cv. Samsun bij 20° en 30°

Uit het voorgaande is gebleken dat in die TMV - tabak combinaties waarin symptomen van necrose optreden, gepaard gaand met een gehele of gedeeltelijke lokalisering van het virus, vier nieuwe componenten konden worden waargenomen. In met TMV HR geïnfecteerde Samsun tabak, waren deze echter slechts in lage concentratie aanwezig. Indien een causale samenhang verondersteld wordt tussen het voorkomen van de componenten en het symptoomtype, mag verwacht worden dat infectie van Samsun tabak met een TMV-stam die hierop symptomen veroorzaakt die vergelijkbaar zijn met die welke optreden in de combinatie TMV W U1 - Samsun NN, tevens aanleiding geeft tot inductie van de componenten tot een vergelijkbaar niveau. Dergelijke symptomen treden op na infectie met TMV Holmes' necrotiserende stam 1952 D (vgl. 1.3).

De concentratie van deze virusstam in tabak bleek zeer gering. Evenzo was de virulentie zeer gering in vergelijking tot de TMV W U1 stam. Daardoor was het niet mogelijk het virus in voldoende hoeveelheden en vrij van andere stammen te zuiveren. Inoculaties werden daarom uitgevoerd met perssap, dat eenmaal gecentrifugeerd was bij laag toerental. Bij infectie van Samsun tabak bij 20° ontstond een klein aantal lokale vlekken, vergelijkbaar met die welke ontstaan na infectie van Samsun NN met TMV W U1. Bij 30° ontstonden ronde, gele vlekken op de geïnoculeerde bladeren. Deze symptomen komen overeen met die welke door Jockusch (1966a) beschreven werden voor de invers temperatuursensitieve mutant Ni 2338. Deze vormen van TMV zijn klaarblijkelijk defect in de zin dat zij zich onder natuurlijke omstandigheden op tabak niet kunnen handhaven. De door deze stammen op de variëteit Samsun geïnduceerde symptomen wijzen

er echter op dat zij in staat zijn zich sterker te vermeerderen en te verspreiden bij 30° dan bij 20°. Een dergelijk verschijnsel werd ook waargenomen bij infectie met TMV HR (vgl. 3.9), en kan slechts verklaard worden indien aangenomen wordt dat ook in Samsun tabak de expressie van genetische informatie met betrekking tot het lokaliseren van bepaalde stammen van TMV door verhoging van de temperatuur teniet gedaan wordt.

Gezien de geringe intensiteit der symptomen werd geen onderzoek verricht naar veranderingen in de constitutie van de oplosbare eiwitfractie na infectie. Om de eventuele relatie tussen symptoomtype en voorkomen van nieuwe componenten nader te kunnen preciseren, werd gebruik gemaakt van andere virussen, die dezelfde symptomen veroorzaakten op de variëteiten Samsun en Samsun NN. Dit wordt in het volgende hoofdstuk beschreven.

4. VERANDERINGEN IN EIWITPATRONEN VAN TABAK CV. SAMSUN EN SAMSUN NN NA INFECTIE MET VERSCHILLENDE VIRUSSEN BIJ 20° OF NA VERSCHILLENDE BEHANDELINGEN

4.1. Keuze van de betrokken virussen

Infectie van de variëteiten Samsun en Samsun NN met andere virussen dan TMV leidt in vrijwel alle gevallen tot het ontstaan van identieke symptomen op beide variëteiten. Dit gegeven werd als uitgangspunt genomen om na te gaan

- 1) in hoeverre de waargenomen veranderingen in de eiwitpatronen van Samsun en Samsun NN tabak na infectie met TMV specifiek zijn voor dit virus;
- 2) of het ontstaan van dezelfde symptomen, na infectie met een virus, gepaard gaat met dezelfde veranderingen in de eiwitpatronen van beide variëteiten.

Enerzijds werden virussen bij het onderzoek betrokken die hetzij zwakke, hetzij zeer geprononceerde systemische mozaïeksymptomen teweegbrengen op tabak (PVX en PVY⁰, resp. QMV), anderzijds virussen die de plant hetzij lokaal, hetzij systemisch doen necrotiseren (TNV, resp. TRV en PVYⁿ). Eiwitpatronen van gecentrifugeerde extracten uit bladeren van niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde planten werden vergeleken na elektroforese in 5, 7,5 en 10% gels.

4.2. Veranderingen na infectie met PVX of PVY⁰

Ingevroren bladmateriaal dat besmet was met PVX of PVY⁰ werd ontdooid en fijngewreven in een mortier in eenzelfde volume (v/w) gedem. water onder toevoeging van 3% (w/w) secundair natriumfosfaat. De aldus verkregen homogenaten werden uitgerst door hydrofielgas en 15 min. gecentrifugeerd bij 10.000 g. De supernatant werd gebruikt voor inoculatie van Samsun en Samsun NN planten.

Op beide variëteiten ontstond na infectie met PVX een systemische, zeer zwakke, lichtgroene vlekkerigheid. Als gevolg van infectie bleven de planten iets in groei achter. Infectie van Samsun en Samsun NN tabak met PVY⁰ leidde ongeveer een week na inoculatie tot een duidelijke nerfchlorose op de bladeren. Dit symptoom was van voorbijgaande aard en maakte plaats voor een nauwelijks zichtbare, systemische, groene vlekkerigheid. Met PVX of PVY⁰ systemisch geïnfecteerde bladeren van Samsun en Samsun NN planten werden 28 dagen na inoculatie geoogst voor een vergelijking van de eiwitpatronen van gecentrifugeerde extracten.

In Fig. 4.1 zijn de patronen weergegeven die verkregen werden bij elektroforese van gelijke volumina van S III uit niet-geïnfecteerde en met PVY⁰ geïnfecteerde Samsun planten op 7,5 en 10% gels. Zij kunnen als maatgevend beschouwd worden voor de in de vier combinaties verkregen resultaten, hoewel karakteristieke verschillen optraden tussen de eiwitpatronen van planten die geïnfecteerd waren met PVX, en die welke geïnfecteerd waren met PVY⁰.

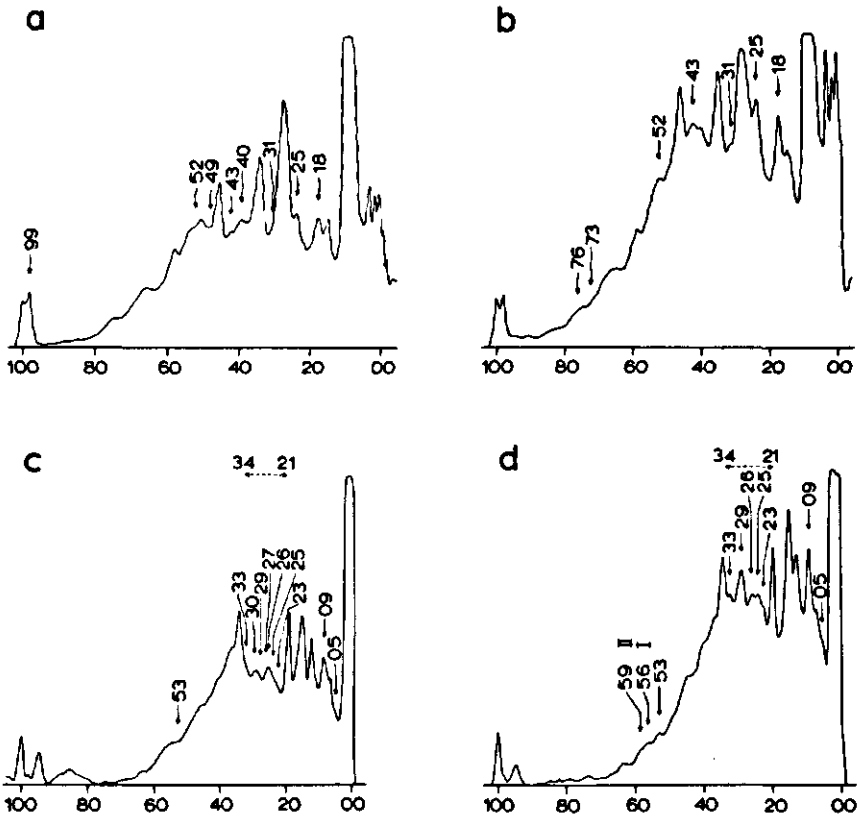


Fig. 4.1. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van tabak cv. Samsun, 28 dagen na inoculatie met een extract uit niet-geïnfecteerde (a,c) of met PVY⁰ geïnfecteerde (b, d) tabak. Elektroforese van 0,1 ml gecentrifugeerd extract vond plaats in 7,5 (a,b) en 10% (c,d) polyacrylamidegels; kleuring met amidoblack.

In 7,5% gels (Fig. 4.1 a,b) werd zowel in met PVX geïnfecteerde als met PVY⁰ besmette Samsun planten als gevolg van infectie een relatieve toename waargenomen in de banden 0,18, 0,25, 0,31, 0,43 en 0,52. In verschillende experimenten varieerde de toename in deze banden van gering tot tamelijk opvallend, terwijl na infectie met PVX soms ook een stijging optrad in band 0,49. In de variëteit Samsun NN waren dezelfde veranderingen waarneembaar als in de variëteit Samsun na infectie met één van beide virussen.

In met PVX besmette Samsun en Samsun NN planten bleken geen kwalitatieve verschillen aanwezig. Geen der nieuwe componenten I-IV werd waargenomen, ook niet bij elektroforese in 10% gels. Daarentegen bleken na elektroforese van extracten van met PVY⁰ geïnfecteerde Samsun en Samsun NN planten in 7,5% gels zwakke banden bij R_f 0,73 en 0,76 aanwezig te zijn, terwijl op deze posities geen banden werden waargenomen in

niet-geïnfecteerd materiaal. Dit leek te wijzen op de aanwezigheid van de nieuwe componenten I en II. Een band bij R_f 0,86, overeenkomend met component III, kon echter niet worden waargenomen, en ook was band 0,99 niet in intensiteit toegenomen.

Elektroforese in 10% gels (Fig. 4.1 c,d) bevestigde de aanwezigheid van de beide nieuwe componenten I en II in met PVY⁰ besmette Samsun en Samsun NN planten (de banden 0,56, respectievelijk 0,59 in Fig. 4.1 d). De componenten III en IV werden niet waargenomen. Zoals blijkt uit Fig. 4.1 d was de hoeveelheid der aanwezige componenten relatief gering. Dit was eveneens het geval na infectie van Samsun NN planten.

Bij gebruik van deze gelconcentratie kwamen de kwantitatieve verschillen, analoog aan die welke werden waargenomen in 7,5% gels, in de patronen goed tot uiting. Deze kwamen voor de combinaties PVX - Samsun, PVX - Samsun NN en PVY⁰ - Samsun NN geheel overeen met die welke zijn weergegeven in Fig. 4.1 c,d voor de combinatie PVY⁰ - Samsun. Naast een relatieve toename in de banden 0,05 en 0,09 traden aanzienlijke verschillen op in de hoeveelheden van de eiwitcomponenten in het gebied 0,21-0,34. De banden 0,23, 0,25, 0,26, 0,29 en 0,33 bleken in meerdere of mindere mate te zijn toegenomen, terwijl de banden 0,27 en 0,30 niet wezenlijk in intensiteit waren veranderd. Tevens werd een stijging waargenomen in band 0,53.

Bij elektroforese van S III in 5% gels traden aanzienlijke kwantitatieve verschillen op tussen niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde planten. In alle combinaties werd een toename geconstateerd in de banden 0,16, 0,48, 0,53, 0,66 en 0,72-0,75, en een afname in de hoeveelheid van de voornaamste eiwitband 0,32-0,38. Een reductie in de elektroforetische mobiliteit van deze band trad echter niet op. Deze veranderingen kunnen analoog geacht worden aan de reeds voor andere gelconcentraties beschrevene.

4.3. Veranderingen na infectie met CMV gele stam

Inoculum van CMV werd op dezelfde wijze verkregen als beschreven in 4.2 voor PVX en PVY⁰.

CMV gele stam veroorzaakte op Samsun planten enkele dagen na inoculatie nerfverging op de geïnoculeerde bladeren. De daaropvolgende systemisch geïnfecteerde bladeren ontwikkelden een bleekgeel-groen nerfbandmozaïekpatroon, terwijl bladeren die zich meer dan 14 dagen na inoculatie ontwikkelden een markant tussennervig mozaïek vertoonden in dezelfde kleuren, met grote, licht opbollende, groene eilanden. Vergelijken met niet-geïnfecteerde, bleven geïnfecteerde planten duidelijk in groei achter, voornamelijk als gevolg van een verkorting van de internodiën. Op Samsun NN planten ontstonden pas 10-14 dagen na inoculatie symptomen, bestaande uit een nauw begrensde, sterke vergeling van de nerven tussen zeer donkergroen tussennervig bladweefsel op de systemisch geïnfecteerde bladeren. Vier weken na inoculatie waren de symptomen wezenlijk gelijk aan die op Samsun planten, doch de kleuren van het mozaïek waren heldergeel en donkergroen en over het blad verdeeld in de vorm van een eikenbladpatroon. Hoewel bij besmetting van tabak met dit virus onder kasomstandigheden veelal een bleekgeel-donker-

groen mozaïek ontstaat met op de oudere bladeren smalle, necrotische lijntjes langs de zijnerfven, was het mozaïek op planten die in de plantengroei-kamer opgekweekt werden steeds donkerder van kleur en trad geen necrose op, tenzij een menginfectie tot stand gebracht was (vgl. 4.6). Extractie van systemisch geïnfecteerde bladeren vond plaats 28 dagen na inoculatie.

Figuur 4.2 a,b geeft de patronen weer die verkregen werden bij elektroforese van S III uit niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde Samsun planten in 7,5% gels. Hieruit blijkt dat een lichte relatieve stijging was opgetreden in de banden 0,37 en 0,63, terwijl een relatieve daling had plaatsgevonden in band 0,26. In andere experimenten werd ook een lichte stijging waargenomen in de banden 0,14, 0,17 en 0,41. Voorts waren in geïnfecteerd materiaal zwakke banden aanwezig met R_f waarden 0,72, 0,75 en 0,82 die niet herkenbaar waren in patronen van niet-geïnfecteerde planten en vergelijkbaar leken met de nieuwe componenten I, II en III. In hetzelfde gebied was eveneens een band 0,78 aanwezig. Hoewel deze positie niet leek overeen te komen met die van een duidelijke band in Fig. 4.2 a, is het niet uitgesloten dat dit verschil in feite een stijging van een in niet-geïnfecteerd materiaal aanwezige band vertegenwoordigde, daar in dit gebied steeds een aantal zwak gekleurde eiwitcomponenten voorkwam (vgl. Fig. 3.6 e). Een stijging in band 0,99, die zou kunnen wijzen op de aanwezigheid van een met de nieuwe component IV vergelijkbaar eiwit in geïnfecteerde planten, werd bij deze gelconcentratie niet waargenomen.

In Samsun NN planten werden als gevolg van infectie overeenkomstige veranderingen geïnduceerd. Deze verschilden echter in kwantitatief opzicht ten dele met de in de variëteit Samsun gesignaleerde veranderingen. Band 0,14 en vooral 0,17 waren in sterkere mate toegenomen, evenals band 0,78, terwijl daarentegen de met de componenten I, II en III vergelijkbare banden minder duidelijk herkenbaar waren, en in een enkel geval zelfs nagenoeg ontbraken. Hun aanwezigheid was echter in alle gevallen op zijn minst aanmerkelijk.

De kwantitatieve verschillen tussen de patronen in 10% gels van niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde planten waren betrekkelijk klein en geheel in overeenstemming met de voor 7,5% gels beschreven veranderingen, zoals blijkt uit Fig. 4.2 c,d voor de variëteit Samsun. Een uitzondering werd gevormd door band 0,40 waarin, vooral in de combinatie OMV - Samsun, een aanzienlijke stijging was opgetreden. Nieuwe eiwitbanden vergelijkbaar met de componenten I-IV waren duidelijk als zwakke banden aanwezig bij respectievelijk R_f 0,54, 0,57, 0,67 en 0,82 in geïnfecteerde Samsun, en als zeer zwakke banden op overeenkomstige posities in geïnfecteerde Samsun NN planten. Een zeer zwakke, respectievelijk zwakke band met R_f waarde 0,62 werd waargenomen in geïnfecteerd materiaal van beide variëteiten; deze band komt waarschijnlijk overeen met de in 7,5% gels gesignaleerde band 0,78.

Bij elektroforese in 5% gels bleken de patronen van Samsun en Samsun NN planten

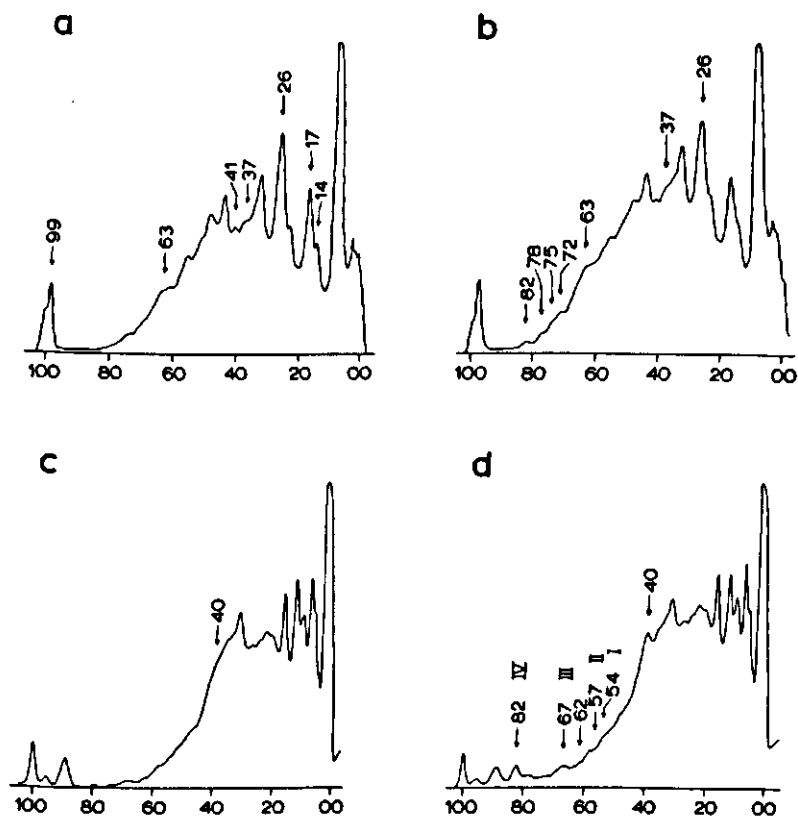


Fig. 4.2. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van tabak cv. Samsun, 28 dagen na inoculatie met een extract uit niet-geïnfecteerde (a,c) of met CMV gele stam geïnfecteerde (b,d) tabak. Elektroforese van 0,1 ml gecentrifugeerd extract vond plaats in 7,5 (a,b) en 10% (c,d) polyacrylamidegels; kleuring met amidoblack.

geheel met elkaar overeen te komen. In beide gevallen was in geïnfecteerde planten een afname opgetreden in de hoeveelheid, doch geen reductie in de elektroforetische mobiliteit van de voornaamste eiwitband. Voorts werden slechts zeer kleine kwantitatieve verschillen in de eiwitpatronen geconstateerd tussen niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde planten.

Wat de reden is dat de als gevolg van infectie met CMV in de variëteiten Samsun en Samsun NN geïnduceerde veranderingen in kwantitatief opzicht verschillen, is onduidelijk. Hoewel de symptomen op het moment van extractie niet wezenlijk verschilden, is het mogelijk dat de bovengenoemde kwantitatieve verschillen in verband staan met het verschil in symptoomontwikkeling en -expressie tussen beide variëteiten.

4.4. Veranderingen na infectie met TNV

Inoculatie van de planten geschiedde met gezuiverd TNV in een concentratie van 100 μg per ml gedem. water.

De symptomen van TNV op de variëteiten Samsun en Samsun NN lijken sterk op die van TMV W U1 op Samsun NN planten. Enkele dagen na inoculatie ontstonden op de geïnoculeerde bladeren lokale vlekken. Deze waren veelal iets groter en lichter van kleur dan door TMV veroorzaakte vlekken op de variëteit Samsun NN. Vaak werden zij omgeven door een krans van zeer kleine, witte tot roodbruine, ronde, necrotische vlekjes. Dit symptoom is karakteristiek voor infectie van tabak met TNV. Geïnoculeerde planten vertoonden geen systemische symptomen en er was geen TNV te extraheren uit jonge, niet-geïnoculeerde bladeren. Het optreden van de hypersensitieve reactie van tabak ten opzichte van TNV is niet afhankelijk van de temperatuur: bij 30° zijn de symptomen identiek aan die bij 20°.

Voor extractie werden geïnoculeerde bladeren 7 dagen na inoculatie geoogst.

Figuur 4.3 a,b geeft de patronen weer die verkregen werden bij elektroforese van S III uit met water geïnoculeerde en met lokale vlekken overdekte bladeren van Samsun planten in 7,5% gels. Hieruit blijkt dat een aanzienlijke reductie was opgetreden in de hoeveelheid eiwit van de voornaamste band 0,08, terwijl vrijwel alle andere eiwitcomponenten in grotere hoeveelheid aanwezig waren in geïnfecteerde planten. In het bijzonder was een stijging opgetreden in de banden 0,10, 0,14 en 0,17, de heterogene banden 0,36 en 0,40 en de banden 0,53, 0,58 en 0,63, terwijl band 0,24 en in mindere mate ook band 0,31 gedaald was. Nieuwe eiwitbanden, overeenkomend met de componenten I-III in met TMV W U1 geïnfecteerde Samsun NN planten, waren duidelijk waarneembaar bij R_f 0,74, 0,77 en 0,85, terwijl de sterke stijging in band 0,99 de aanwezigheid van een vierde component waarschijnlijk maakte. Identieke veranderingen waren opgetreden in Samsun NN planten als gevolg van infectie.

Bijzonder duidelijk kwamen verschillen tussen niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde planten tot uiting na elektroforese in 10% gels. Dit is weergegeven in Fig. 4.3 c,d. Naast een relatieve toename in de banden 0,06 en 0,08 en een relatieve afname in de banden 0,11, 0,14 en 0,18 trad een stijging op in de hoeveelheid van alle eiwitcomponenten in het gebied 0,20-0,32, in het bijzonder van de banden 0,21, 0,28 en 0,31. Een zeer sterke stijging was opgetreden in de componenten 0,35 en 0,41. Deze laatste band bestond uit twee dicht tegen elkaar gelegen componenten. Duidelijk blijkt uit Fig. 4.3 d de aanwezigheid van de vier nieuwe componenten I-IV met R_f waarden 0,55, 0,59, 0,68 en 0,84. In een ander experiment was in dit gebied tevens een duidelijker stijging waarneembaar van een band met R_f 0,63. Ook bij deze gelconcentratie waren de patronen van Samsun NN volledig vergelijkbaar met die van Samsun planten.

Elektroforese in 5% gel leidde tot kwantitatieve verschillen tussen niet-geïnfecteerd en met TNV besmet plantemateriaal, die analoog geacht kunnen worden aan de in 7,5% gels waargenomen veranderingen.

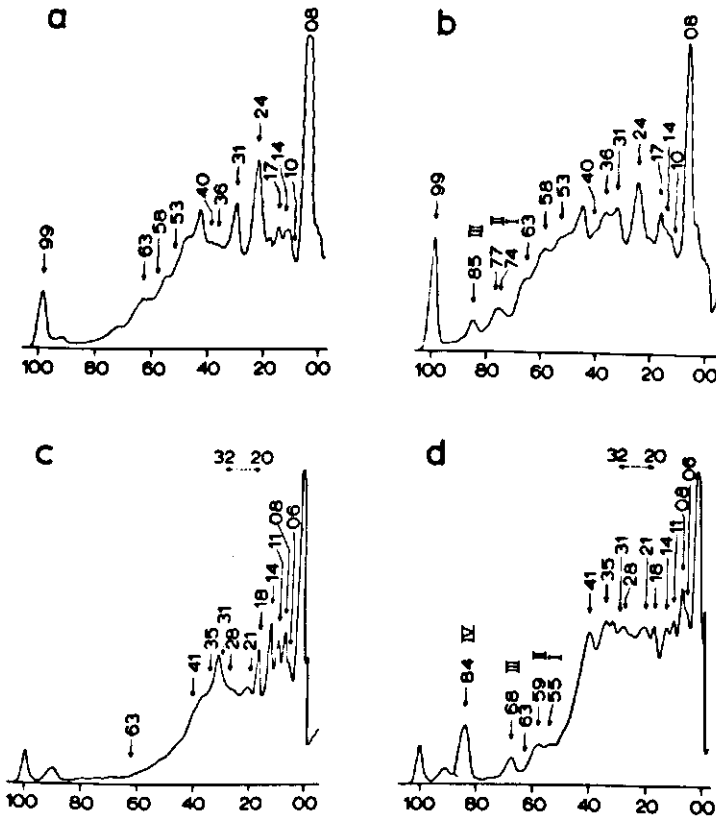


Fig. 4.3. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van tabak cv. Samsun, 7 dagen na inoculatie met gedem. water (a,c) of 100 µg TNV per ml (b,d). Elektroforese van 0,1 ml gecentrifugeerd extract vond plaats in 7,5 (a,b) en 10% (c,d) polyacrylamidegels; kleuring met amidoblack.

4.5. Veranderingen na infectie met TRV of PVYⁿ

Inoculatie van de planten met TRV geschiedde met gezuiverd virus in een concentratie van 100 µg per ml gedem. water. Inoculum van PVYⁿ werd op dezelfde wijze verkregen als beschreven in 4.2 voor PVX en PVY^o.

Na inoculatie met TRV ontstonden op geïnoculeerde bladeren van zowel Samsun als Samsun NN planten binnen enkele dagen bruine, necrotische kringetjes die geleidelijk groter werden en na het bereiken van de nerven aanleiding gaven tot nerfnecrose. Door de necrotisering van de nerven en het gedeeltelijk doorgroeien van het tussennerfbladweefsel ontstonden opbollingen van groene bladgedeelten tussen necrotische weefselgedeelten. Gedurende het zichtbaar worden van deze symptomen bleven de planten

licht achter in groei ten opzichte van met water geïnoculeerde planten. Boven de geïnoculeerde bladeren aanwezige bladeren werden systemisch geïnfecteerd. Zij vertoonden aanvankelijk necrose van de hoofdnerf, waarna deze zich geleidelijk over het gehele blad uitbreidde. Jonge, zich na inoculatie ontwikkelende bladeren vertoonden aanvankelijk een lichte nerfglazigheid en na enige tijd plaatselijk lichte nerfnecrose. Bij het ouder worden trad op den duur geleidelijk totale necrose op. Necrose trad tevens op in lengtestrepen op de stengel van de plant. Uit de symptoomloze toppen der planten was het virus in relatief grote hoeveelheden te extraheren.

In tegenstelling tot PVY^o induceert PVYⁿ op Samsun of Samsun NN tabak systemische necrose. Ongeveer een week na inoculatie trad duidelijke nerfchlorose van de bladeren op, gepaard gaand met epinastie en lichte necrose van het tussenervige weefsel. Vervolgens stierven de oudste bladeren geheel af en verspreidde de necrose zich over de systemisch geïnfecteerde, jonge, zich ontwikkelende bladeren. Tevens werd sterke groei-remming waargenomen. Planten die in een jong stadium geïnfecteerd werden stierven binnen 14 dagen geheel af. Bij infectie van oudere planten bleven zich jonge bladeren vormen en deze necrotiseerden pas in een laat stadium volledig. Tussenvormen kwamen voor waarbij alle bladeren, op de jongste na, snel afstierven, waarna zich een rozet van kleine, nieuwe bladeren ontwikkelde voordat opnieuw necrotisering optrad. Deze jonge bladeren vertoonden een opvallende lichtgroene vlekkerigheid, in een later stadium overgaand in necrotische kringetjes, waarna zij tenslotte van de top van het blad af naar de stengel toe afstierven.

Zowel in planten die geïnfecteerd waren met TRV, als in die welke besmet waren met PVYⁿ, kon het proces van voortgaande necrose van de systemisch geïnfecteerde bladeren onderbroken worden door de temperatuur te verhogen tot 30°. Hierna ontwikkelden zich volledig normale bladeren, in het geval van met PVYⁿ besmette planten aan een minder gedrongen stengel. In beide gevallen was echter infectieus virus aanwezig in alle bladeren. Na terugbrengen van de temperatuur naar 20° trad binnen enkele dagen nerfnecrose op in de tot dan symptoomloze bladeren, respectievelijk opvallende necrose van zowel de stengel als de tot dan symptoomloze bladeren.

Voor een vergelijking van de eiwitpatronen van gecentrifugeerde extracten werden 7 dagen tevoren met TRV geïnoculeerd en met necrotische kringetjes overdekt bladmateriaal, en systemisch necrotische bladeren van 28 dagen tevoren met PVYⁿ geïnoculeerde planten geogst.

De veranderingen in de eiwitpatronen van met TRV of PVYⁿ geïnfecteerde planten bij elektroforese in 5, 7,5 en 10% gel kwamen geheel overeen met die welke in 4.4 beschreven zijn voor met TNV geïnfecteerde Samsun planten. Opmerkelijk waren in met TRV geïnoculeerde planten bij elektroforese in 10% gel een relatief sterke stijging in band 0,63 en een relatief grote hoeveelheid eiwit in component IV in verhouding tot de hoeveelheden der andere nieuwe componenten. In het geval van met PVYⁿ geïnfecteerde plan-

ten waren alle verschillen tussen niet-geïnfecteerd en geïnfecteerd bladmateriaal minder markant: de gesignaleerde kwantitatieve verschillen in de diverse eiwitbanden waren minder sterk en de aanwezige hoeveelheid van de nieuwe componenten I-IV was kleiner.

4.6. Veranderingen na menginfecties

In enkele gevallen werden eiwitpatronen onderzocht van tabaksplanten die met meer dan één virus waren geïnoculeerd.

Met een mengsel van CMV en PVX geïnfecteerde Samsun MN planten vertoonden behalve de voor CMV karakteristieke, in 4.3 beschreven mozaïeksymptomen een lichtgroene vlek-kerigheid op de oudere bladeren en lichte necrose van bladgedeelten langs de nerven. Bij elektroforese van S III in 7,5 en 10% gels bleken de kwantitatieve veranderingen in de eiwitpatronen ten gevolge van deze infectie nagenoeg geheel overeen te komen met die welke bewerkstelligd werden door CMV en PVX afzonderlijk (vgl. 4.3 resp. 4.2). Een verschil was dat de nieuwe componenten in grotere hoeveelheden aanwezig waren na infectie met het mengsel van beide virussen dan in uitsluitend met CMV besmette planten. Dit suggereert dat er een verband bestaat tussen het optreden van symptomen van necrose en de hoeveelheid van de nieuwe componenten.

De veranderingen in de eiwitpatronen die ontstaan na infectie van TMV in combinatie met enerzijds een systemische mozaïeksymptomen, anderzijds een systemische necrose inducerend virus, werden bestudeerd na inoculatie van Samsun planten met een mengsel van TMV en respectievelijk CMV en PVYⁿ. Na infectie met CMV en TMV ontstonden mozaïekverschijnselen die zowel de karakteristieken van TMV (vgl. 3.2) als van CMV (vgl. 4.3) vertoonden. De jongste bladeren waren ernstig misvormd en vertoonden onregelmatige, diepgroene opbollingen langs de nerven. Ten opzichte van niet-geïnfecteerde bleven de geïnfecteerde planten zeer sterk achter in groei. In dit geval verenigden de patronen na elektroforese van S III in 5, 7,5 en 10% gel de veranderingen in zich die geïnduceerd werden door TMV (vgl. 3.2) en CMV (vgl. 4.3) alleen. Bij alle gelconcentraties was een zeer hoge piek van TMV-mantelwit aanwezig. Bij elektroforese in 5% gels was een lichte reductie opgetreden in de mobiliteit van de voornaamste eiwitband; in 7,5 en 10% gels waren nieuwe componenten in relatief lage concentratie aanwezig.

Infectie van Samsun planten met een mengsel van TMV en PVYⁿ deed een systemisch geelgroen-donkergroen mozaïek ontstaan met lichte misvormingen van de jonge bladeren. De oudere bladeren vertoonden aanvankelijk lokale necrose; later vergeelden en necrotiseerden zij geheel. Geïnfecteerde planten bleven zeer sterk achter in groei ten opzichte van niet-geïnfecteerde. Als in de andere gevallen ontstonden bij elektroforese van S III in 5, 7,5 en 10% gels patronen die ten opzichte van niet-geïnfecteerd materiaal zowel de veranderingen vertoonden die geïnduceerd werden door TMV (vgl. 3.2), als door PVYⁿ (vgl. 4.5).

4.7. Veranderingen na bespuiting met kwikchloride

Om na te gaan of vergelijkbare kwantitatieve en kwalitatieve veranderingen optreden in de eiwitpatronen van tabaksbladeren wanneer hierop symptomen van necrose geïnduceerd worden door een virusinfectie of langs kunstmatige weg, werden planten bespoten met een oplossing van 0,1% HgCl_2 . Ter controle werden planten bespoten met water. Drie uur later werden de bladeren met kraanwater afgespoeld om een te heftige reactie te voorkomen.

Reeds na een dag vertoonden de oudste bladeren kleine, witte lokale vlekjes die zich later uitbreidden tot onregelmatige, witte necrotische plekken. Op de jonge bladeren waren donkere, ingezonken vlekjes te zien, overgaand in witte tot lichtbruine necrotische ringetjes, vooral in de toppen der bladeren. Deze bladeren vertoonden tevens een lichtgroene-gele vlekkerigheid. Bladmateriaal met beide soorten symptomen werd 7 dagen na bespuiting geogst voor extractie.

Figuur 4.4 a,b geeft de patronen weer die verkregen werden bij elektroforese in 7,5% gels van S III uit met water en met HgCl_2 bespoten Samsun NN planten. Meer eiwit was geëxtraheerd uit de necrotische dan uit de met water bespoten planten. Het meest opvallend was een zeer sterke toename in intensiteit van alle banden in het gebied 0,00-0,09 in met HgCl_2 bespoten planten. Individuele banden, overeenkomend met die in met water bespoten planten, waren goed herkenbaar. Het leek daarom niet waarschijnlijk dat deze stijging alleen het gevolg zou zijn van aggregatieverschijnselen. Een meer dan evenredige stijging was voorts opgetreden in de banden 0,13, 0,15, 0,21 en 0,39. Een lichte daling werd waargenomen in de banden 0,49 en 0,55. Bij elektroforese in 10% gels traden analoge kwantitatieve verschillen op, waarbij stijgingen in de banden

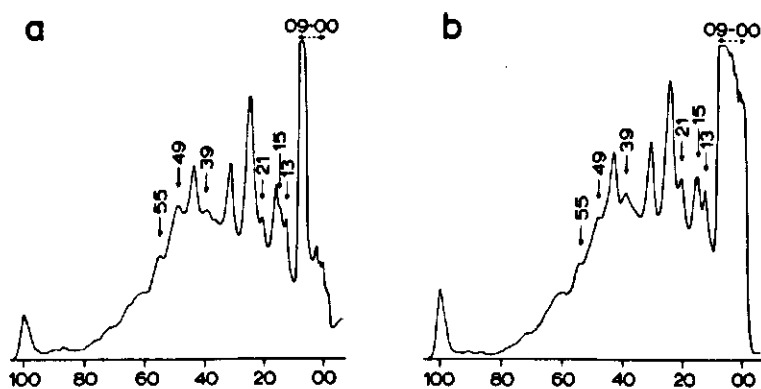


Fig. 4.4. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van tabak cv. Samsun NN, 7 dagen na bespuiting met gedem. water (a) of 0,1% HgCl_2 (b). Elektroforese van 0,1 ml gecentrifugeerd extract vond plaats in 7,5% polyacrylamidegels; kleuring met amidoblack.

0,21 en 0,30 het meest opvielen. Nieuwe componenten werden noch in 7,5% gels, noch in 10% gels waargenomen. In Samsun tabak werden dezelfde veranderingen geïnduceerd als gevolg van bespuiting met HgCl_2 als in de variëteit Samsun NN.

4.8. Veranderingen na afsnijden of bevriezen van de bladeren

De kwantitatieve en kwalitatieve veranderingen in de oplosbare eiwitfractie die door virusinfecties in tabak geïnduceerd worden, kunnen, behalve door *de novo* synthese, veroorzaakt worden door het vrijkomen van gebonden eiwitten of van eiwitten uit celorganellen; selectieve afbraak van bepaalde eiwitten kan een versnelde veroudering van de bladeren weerspiegelen.

Versnelde veroudering kan geïnduceerd worden door bladeren af te snijden. Beschadiging van celorganellen kan tot stand gebracht worden door bevriezing van de bladeren. Nagegaan werd in welke mate overeenkomstige veranderingen in eiwitpatronen optreden na virusinfecties en na deze behandelingen, om daarmee aanwijzingen te verkrijgen omtrent de aard van de veranderingen.

Bladeren van zowel Samsun als Samsun NN planten werden aan elk van beide behandelingen onderworpen. Afgesneden bladeren werden gedurende 4 dagen in petrischalen op vochtig filtreerpapier bewaard onder de in 2.1 beschreven omstandigheden. Bevriezing van bladeren vond plaats na wegnippen van de middennerf. De bladeren werden gedurende een week bij -20° bewaard en vervolgens bij $4-8^\circ$ ontdooid. Na extractie werden de eiwitpatronen van S III geanalyseerd.

De eiwitpatronen van afgesneden bladeren vertoonden slechts kleine kwantitatieve verschillen ten opzichte van die van niet afgesneden bladeren. Zoals blijkt uit Fig. 4.5 a,b werd bij elektroforese van S III uit Samsun NN planten in 7,5% gels een lichte stijging waargenomen in de banden 0,18, 0,24, 0,32 en de heterogene banden 0,41 en 0,44. Een daling was opgetreden in band 0,36. Figuur 4.5 d,e laat zien dat bij elektroforese in 10% gels analoge verschillen optraden. Opvallend was bij deze gelconcentratie een stijging in de banden 0,06, 0,08, 0,10, 0,23, 0,25 en 0,42. Tevens werd een lichte toename geconstateerd in de banden 0,31 en 0,34. Nieuwe componenten werden niet waargenomen. Dezelfde veranderingen waren opgetreden in bladeren van Samsun planten als gevolg van het afsnijden.

Figuur 4.5 c geeft het patroon weer dat ontstond bij elektroforese in 7,5% gels van S III van bevroren bladmateriaal van Samsun NN planten. Vrijwel alle banden in het gebied 0,00-0,50 waren sterk tot zeer sterk gedaald als gevolg van bevriezing. Geen daling was opgetreden in de banden in het gebied 0,50-1,00. Een stijging was evenwel opgetreden in banden met R_f waarden 0,32, 0,42, 0,45 en 0,52. Analoge resultaten werden verkregen bij elektroforese in 10% gels (Fig. 4.5 f). In vergelijking met niet bevroren materiaal (Fig. 4.5 d) viel vooral een stijging op in de banden 0,06, 0,26, 0,31, 0,38 en 0,42. Nieuwe componenten werden niet waargenomen. Dezelfde veranderingen waren geïnduceerd in bladeren van Samsun planten als gevolg van bevriezing.

4.9. Vergelijking van de kwantitatieve veranderingen na virusinfecties en na behandelingen

Een overzicht van de kwantitatieve veranderingen in de eiwitpatronen van Samsun en Samsun NN planten na infectie met verschillende virussen of na verschillende behandelingen is weergegeven in tabel 4.1. Door de onvermijdelijke variatie tussen verschillende experimenten varieerde de R_f waarde van overeenkomstige banden soms aanzienlijk. Het beeld dat de patronen opleverden was echter in alle experimenten goed vergelijkbaar, zodat de identiteit van iedere band afzonderlijk op grond van zijn positie ten opzichte van de andere banden met voldoende betrouwbaarheid kon worden vastgesteld. Verschillende R_f waarden die bij verschillende experimenten betrekking hadden op een overeenkomstige band zijn daarom in dezelfde kolom geplaatst. De desbetreffende band is aangeduid met het in Fig. 3.2 aan de betrokken band toegekende nummer.

Zoals blijkt was in geen enkel geval een bepaald kwantitatief verschil tussen niet-geïnfecteerde en met een bepaald virus besmette tabak karakteristiek voor de betrokken combinatie. Vrijwel algemeen na virusinfectie was een meer of minder sterke daling in de hoeveelheid eiwit in de voornaamste band 12. Zoals reeds in 3.2 werd opgemerkt, bestaat deze band waarschijnlijk uit „fraction I protein“. Zowel mozaïekverschijnselen als necrose onttrekken weefsel aan het fotosynthese-apparaat, waardoor een vermindering van het voor CO_2 -fixatie benodigde enzym voor de hand ligt. Opvallend is dat na bespuiting met kwikchloride een toename werd geconstateerd, hoewel ook in dat geval necrose optrad.

In alle combinaties werd een toename waargenomen in band 17. Daar ook in afgesneden bladeren een stijging in deze band optrad, lijkt deze verandering van algemene aard en verband te houden met geïnduceerde-veroudering. In bijna alle combinaties trad een daling op van band 22. Dit is klaarblijkelijk eveneens een algemene reactie. Echter traden noch een stijging in band 17, noch een daling in band 22 op na behandeling met HgCl_2 , zodat voor de inductie van deze veranderingen waarschijnlijk infectie door een virus noodzakelijk is. Nagenoeg algemeen was voorts een stijging in de banden 15, 27, 28, 30, 32 en 37, hoewel in sommige combinaties geen verandering of in een enkel geval zelfs een daling in één of meer van deze banden werd waargenomen. Al deze banden namen ook toe in afgesneden bladeren; de banden 15, 28, 30 en 37 eveneens na bevroering. Ook deze veranderingen lijken daarom te wijzen op een verouderingsreactie, waarbij de banden 15, 28, 30 en 37 waarschijnlijk vrijkomen uit celorganellen of membraansystemen. Dit laatste lijkt typisch het geval te zijn met band 34. Deze band nam toe in alle combinaties waarin door virusinfectie geïnduceerde necrose optrad, en bovendien na infectie met PVX en PVY^O; daarentegen werd een daling van deze band waargenomen na bespuiting met HgCl_2 , en dit was eveneens het geval met band 37, zodat kunstmatige necrose zich hierin duidelijk onderscheidt van door virusinfecties teweeggebrachte veranderingen (vgl. ook band 20).

Een stijging in band 20 kwam voor in de combinaties waarin systemische vlekkerig-

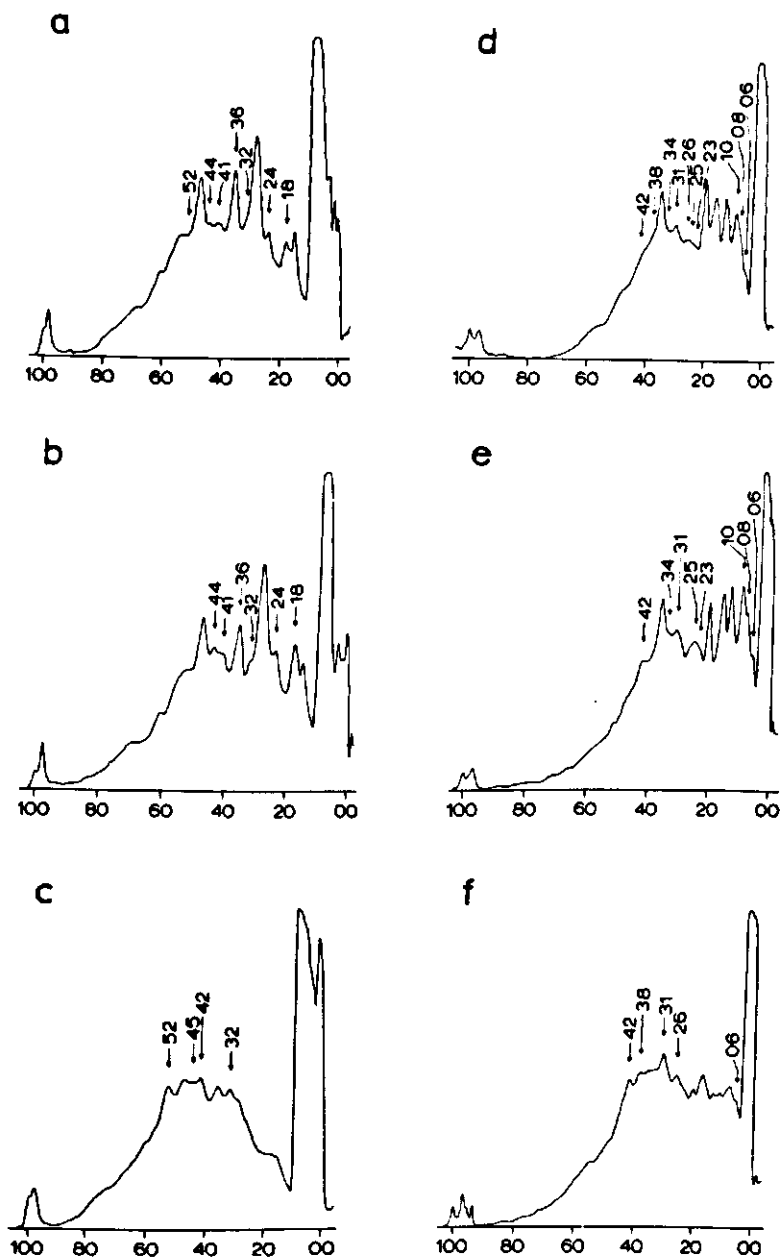


Fig. 4.5. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van normaal (a,d), 4 dagen tevoren afgesneden (b,e) en bevroren (c,f) bladmateriaal van tabak cv. Samsun NN. Elektroforese van 0,1 ml gecentrifugeerd extract vond plaats in 7,5 (a-c) en 10% (d-f) polyacrylamidegels; kleuring met amidoblack.

Tabel 4.1. Overzicht van de kwantitatieve veranderingen in de eiwitpatronen op 7,5 verschillende behandelingen

| Combinatie virus - waardplant | Gel conc. | | | | | | | Band |
|------------------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 12 | 14 | 15 | 16 | 17 | 20 | 22 |
| PVX/PVY ^o - | 7,5 | (+) | | | | | 0,18† | 0,25† |
| Samsun/Samsun NN | 10 | | 0,05† | | | | 0,09† | |
| TMV W U1 - | 7,5 | 0,11† | | 0,15† | | 0,19† | | 0,29† |
| Samsun | 10 | | | 0,08† | | 0,09† | | |
| OMV gele stam - | 7,5 | (+) | | 0,14† | | 0,17† | | 0,26† |
| Samsun/Samsun NN | 10 | | | | | | | |
| TMV HR - | 7,5 | | | | 0,18† | | 0,24† | |
| Samsun | 10 | | | | † | | † | |
| TMV W U1 - | 7,5 | (+) | | | | 0,13† | | 0,23† |
| Samsun NN | 10 | | 0,04† | 0,06† | | † | 0,08† | † |
| TNV/TRV/PVY ⁿ - | 7,5 | 0,08† | 0,10† | | 0,14† | 0,17† | | 0,24† |
| Samsun/Samsun NN | 10 | | | 0,06† | | 0,08† | 0,11† | 0,14† |
| Behandelingen | | | | | | | | |
| bespuiting met HgCl ₂ - | 7,5 | 0,09† | | 0,13† | 0,15† | | | 0,21† |
| Samsun/Samsun NN | 10 | | | | | | | |
| afgesneden bladeren | 7,5 | | | | | 0,18† | | 0,24† |
| Samsun/Samsun NN | 10 | | | 0,06† | 0,08† | 0,10† | | |
| bevroren bladmateriaal | 7,5 | | | | | | | |
| Samsun/Samsun NN | 10 | | | 0,06† | | | | |

^a Iedere kolom heeft betrekking op de in Fig. 3.2 met het desbetreffende nummer aanband in de bij de beschrijvingen van de verschillende combinaties opgenomen figuren een daling aan in de intensiteit van de band in de betrokken combinatie.

heidssymptomen optraden. Na infectie met de necrotiserende virussen TNV, TRV of PVYⁿ trad daarentegen een daling op in deze band. Het is opvallend dat bij het optreden van necrose eerder een daling dan een stijging geconstateerd werd, omdat dit laatste klaarblijkelijk een normale verouderingsreactie is. Een stijging in de hoeveelheid eiwit in band 24 werd alleen gesignaleerd na infectie met PVX of PVY^o. Deze band nam echter zowel na afsnijden als bij bevroering van bladeren duidelijk toe.

en 10% gels van Samsun en Samsun NN tabak na infectie met verschillende virussen of na

| nummer ^a | | | | | | | | | | | |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 24 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 32 | 34 | 37 | 41 | 43 | X |
| 0,31† | | | | | 0,43† | 0,49† | 0,52† | | | | |
| | 0,23† | 0,25† | 0,26† | 0,29† | 0,32† | | | | | 0,53† | |
| | | | | 0,29† | 0,32† | | | | | | |
| | | 0,37† | | | | | | | | 0,63† | 0,78† |
| | | | | | | | | 0,40† | | | 0,62† |
| | | 0,36† | | | | | | 0,54† | | | |
| | | 0,19† | | | | | 0,34† | 0,38† | | | |
| 0,30† | 0,35† | | | | 0,39† | | | 0,52† | 0,59† | | |
| 0,17† | 0,20† | 0,21† | 0,24† | 0,26† | 0,28† | 0,34† | 0,40† | 0,48† | | | |
| 0,31† | 0,36† | | | | 0,40† | | | 0,53† | 0,58† | 0,63† | |
| 0,18† | 0,21† | † | † | 0,28† | 0,31† | 0,35† | 0,41† | | | | 0,63† |
| | | | | | 0,39† | 0,49† | 0,55† | | | | |
| | 0,21† | | | | 0,30† | | | | | | |
| 0,32† | 0,36† | 0,41† | | | 0,44† | | | | | | |
| | 0,23† | 0,25† | | | 0,31† | 0,34† | | 0,42† | | | |
| 0,32† | | 0,42† | | | 0,45† | | | 0,52† | | | |
| | | 0,26† | | | 0,31† | | 0,38† | 0,42† | | | |

geduide eiwitband. De weergegeven getallen zijn de R_f waarden van de desbetreffende (3.3-4.5). Ten opzichte van niet-geïnfecteerde planten duidt † een stijging en †

Veranderingen in de banden 16, 26 en 41 traden slechts op in die combinaties waarin necrose optrad, en wel trad een stijging op in de banden 16 en 41 en een daling in band 26. De stijging in band 16 en de daling in band 26 lijken verouderingseffecten, daar dezelfde verschijnselen optraden in afgesneden bladeren. De stijging in band 41 trad noch na bespuiting van de bladeren met $HgCl_2$, noch na afsnijden of bevriezing op. Klaarblijkelijk is infectie met een virus, resulterend in necrose, noodzakelijk voor

inductie van deze verandering. Voor de stijging in de banden 14, 29 en 43 die werd waargenomen na infectie met verschillende virussen, lijkt eveneens infectie door een virus een voorwaarde te zijn. Het is niet uitgesloten dat deze veranderingen zich tijdens de latere stadia van de symptoomontwikkeling in geringe mate ook in de overige virus - waardplant combinaties voordoen, en daarmee tamelijk algemeen zijn.

Duidelijk kwantitatieve veranderingen in band X werden slechts in enkele gevallen waargenomen. De aard van deze verandering zal in 5.8.1 nader besproken worden.

Resumerend kan gesteld worden dat een belangrijk deel van de waargenomen kwantitatieve veranderingen onder uiteenlopende omstandigheden optreedt en klaarblijkelijk algemene reacties vertegenwoordigt. Daarnaast zijn enige veranderingen karakteristiek voor het symptoomtype dat na virusinfectie optreedt. Symptomen van vlekkerigheid gaan gepaard met een karakteristieke verhoging van de banden 20 en 24, die ook toenemen bij kunstmatige veroudering en, wat laatstgenoemde band betreft, bij beschadiging door bevrozing. Systemische mozaïeksymptomen zijn niet duidelijk gekenmerkt door karakteristieke veranderingen. Het optreden van kringvlekken na infectie met TMV HR gaat gepaard met veranderingen die aansluiten bij die welke teweeggebracht worden door necrotiserende virussen. Indien necrose geïnduceerd wordt neemt band 16 toe, band 26 af - deze verschijnselen treden ook op bij veroudering - en band 41 toe. Van deze veranderingen treedt alleen toename van band 16 ook op bij kunstmatige, door $HgCl_2$ geïnduceerde, necrose, terwijl het merendeel van de overige veranderingen die optreden bij door een virusinfectie geïnduceerde necrose, niet worden waargenomen na bespuiting met $HgCl_2$. Door virusinfecties en kunstmatig geïnduceerde necrose blijken zich dus in sterke mate te onderscheiden in de begeleidende veranderingen in de oplosbare eiwitfractie. Het feit dat bij afsnijden van bladeren of bevrozing slechts ten dele dezelfde veranderingen optreden als bij door virusinfectie geïnduceerde necrose, lijkt er op te wijzen dat veroudering en beschadiging slechts bijkomstige facetten vormen van de aan dit symptoomtype ten grondslag liggende metabolische veranderingen.

4.10. Vergelijking van de kwalitatieve veranderingen na virusinfecties

Een overzicht van de kwalitatieve veranderingen - met uitzondering van het optreden van vrij TMV-manteleiwit - in eiwitpatronen van Samsun en Samsun NN planten na infectie met verschillende virussen, is weergegeven in tabel 4.2. Doordat deze veranderingen steeds het beste tot uiting kwamen bij elektroforese in 10% gels, zijn de R_f waarden der banden bij deze gelconcentratie weergegeven. Indien in een bepaalde combinatie kwalitatieve veranderingen werden waargenomen, betroffen deze steeds dezelfde componenten en wel die welke in 3.5 beschreven zijn voor met TMV W U1 geïnfecteerde Samsun NN planten. Dezelfde vier componenten waren waarneembaar in alle gevallen waarin door virusinfecties geïnduceerde necrose optrad; daarentegen niet indien necrose langs kunstmatige weg tot stand gebracht was. Het voorkomen van deze componenten bleek echter niet beperkt tot combinaties waarin necrose optrad: na infectie met PVY⁰ ontston-

Tabel 4.2. Overzicht van de nieuwe componenten in de eiwitpatronen op 10% gels van Samsun en Samsun NN tabak na infectie met verschillende virussen ^a

| Combinatie virus - waardplant | Band nummer ^b | | | |
|-------------------------------------|--------------------------|------|----------------|----------------|
| | I | II | III | IV |
| TMV W U1 - Samsun NN | 0,55 | 0,60 | 0,68 | 0,84 |
| PVY ^o - Samsun/Samsun NN | 0,56 | 0,59 | - ^c | - ^c |
| CMV - Samsun/Samsun NN | 0,54 | 0,57 | 0,67 | 0,82 |
| TMV HR - Samsun | 0,52 | 0,57 | 0,65 | 0,81 |
| TNV - Samsun/Samsun NN | 0,55 | 0,59 | 0,68 | 0,84 |
| TRV - Samsun/Samsun NN | 0,56 | 0,60 | 0,69 | 0,86 |
| PVY ⁿ - Samsun/Samsun NN | 0,56 | 0,61 | 0,71 | 0,85 |

- ^a Banden die geïdentificeerd werden als vrij manteleiwit van TMV W U1 of TMV HR zijn buiten beschouwing gelaten.
- ^b De componenten zijn aangeduid volgens de in tabel 3.1 toegepaste nummering. De weergegeven getallen zijn de R_f waarden van de desbetreffende banden in elektroforesepatronen van de verschillende combinaties.
- ^c Niet aanwezig.

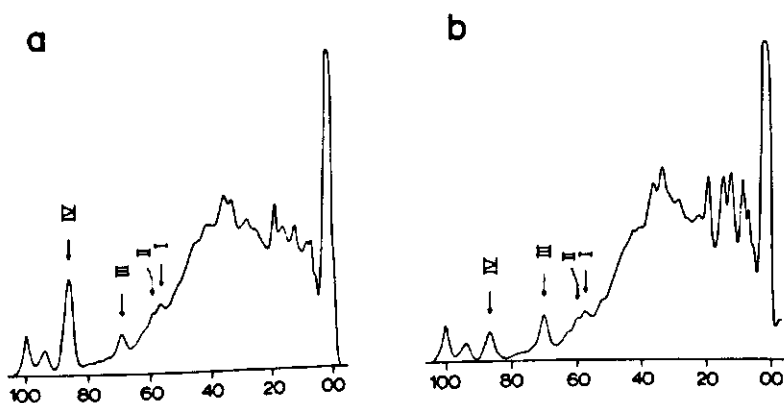


Fig. 4.6. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van tabak cv. Samsun (a) en Samsun NN (b), 7 dagen na inoculatie met 100 µg TRV per ml. Elektroforese van 0,1 ml gecentrifugeerd extract vond plaats in 10% polyacrylamidegels; kleuring met amidoblack.

den de componenten I en II, weliswaar in relatief lage concentratie; na infectie met CMV ontstonden alle vier de componenten in lage concentratie. De componenten ontstonden niet na afsnijden of door bevriezen van de bladeren. Inductie door een virusinfectie lijkt daarom noodzakelijk.

Bij vergelijking van de onderlinge verhoudingen van de pieken der nieuwe componenten in de verschillende combinaties bleek een duidelijk waardplant- en een klein virus-effect op te treden. Ontstonden de componenten in Samsun planten, dan was de intensiteit van band IV verreweg het hoogst; band III was matig sterk en de banden I en II waren weinig intens (vgl. Fig. 4.2 c,d en 4.3 c,d). In Samsun NN planten was band IV nooit hoger dan band III en band I en II waren relatief intenser dan in Samsun planten (vgl. Fig. 3.6 f). Dit verschil bleek altijd op te treden en wordt in Fig. 4.6 nog eens geïllustreerd aan patronen van eiwitten uit met TRV geïnfecteerde Samsun en Samsun NN planten. Indien gelokaliseerde necrose optrad, zoals in de variëteit Samsun NN na infectie met TMV W U1 of in beide variëteiten na infectie met TNV, was component III ten opzichte van component IV steeds hoger dan in bladeren van systemisch necrotische planten. Vergeleken met de patronen van met TMV W U1 geïnfecteerde Samsun NN planten is in Fig. 4.6 b component IV relatief hoger en component III relatief lager dan de overeenkomstige banden in Fig. 3.6 f. Ook dit effect was altijd waarneembaar.

Deze waarnemingen geven aanleiding te veronderstellen dat het optreden van de nieuwe componenten een rol speelt bij de pathogenese en een bijzondere vorm van interactie tussen waardplant en pathogeen weerspiegelt.

4.11. De mogelijkheden van het gebruik van eiwitpatronen voor de diagnostiek van virusziekten

Uit het voorafgaande blijkt dat in feite in geen enkel geval kwantitatieve en kwalitatieve verschillen in de eiwitpatronen van niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde tabak karakteristiek geacht kunnen worden voor het infecterende virus. Een uitzondering hierop trad op in de combinaties TMV W U1 - Samsun en TMV HR - Samsun, waarin een karakteristieke nieuwe band ontstond die geïdentificeerd kon worden als het mantel-eiwit van de betrokken virusstam. Daar deze stammen een mantel-eiwit bezitten dat een verschillende elektroforetische mobiliteit vertoont in polyacrylamidegel, zijn in dit ene geval zelfs infecties met verschillende stammen van eenzelfde virus te onderscheiden. In alle overige combinaties traden niet zodanig karakteristieke veranderingen op dat een uitspraak over het aanwezige virus op grond van de eiwitpatronen mogelijk is. Weliswaar is in enkele gevallen het totaal der kwantitatieve en kwalitatieve veranderingen in een bepaalde combinatie (binnen het onderzochte kader) uniek, doch hierbij zijn een groot aantal relatief kleine verschillen van belang die mogelijk ook variëren met de omstandigheden. Voor tabak lijkt daarom een methode gebaseerd op het verschil in eiwitpatronen in het algemeen niet geschikt om de aanwezigheid van een bepaald virus vast te stellen.

Dit impliceert geenszins dat met andere plantensoorten een dergelijke methode niet bruikbaar zou zijn. Anders dan in het onderzoek naar verwantschappen tussen plantensoorten (vgl. Swartz, 1967; Doekes, 1969) lijken in viruszieke planten de verschillen echter gecompliceerder, en eerder van kwantitatieve dan van kwalitatieve aard. Het is niet onwaarschijnlijk dat, zoals in tabak, de veranderingen meer bepaald worden door het symptoomtype dan door de aard van de ziekteverwekker. Een methode als die der vergelijking van eiwitpatronen zou echter juist uitsluitel moeten geven in gevallen waar identificatie op grond van de aanwezige symptomen slechts onder voorbehoud mogelijk is.

5. EIGENSCHAPPEN VAN EIWITCOMPONENTEN DIE NA INFECTIE VERSCHIJNEN

5.1. Kinetiek van de inductie van de vier nieuwe componenten in tabak cv. Samsun NN na infectie met TMV W U1

In extracten van Samsun NN tabak waren de in 3.5 beschreven nieuwe eiwitcomponenten voor het eerst duidelijk te onderscheiden 3-4 dagen na inoculatie met TMV W U1, d.w.z. aan het begin van macroscopisch zichtbare necrotische vlekvorming. Gemeten aan de oppervlakte onder de pieken in de densitometergrafieken, was band I in ongeveer gelijke hoeveelheden aanwezig 5 en 7 dagen na inoculatie. Daarentegen schenen band II, III en IV gedurende deze periode toe te nemen.

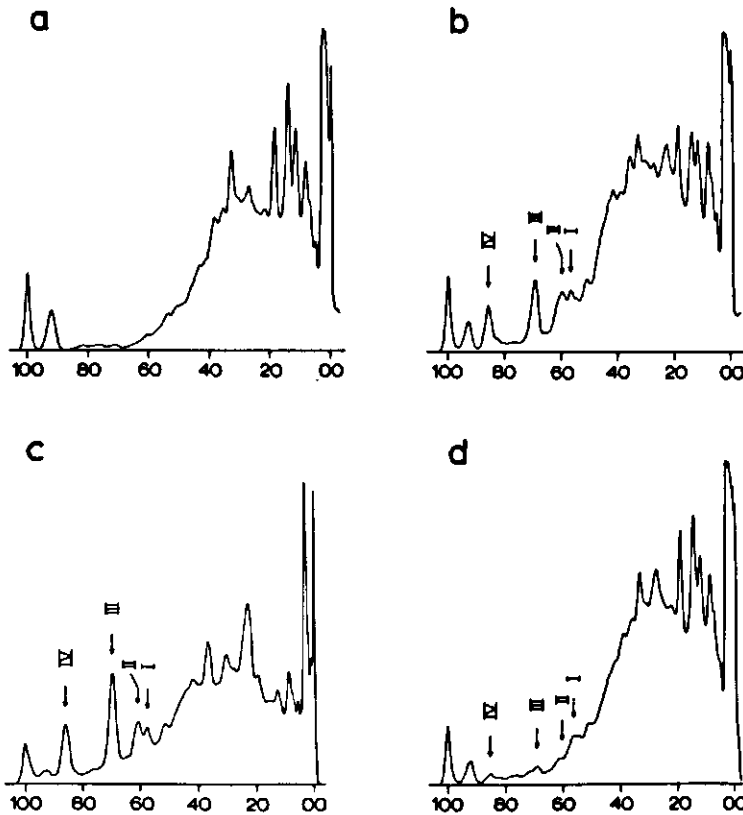


Fig. 5.1. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van tabak cv. Samsun NN, 7 dagen na inoculatie met gedem. water (a); 7 dagen na inoculatie met 100 µg TMV W U1 per ml (b); 14 dagen na inoculatie met 100 µg TMV W U1 per ml, geïnoculeerde bladeren (c) en niet geïnoculeerde, jonge, zich ontwikkelende bladeren (d). Elektroforese van 0,1 ml ge-centrifugeerd extract vond plaats in 10% polyacrylamidegels; kleuring met amidoblack.

Zoals blijkt uit Fig. 5.1 b,c, was band I in extracten van 14 dagen tevoren geïnoculeerde bladeren ternauwernood toegenomen ten opzichte van 7 dagen tevoren geïnoculeerde planten. Band II, III en IV waren echter opnieuw toegenomen, doch niet in dezelfde mate. De hoeveelheid van alle andere eiwitten was afgenomen, waarbij bepaalde banden sterker op de voorgrond traden (vgl. 3.5). Dit weerspiegelde de voortschrijdende necrose en vergeling van de bladeren (Fig. 5.1 c). Er lijkt daarom een verband te bestaan tussen de toename van de hoeveelheid weefsel die betrokken is bij het necrotiseringsproces, en de toename in de intensiteit van de nieuwe componenten, met uitzondering van band I.

Werden 7 dagen tevoren geïnoculeerde planten van 20° overgebracht naar 30°, dan werd de verdere toename van de nieuwe componenten in de geïnoculeerde bladeren geheel of gedeeltelijk onderdrukt. Na 7 dagen bij 30° bleken de hoeveelheden van band I matig, van de banden II en IV zelfs sterk te zijn afgenomen, terwijl de intensiteit van band III daarentegen nog enigszins was toegenomen. Ondanks de aanwezigheid van necrotische vlekken op deze bladeren werd dus een vermindering van de hoeveelheid van de nieuwe componenten, met uitzondering van band III, teweeggebracht door het verlies van het vermogen van de plant het virus te lokaliseren.

5.2. Invloed van de vlek Dichtheid op de hoeveelheden van de nieuwe componenten

Om het verband vast te stellen tussen de hoeveelheid van de in geïnfecteerde bladeren aanwezige nieuwe componenten en de vlek Dichtheid, werden Samsun NN planten geïnoculeerd met respectievelijk 0,1, 1, 10 en 100 µg TMV W U1 per ml. Zoals blijkt uit tabel 5.1 namen in deze reeks de aantallen vlekken evenredig toe met de hoeveelheid virus, met uitzondering van de hoogste concentratie. Na elektroforese van extracten van 7 dagen tevoren geïnoculeerde planten in 10% gels (vgl. Fig. 3.8 a-e) werden de relatieve concentraties van de vier nieuwe componenten bepaald door de oppervlakte onder de desbetreffende pieken te meten in de densitometergrafieken. De resultaten zijn weergegeven in tabel 5.1. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de nieuwe componenten in aanzienlijke mate toenemen bij toenemende vlek Dichtheid. De afname die werd waargenomen bij de hoogste virusconcentratie laat vermoeden dat de nieuwe componenten geïnduceerd worden in cellen rondom de infectiepunten, aangezien de vlek Dichtheid bij die concentratie zo hoog was dat er relatief weinig tussenliggend weefsel was overgebleven. Uit de tabel blijkt dat ook onder deze omstandigheden de onderlinge verhoudingen der banden niet constant zijn en dat de toename in band I bij toenemende vlek Dichtheid achterblijft bij die der andere banden.

5.3. Het effect van actinomycine D op de inductie van de nieuwe componenten

Uit met A'D ingespoten bladeren van niet-geïnfecteerde Samsun NN planten werd 3 dagen later gemiddeld 20% meer oplosbaar eiwit geëxtraheerd dan uit met gedem. water

Tabel 5.1. Relatieve hoeveelheden ^a van de nieuwe eiwitcomponenten geïnduceerd in Samsun NN tabak na infectie met TMV W U1, in afhankelijkheid van de virusconcentratie in het inoculum

| Virusconcentratie (µg/ml) ^b | Aantal vlekken/cm ² | Band nummer ^c | | | |
|--|--------------------------------|--------------------------|-----|-----|-----|
| | | I | II | III | IV |
| 0,1 | 0,06 | 7 | 1 | 9 | 18 |
| 1 | 0,76 | 30 | 33 | 36 | 65 |
| 10 | 7,49 | 96 | 154 | 206 | 176 |
| 100 | 10,69 | 77 | 128 | 146 | 132 |

^a Willekeurige eenheden, bepaald op grond van de oppervlakte onder de pieken in de densitometerpatronen van 10% gels en gecorrigeerd voor verschillen in eiwitgehalte van de extracten. Alle waarden zijn gemiddelden van vier metingen, verricht aan densitometergrafieken van twee verschillende runs.

^b De bladeren waren 7 dagen voor extractie geïnoculeerd met gezuiverd virus.

^c De componenten zijn aangeduid volgens de in tabel 3.1 toegepaste nummering. Hun respectievelijke R_f waarden bij de gebruikte gelconcentratie bedroegen 0,55, 0,60, 0,68 en 0,84.

ingespoten bladeren. Bij elektroforese in 7,5 en 10% gels bleken de eiwitpatronen als gevolg van inspuiting met dit antibioticum niet kwalitatief gewijzigd te zijn; kwantitatief gezien, vertoonden zij een algemene, lichte toename in de intensiteit van alle banden, terwijl bovendien een relatief verhoogde intensiteit werd waargenomen in de banden die in Fig. 3.2 zijn aangeduid met de nummers 15, 16, 17, 20, 24, 27, 28, 30, 32, 34 en 37. Deze extra toenames vertonen opvallende overeenkomst met die welke optreden bij geïnduceerde veroudering (Fig. 4.5 a-d; Tabel 4.1). Klaarblijkelijk leidt inspuiting met AMD tot een vergelijkbare toestand.

Zoals uit tabel 5.2 blijkt, werd de synthese van oplosbare eiwitten voor 56-60% geremd bij aanwezigheid van AMD. Neemt men het aantal cpm per ml S III als een maat voor de hoeveelheid beschikbaar gemerkt aminozuur, dan blijkt dat AMD een verlaging van de hoeveelheid „vrij” ¹⁴C-leucine in de oplosbare fractie teweegbracht. Dit kan wijzen op een remming van het transport van het aminozuur uit de stengels naar de bladeren. De remming van de eiwitsynthese kan daardoor in feite kleiner geweest zijn.

Uit tabel 5.3 blijkt dat de incorporatie in 3 dagen tevoren met 100 µg TMV W U1 per ml geïnoculeerde bladeren eveneens zeer sterk verminderd was ten opzichte van planten die met water waren geïnoculeerd. Dit was in het bijzonder het geval bij merken met ³⁵S-methionine. Dit staat in tegenstelling tot de waarneming van Schuster

(1969), dat ^{35}S -methionine 3 dagen na inoculatie van *N. glutinosa* met TMV in aanzienlijke hoeveelheden accumuleert in de gevormde lokale vlekken. Daar methionine thans beschouwd wordt als een precursor van ethyleen (Mapson en Wardale, 1968) en de ethyleenproductie van Samsun NN planten na inoculatie met TMV zeer sterk stijgt bij het verschijnen der symptomen (Nakagaki *et al.*, 1970), is het mogelijk dat in geïnfecteerde planten een zeer hoge „turn over“ van methionine plaatsvindt. De verlaging van de hoeveelheid „vrij“ ^{35}S -methionine in de oplosbare fractie kan in dezelfde richting wijzen.

In het experiment waarin de incorporatie van ^{14}C -leucine werd onderzocht, werd tevens een behandeling opgenomen waarin A'D werd ingespoten in de geïnoculeerde bladeren. In dat geval werd 92% remming van de incorporatie gevonden ten opzichte van niet met A'D ingespoten, geïnoculeerde bladeren. Ten aanzien van de incorporatie van ^{14}C -leucine werkten infectie met TMV en inspuiting met A'D in dezelfde richting: beide brachten een vermindering van de hoeveelheid „vrij“ ^{14}C -leucine in de oplosbare fractie teweeg en beide hadden een verlaging van de incorporatie van ^{14}C in de oplosbare eiwitten tot gevolg. Zoals blijkt uit de verkregen resultaten (Tabel 5.2 en 5.3) waren deze effecten tenminste additief. Een additief effect trad niet op waar het de hoeveelheid geëxtraheerd oplosbaar eiwit betrof: onder de gegeven omstandigheden bracht infectie met TMV gemiddeld geen verandering in de hoeveelheid eiwit teweeg, terwijl in de combinatie het effect van A'D vrijwel teniet gedaan werd. De effecten van infectie met TMV en toediening van A'D op de eiwitsynthese zijn klaarblijkelijk onafhankelijk, maar interactie treedt op tussen beide behandelingen waar het de totale hoeveelheid oplosbaar eiwit betreft.

Uit het bovenstaande blijkt dat onder invloed van A'D een aanzienlijke remming van de eiwitsynthese optreedt in niet-geïnfecteerde en met TMV W U1 geïnfecteerde Samsun NN tabak. Het lijkt daarom aannemelijk dat A'D onder de gegeven omstandigheden een effectieve remming van de DNA-afhankelijke RNA-synthese en daarmee van de *de novo* gesynthetiseerde m-RNA-afhankelijke eiwitsynthese bewerkstelligde, zodat met behulp van dit antibioticum een onderscheid gemaakt zou kunnen worden of de nieuwe componenten na infectie van Samsun NN planten met TMV W U1 worden geactiveerd en/of uit een gebonden in een oplosbare vorm overgaan, dan wel *de novo* worden gesynthetiseerd via nieuw gevormde m-RNA's.

Hiertoe werd 48 uur na inoculatie met 100 µg TMV per ml, A'D ingespoten in de bladeren. Onder deze condities had het antibioticum noch effect op het aantal, noch op de grootte van de geïnduceerde vlekken (vgl. Van Loon en Geelen, 1972). Drie dagen later werden de planten geëxtraheerd. Ge centrifugeerde extracten werden onderworpen aan elektroforese in 10% gels. In de densitometergrafieken werd een reductie in de hoeveelheid van alle nieuwe eiwitcomponenten waargenomen ten opzichte van geïnfecteerde, met water ingespoten planten, maar deze was variabel en bedroeg nooit meer dan 50%. Daardoor waren de banden van de nieuwe eiwitcomponenten in de patronen van met A'D behan-

Tabel 5.2. Het effect van AMD op de incorporatie van gemerkte aminozuren in oplosbare eiwitten van Samsun NN tabak

| Inspuiting ^c | ³⁵ S-methionine ^a | | | | ¹⁴ C-leucine ^b | | | |
|-------------------------|---|---|-----------------------|-----|--------------------------------------|-----|-----------------------|-----|
| | S III | | opl. eiwit | | S III | | opl. eiwit | |
| | cpm/ml | % | sp. act. ^d | % | cpm/ml | % | sp. act. ^d | % |
| water | - ^e | - | 10731 | 100 | 110830 | 100 | 4067 | 100 |
| AMD | - | - | 4748 | 44 | 83145 | 75 | 1643 | 40 |

^a 7,7 µCi ³⁵S-methionine (330 µCi/mM) per plant met drie bladeren.

^b 8,3 µCi ¹⁴C-leucine (250 µCi/mM) per plant met drie bladeren.

^c planten waren ingespoten in drie bladeren met gedem. water of AMD (20 µg/ml) 24 uur voor opname van gemerkte aminozuren.

^d cpm/mg eiwit; het werkelijk gemeten aantal cpm was steeds groter dan deze waarde.

^e - : niet onderzocht.

Tabel 5.3. Incorporatie van gemerkte aminozuren in oplosbare eiwitten van Samsun NN tabak na infectie met TMV W U1

| Inoculatie ^c | ³⁵ S-methionine ^a | | | | ¹⁴ C-leucine ^b | | | |
|------------------------------|---|-----|-----------------------|-----|--------------------------------------|-----|-----------------------|-----|
| | S III | | opl. eiwit | | S III | | opl. eiwit | |
| | cpm/ml | % | sp. act. ^d | % | cpm/ml | % | sp. act. ^d | % |
| water | 172950 | 100 | 74194 | 100 | 190830 | 100 | 45573 | 100 |
| TMV | 83875 | 48 | 8082 | 11 | 169270 | 89 | 22780 | 50 |
| TMV + AMD insp. ^e | - ^f | - | - | - | 88770 | 47 | 1778 | 4 |

^a 14 µCi ³⁵S-methionine (164 µCi/mM) per plant met drie bladeren.

^b 16 µCi ¹⁴C-leucine (250 µCi/mM) per plant met drie bladeren.

^c planten waren geïnoculeerd met water of TMV W U1 (100 µg/ml) 72 uur voor opname van gemerkte aminozuren.

^d cpm/mg eiwit.

^e geïnoculeerde planten waren ingespoten met AMD (20 µg/ml) 24 uur voor opname van gemerkte aminozuren.

^f - : niet onderzocht.

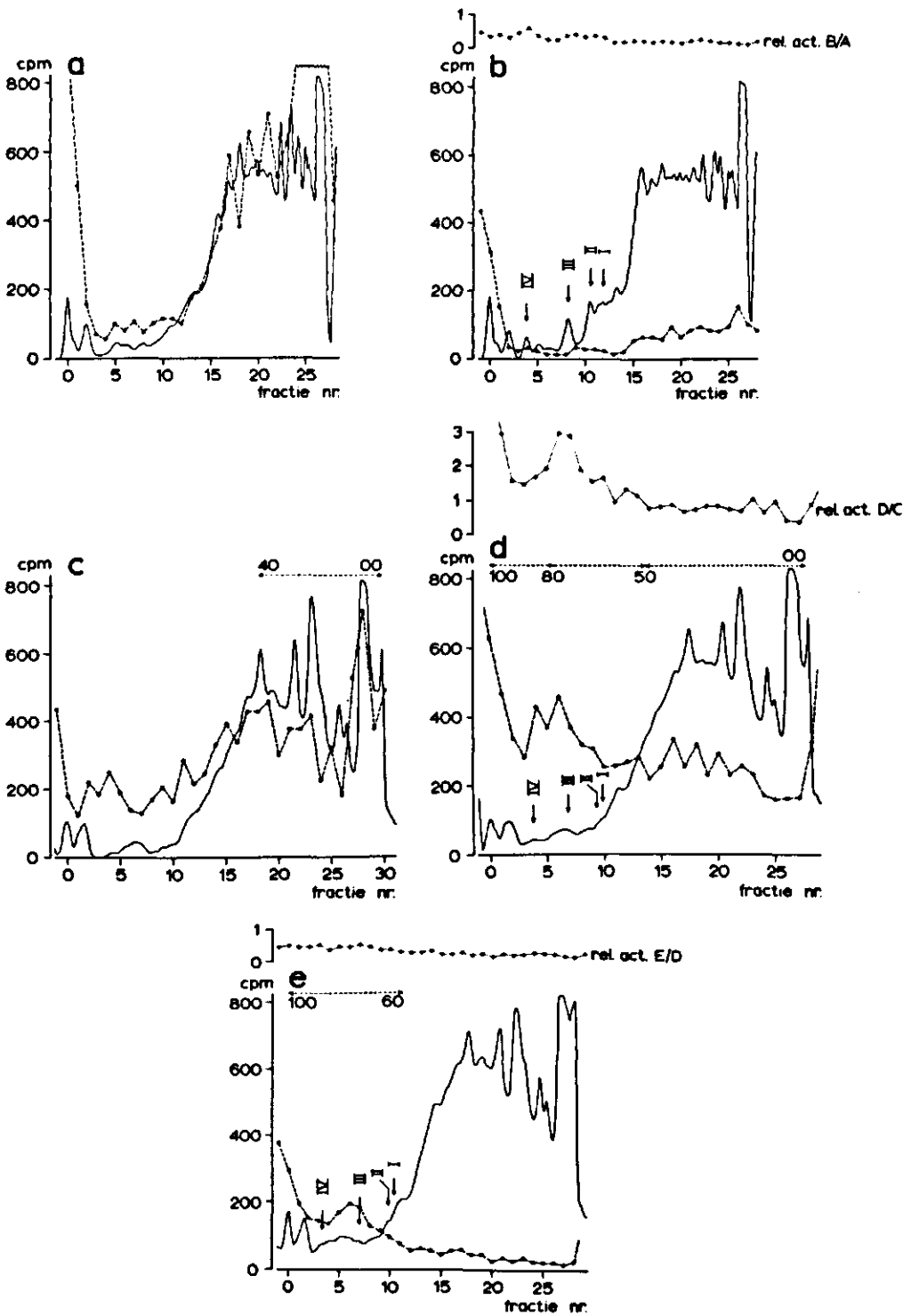
delde planten steeds gemakkelijk te herkennen, hoewel de intensiteit van de banden, en daarmee de hoeveelheid eiwit in deze banden, altijd enigszins lager was dan in met water ingespoten planten.

Indien AMD onmiddellijk na inoculatie of 96 uur later werd toegediend, werd geen vermindering in de intensiteit van de banden waargenomen wanneer de bladeren respectievelijk 96 en 72 uur later werden geëxtraheerd. Dit is niet verwonderlijk, omdat AMD in de plant slechts ongeveer 3 dagen werkzaam blijft (Loebenstein *et al.*, 1968) en de componenten pas vanaf de derde dag na inoculatie herkenbaar waren, maar reeds in betrekkelijk grote hoeveelheden aanwezig waren op de vierde dag.

De waargenomen reductie in de hoeveelheid van de nieuwe eiwitcomponenten na inspuiting met AMD op dag 2 kan verklaard worden door aan te nemen dat transcriptie van het desbetreffende waardplant-DNA moet plaatsvinden voor synthese van deze eiwitten. De reductie was echter kleiner dan op grond van de remming van de eiwitsynthese door AMD verwacht kon worden. Dit resultaat en het feit dat geen remming werd waargenomen na inspuiting met AMD op dag 4, kunnen mogelijk verklaard worden door aan te nemen dat de inductie van de nieuwe componenten geremd kan worden door AMD, maar wanneer de synthese eenmaal op gang gekomen is, geen remming meer mogelijk is, d.w.z. synthese van de nieuwe componenten zou kunnen plaatsvinden via translatie van relatief stabiel mRNA. Het is ook mogelijk dat een deel van de totale hoeveelheid vrijkomt uit celorganellen die in een kring rondom de zich ontwikkelende vlekken te gronde gaan (Israel en Ross, 1967; Ross en Israel, 1970).

5.4. Veranderingen in de incorporatie van radioactief gemerkte aminozuren in eiwitten van tabak cv. Samsun NN na infectie met TMV W U1

Figuur 5.2 geeft de eiwitpatronen en de verdelingen van de geïncorporeerde radioactiviteit over de gels weer die verkregen werden wanneer 0,2 ml van gecentrifugeerde extracten uit planten waaraan ^{35}S -methionine of ^{14}C -leucine was toegediend – als beschreven in 5.3 – werd onderworpen aan elektroforese in 10% gels. Extracten van niet-geïnfecteerde planten gemerkt met ^{35}S -methionine vertoonden een radioactiviteitsverdeling die in grote trekken overeenkwam met het eiwitpatroon (Fig. 5.2 a). Hetzelfde was in feite het geval met extracten uit met hetzelfde aminozuur gemerkte, geïnfecteerde planten, zij het dat de radioactiviteit over de gehele gel zeer laag was (Fig. 5.2 b; vgl. Tabel 5.3). Nieuwe componenten waren geenszins opvallend gemerkt. De verhoudingen van de radioactiviteitsverdelingen van geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde planten werden vervolgens berekend door de hoeveelheid radioactiviteit in ieder plakje van een gel waarop eiwit uit geïnfecteerde planten aan elektroforese was onderworpen te delen door de hoeveelheid radioactiviteit in een overeenkomstig plakje van een gel waarop eiwit uit niet-geïnfecteerde planten was gescheiden. Bij het uitzetten van de aldus verkregen relatieve activiteitsverdeling werden relatief hoge waarden gevonden op posities die overeenkwamen met die van de nieuwe componenten I-II, III en IV



in het eiwitpatroon (Fig. 5.2 b). Omdat ieder gelpakje ruim drie R_f waarden omvatte en omdat in het gebied van de gel waarin zich de nieuwe componenten bevinden tevens zwakke banden voorkwamen die onder invloed van de virusinfectie geactiveerd zouden kunnen zijn, is het, mede gezien de lage incorporatie in geïnfecteerde planten, moeilijk te bepalen in hoeverre deze resultaten als significant kunnen worden beschouwd.

Bij elektroforese van met ^{14}C -leucine gemerkt eiwit bevattende extracten werd een radioactiviteitsverdeling gevonden die in het gebied 0,00-0,40 overeenkomst vertoonde met het eiwitpatroon. In het resterende gedeelte van de gel werd echter een relatief hoge radioactiviteit waargenomen, verdeeld over een aantal duidelijke pieken (Fig. 5.2 c). Deze pieken kwamen goed overeen met een aantal zwakke banden in het eiwitpatroon. Patronen van geïnfecteerde planten vertoonden een geringere radioactiviteit dan die van niet-geïnfecteerde planten in het gebied 0,00-0,50, doch een hogere radioactiviteit in het gebied 0,50-1,00 (Fig. 5.2 d). In dit experiment waren de R_f waarden van alle banden relatief hoog als gevolg van het gebruik van ethyleendiacrylaat als vertakker in de gels. Op grond van het eiwitpatroon werden de R_f waarden van de nieuwe componenten vastgesteld als respectievelijk 0,65, 0,68, 0,76 en 0,87. De relatieve activiteitsverdeling over de gel gaf een relatief hoge waarde te zien op de positie van de nieuwe componenten I-II en vormde een piek die samenviel met de positie van de nieuwe component III. De positie van de nieuwe component IV was niet gemarkeerd door een relatief hoge incorporatie, doch de relatieve activiteit was in het gehele gebied 0,80-1,00 groter dan 1. Klaarblijkelijk waren tevens een groot aantal andere eiwitten met hoge R_f waarden geactiveerd onder invloed van de virusinfectie. Een gedeeltelijke afbraak van nieuw gevormde eiwitten met lagere R_f waarden mag echter niet uitgesloten geacht worden.

Extracten van geïnfecteerde planten die ingespoten waren met AMD vertoonden over de gehele gel een zeer sterke reductie van de in de afzonderlijke eiwitbanden geïncorporeerde radioactiviteit (Fig. 5.2 e; vgl. Tabel 5.3). In het relatieve activiteitspatroon ten opzichte van geïnfecteerde, niet ingespoten planten waren alle pieken genivelleerd. Dit suggereert dat de voor geïnfecteerde planten specifieke incorporatie grotendeels werd geremd. In het gebied 0,60-1,00 schommelde de relatieve activiteit echter rond de 0,5, met relatief iets hogere waarden rond R_f 0,75 en 0,89, terwijl de relatieve activiteit in het resterende gedeelte van de gel aanzienlijk lager was. Daar de posities 0,75 en 0,89 samenvielen met die van de nieuwe componenten III en IV zou

Fig. 5.2. Densitometergrafieken van eiwitpatronen (—), verdeling van de radioactiviteit (●—●) over de gels en relatieve activiteitsverdelingen (○—○) na elektroforese van 0,2 ml gecentrifugeerd extract uit tabak cv. Samsun NN, 4 dagen na inoculatie met gedem. water (a,c) of 100 μg TMV W U1 per ml (b,d,e): 24 uur na opname van ^{35}S -methionine (a,b) of ^{14}C -leucine (c-e) (respectievelijk 14 en 16 μCi per plant met drie bladeren) en 48 uur na inspuiting met AMD (20 μg per ml)(e). Elektroforese vond plaats in 10% polyacrylamidegels (vertakker: Bis (a,b); ethyleendiacrylaat (c-e)); kleuring met amidoblack.

het mogelijk zijn dat deze componenten minder sterk geremd werden door AMD dan de overige banden. In mindere mate geldt dit voor alle banden in het gebied 0,60-1,00 ten opzichte van die in het gebied 0,00-0,60. Deze resultaten zijn daarmee in overeenstemming met de in 5.3 beschreven waarneming dat AMD de synthese van de nieuwe componenten slechts gedeeltelijk remt.

Hoewel bij elektroforese van extracten uit geïnfecteerde planten geen duidelijk verhoogde incorporatie werd waargenomen op de posities van de nieuwe componenten, wijzen de relatieve activiteitsverdelingen op een verhoogde relatieve incorporatie op deze posities. *De novo* synthese van de nieuwe componenten blijft daarom, althans ten dele, waarschijnlijk. Een aan de elektroforese voorafgaande zuivering der nieuwe componenten lijkt echter noodzakelijk om de incorporatie van radioactieve aminozuren in elk der componenten en het effect van AMD op deze incorporatie duidelijk te kunnen vaststellen.

5.5. Mogelijke functies van de nieuwe componenten

Door gebruik te maken van specifieke enzymkleuringen, analoog aan die welke bij het histo- en cytochemisch onderzoek toegepast worden om de lokalisering van enzymen in weefsels of cellen vast te stellen, konden de posities van een twintigtal enzymen worden vastgesteld op gels waarop eiwitten uit niet-geïnfecteerde of geïnfecteerde planten waren gescheiden. Niet-geïnfecteerde Samsun en Samsun NN planten onderscheidden zich in geen enkel geval in de isoënzypatronen van de onderzochte enzymen; deze zijn in de vorm van diagrammen weergegeven in Fig. 5.3. Dit resultaat vormt een uitbreiding van en bevestigt tegelijkertijd de in 3.1 beschreven waarneming dat geen verschillen optraden tussen eiwitpatronen van niet-geïnfecteerde Samsun en Samsun NN planten.

De isoënzypatronen van geïnfecteerde Samsun planten vertoonden ten opzichte van die uit niet-geïnfecteerde planten slechts kwantitatieve verschillen; geïnfecteerde Samsun NN planten waren, naast omvangrijke kwantitatieve veranderingen, tevens gekenmerkt door het verschijnen van een nieuwe peroxidaseband bij R_f 0,12 in 7,5% gels en een waarschijnlijk nieuw isoënzym van ribonuclease bij R_f 0,63 in 10% gels (vgl. 5.8). De posities van deze beide nieuwe isoënzymbanden kwamen niet overeen met die van nieuwe eiwitcomponenten. Ook kwamen die van de nieuwe componenten in geen enkel geval overeen met de posities van isoënzymen van één of meer der onderzochte enzymen die specifiek geactiveerd werden na infectie van Samsun NN planten met T:V W U1. Evermin bleken zij te kleuren in reacties op glycoproteïnen, lipoproteïnen of RNA. Het bezit van enige enzymatische activiteit van de nieuwe componenten kon dus niet worden aangetoond.

De kleuring met amidoblack van de eiwitbanden van niet-geïnfecteerd materiaal was zeer stabiel. Met amidoblack gekleurde patronen van met T:V geïnfecteerd materiaal waren eveneens stabiel voorzover deze in kwalitatief opzicht overeenkwamen met die van niet-geïnfecteerd materiaal. In de gebieden 0,70-1,00 op 7,5% gels en 0,50-1,00

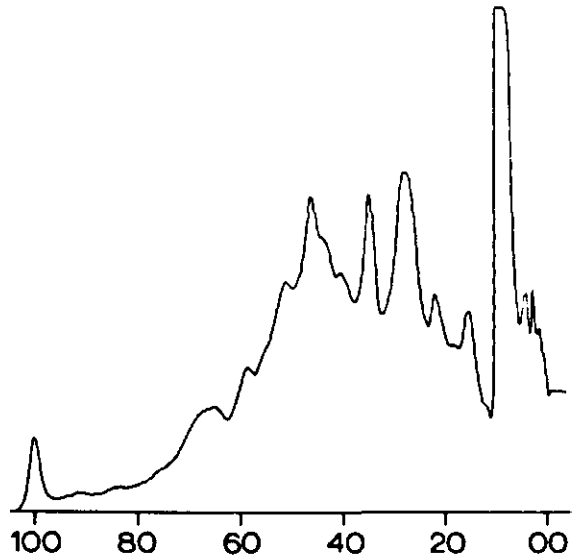


Fig. 5.3. Densitometergrafiek van het eiwitpatroon en diagrammen van isoënzypatronen van tabak cv. Samsun NN. Elektroforese van gecentrifugeerde extracten vond plaats in 7,5% polyacrylamidegels. Resultaten uit verschillende experimenten zijn gecorrigeerd voor verschillen in R_f waarden op grond van vergelijking van eiwitpatronen die in elke reeks waren opgenomen en gekleurd werden met amidoblack.

op 10% gels trad echter vermindering van de kleurintensiteit op in de tijd, vooral in die van de nieuwe eiwitcomponenten. Daarentegen werden de nieuwe componenten blijvend zeer sterk gekleurd door coomassieblue (vgl. Fig. 3.7 b). Daar deze kleurstof bij voorkeur gebonden wordt aan basische groepen (Fazekas de St. Groth *et al.*, 1963; Laver, 1970), kan dit een aanwijzing vormen dat de nieuwe eiwitcomponenten een hoog gehalte aan basische aminozuren bevatten. Dit zou verklaren waarom bij bewaren van de gels in 7% azijnzuur kleurverlies optrad en kleuring met amidoblack in TCA betere resultaten gaf dan kleuring in azijnzuur (vgl. 2.6.2). Recent onderzoek door Gianinazzi (persoonlijke mededeling) lijkt er op te wijzen dat een nieuwe component die in tabak var. Xanthi-nc gevonden wordt na infectie met TMV en overeenkomt met de nieuwe component IV, ongeveer 10% basische aminozuren bevat. Ook hier kan zuivering van de componenten opheldering verschaffen.

Figuur 5.1 d laat zien dat in extracten van niet-geïnoculeerde, jonge, zich ontwikkelende bladeren van 14 dagen tevoren met TMV W U1 geïnoculeerde Samsun NN planten dezelfde vier nieuwe eiwitcomponenten in kleine hoeveelheden aanwezig waren, terwijl het eiwitpatroon verder overeenkwam met dat van jonge bladeren van met water geïnoculeerde planten – identiek aan dat van met water geïnoculeerde bladeren (Fig. 5.1 a). In sommige experimenten traden in dergelijke bladeren tevens in meerdere of mindere mate kwantitatieve veranderingen op overeenkomend met die in geïnoculeerde bladeren. Hieruit blijkt dat in feite alle veranderingen die door infectie met TMV lokaal teweeggebracht worden, in geringe mate ook systemisch optreden. Van deze veranderingen was de inductie van de vier nieuwe componenten echter steeds het opvallendst.

Indien slechts twee of vier oudere bladeren van een plant geïnoculeerd werden, konden een week later in extracten van de daarboven gelegen bladeren zeer zwakke banden met dezelfde R_f waarden als die der nieuwe eiwitcomponenten worden waargenomen, zelfs wanneer de geïnoculeerde bladeren op de vierde dag na inoculatie waren verwijderd. Hieruit blijkt dat de nieuwe eiwitcomponenten inderdaad in de jonge niet-geïnoculeerde delen van de plant geïnduceerd worden en in hoeveelheid toenemen in de tijd.

Met TNV en met TRV geïnoculeerde planten vertoonden dezelfde veranderingen in eiwitpatronen als Samsun NN planten na infectie met TMV W U1 (vgl. Tabel 4.1, 4.2). Jonge zich na inoculatie ontwikkelende bladeren bevatten respectievelijk geen TNV en wel TRV, maar vertoonden in geen van beide gevallen symptomen. Bij elektroforese van extracten uit dergelijke bladeren van 14 dagen tevoren geïnoculeerde Samsun of Samsun NN planten, werden in alle gevallen de vier nieuwe componenten in lage concentraties waargenomen. Extracten van jonge, symptomloze bladeren van Samsun planten die 14 dagen tevoren geïnoculeerd waren met TMV HR bevatten de componenten I en IV in zeer lage concentratie, terwijl component II duidelijk kon worden waargenomen na elektroforese op 10% gels; component III kon niet worden aangetoond. In jonge, zich ontwikkelende bladeren van 14 dagen tevoren met TMV HR geïnoculeerde Samsun EN en Samsun NN planten

konden geen nieuwe componenten worden waargenomen.

Wanneer niet-geïnoculeerde, jonge, zich ontwikkelende bladeren van *N. glutinosa* 14 dagen na inoculatie met TMV W U1 geëxtraheerd werden, bleek bij elektroforese in 7,5% gels een opvallende band aanwezig bij R_f 0,43 en een zwakkere band bij R_f 0,77. In 10% gels was de nieuwe band aanwezig bij R_f 0,57 en werd een opvallende band waargenomen bij R_f 0,75 (vgl. Tabel 3.1). Hieruit blijkt dat in *N. glutinosa*, evenals in Samsun NN planten, de veranderingen die na inoculatie met TMV geïnduceerd werden in de geïnoculeerde bladeren, ook optraden in de niet-geïnoculeerde delen van de plant. In deze delen werd wederom een toename in de hoeveelheid van deze eiwitten waargenomen in de tijd: 7 dagen na infectie was in 10% gels alleen band 0,75 duidelijk waarneembaar, terwijl band 0,57 nog niet aanwezig leek te zijn. In 7,5% gels werd op dat moment slechts een lichte stijging in band 0,43 gevonden.

Het feit dat zowel in *N. tabacum* cv. Samsun NN als in *N. glutinosa* en, wat eerstgenoemde soort betreft na infectie met verschillende virussen, nieuwe componenten aanwezig waren in de niet-geïnoculeerde delen van de planten, waar zij vanaf een week na infectie toenamen in hoeveelheid, suggereert een relatie met het optreden van verworven systemische resistentie (vgl. Ross, 1961b; Bozarth en Ross, 1964). Dit verschijnsel lijkt bepaald te worden door hetzelfde mechanisme als de oorspronkelijke vlekvorming na de eerste inoculatie (Ross, 1966; Davis en Ross, 1968; Ross en Israel, 1970). Aangezien gevonden werd dat de eiwitsamenstelling van de waardplant zich op dezelfde manier wijzigde in de geïnoculeerde en in de niet-geïnoculeerde delen, is het mogelijk dat de nieuwe eiwitcomponenten een rol spelen bij het verhinderen van de uitbreiding van het virus. Omdat zij pas 3-4 dagen na infectie waarneembaar waren, is het zeer onwaarschijnlijk dat zij een rol spelen bij de initiatie van de lokale vlekvorming, temeer daar dit verschijnsel bepaald wordt door dezelfde, zowel in de variëteit Samsun NN als in *N. glutinosa* aanwezige NN genen. Daar het virus echter niet gelokaliseerd wordt door het afsterven van de cellen (Kassanis, 1952; Martin en Gallet, 1966a), maar in een actieve vorm aanwezig is in een kring rondom de lokale vlek (Hayashi en Matsui, 1965; Milne, 1966b; Martin en Gallet, 1966b,c), moet er een mechanisme zijn dat de ontsnapping van het virus verhindert. Bij 30° worden door TMV in Samsun NN planten systemische mozaïeksymptomen geïnduceerd, hetgeen overeenkomt met de reactie van Samsun planten bij 20°. Onder die omstandigheden waren de vier nieuwe componenten niet aanwezig. Bij overbrenging van bij 20° geïnoculeerde Samsun NN planten naar 30° namen de hoeveelheden van de nieuwe componenten, met uitzondering van band III, aanzienlijk af. De nieuwe componenten zouden daarom een rol kunnen spelen bij de remming van de virusvermenigvuldiging of van de uitbreiding van het virus in het blad. Gezien het feit dat na infectie met TMV verschillende veranderingen in de eiwitpatronen gevonden werden in verschillende tabaksoorten, is het mogelijk dat eenzelfde mechanisme op verschillende wijze werkzaam is in verschillende plantesoorten.

5.6. Toetsen van een eventuele remmende werking van de nieuwe componenten

5.6.1. Correlatie tussen het voorkomen van de nieuwe componenten en het optreden van verworven systemische resistentie *in vivo*

Verworven systemische resistentie uit zich primair in een reductie van de diameter van de lokale vlekken die gevormd worden na een tweede inoculatie met een virus waarop de plant hypersensitief reageert (Ross, 1966). Om een eventuele correlatie te kunnen vaststellen tussen de aanwezigheid van nieuwe componenten en het optreden van verworven systemische resistentie werden de jonge bladeren van 4 weken tevoren met PVX, PVY⁰, PVYⁿ of CMV en 14 dagen tevoren met TMV W U1, TMV HR, TNV of TRV geïnoculeerde Samsun NN planten geïnoculeerd met TMV W U1 of, in één geval, met TNV. Oorspronkelijk met water geïnoculeerde planten dienden als controle. Zeven dagen na de tweede inoculatie werden de diameters van de lokale vlekken op proef- en controleplanten gemeten, waarbij overeenkomstige bladniveaus werden vergeleken. Jonge bladeren van planten die 14 dagen tevoren waren bespoten met kwikchloride werden eveneens getoetst. Daar planten die geïnoculeerd zijn met RNA eveneens verworven resistentie vertonen (Cheo *et al.*, 1968; Gicherman en Loebenstein, 1968; Meneghini *et al.*, 1969), werden Samsun NN planten geïnoculeerd met een oplossing van 40 mg gist-RNA per ml gedem. water (Cheo *et al.*, 1968). Zeven dagen later werden de geïnoculeerde bladeren en nog eens 7 dagen later de jonge, niet-geïnoculeerde bladeren getoetst op het optreden van verworven resistentie. In de eiwitpatronen van met RNA geïnoculeerde planten werd op deze tijdstippen geen enkel verschil waargenomen vergeleken met planten die met gedem. water waren geïnoculeerd. De resultaten zijn weergegeven in tabel 5.4.

Hieruit blijkt dat het voorkomen van nieuwe componenten steeds gepaard ging met een kleinere diameter van de vlekken die ontstonden na de tweede inoculatie. Kleinere vlekdiameters traden echter ook op buiten aanwezigheid van de nieuwe componenten, en wel wanneer de planten de eerste maal niet met een virus waren geïnoculeerd. De eerste maal met PVY⁰ geïnoculeerde planten bevatten alleen de nieuwe componenten I en II (vgl. Tabel 4.2); de reductie was echter in hoge mate significant en groter naarmate de getoetste bladeren ouder en daarmee langer geïnfecteerd waren. De eerste maal met CMV geïnoculeerde planten vertoonden, naast in hoge mate significant grotere diameters op de jongste bladeren, kleinere diameters op de oudste bladeren die het langst geïnfecteerd waren en waarin de nieuwe componenten waarschijnlijk nagenoeg uitsluitend gelokaliseerd waren (vgl. 6). Daar planten die onder kasomstandigheden met TMV HR werden geïnoculeerd witte stippen tot zeer kleine necrotische vlekjes vormden en hierin, in tegenstelling tot planten die waren geïnoculeerd in de plantengroei-kamer, nieuwe componenten in zeer lage concentratie voorkwamen, is het niet onaannemelijk dat in deze combinatie ook in de jonge, niet-geïnoculeerde bladeren sporen van de nieuwe componenten aanwezig waren.

Bespuiting van bladeren met kwikchloride bracht een zeer sterke verworven systemi-

Tabel 5.4. Mate van verworven systemische resistentie in Samsun NN planten na infectie met verschillende virussen of na verschillende behandelingen

| Eerste inoculatie | Tweede inoculatie | Niveau ^a | Controle (eerste inoculatie: water) diam. lokale vlekken ^b (mm) | Proef diam. lokale vlekken ^b (mm) | Perc. van controle ^c | Voorkomen van nieuwe componenten ^d |
|-------------------|-----------------------|---------------------|--|--|---------------------------------|---|
| PVX | TMV W U1 | | 0,75 ± 0,19 | 1,01 ± 0,40 | 135 ** | - |
| PVY ^o | TMV W U1 | hoog | 0,75 ± 0,19 | 0,55 ± 0,25 | 73 ** | + ⁱ |
| PVY ^o | TMV W U1 | middel | 0,64 ± 0,19 | 0,40 ± 0,16 | 63 ** | + ⁱ |
| OMV | TMV W U1 | hoog | 0,52 ± 0,13 | 0,61 ± 0,15 | 118 ** | - |
| OMV | TMV W U1 | middel | 0,58 ± 0,11 | 0,59 ± 0,15 | 101 | + ₋ |
| OMV | TMV W U1 | laag | 0,47 ± 0,10 | 0,36 ± 0,10 | 77 ** | + ₋ |
| TMV HR | TMV W U1 ^e | | 0,91 ± 0,25 | 0,80 ± 0,21 | 88 | + ₋ |
| TMV HR | TMV W U1 ^f | | 0,92 ± 0,12 | 0,70 ± 0,16 | 76 ** | + ₋ |
| TMV W U1 | TMV W U1 | | 0,57 ± 0,16 | 0,24 ± 0,09 | 43 ** | + ₋ |
| TNV | TMV W U1 | | 0,57 ± 0,16 | 0,38 ± 0,14 | 67 ** | + ₋ |
| TRV | TMV W U1 | | 0,57 ± 0,16 | 0,28 ± 0,10 | 50 ** | + ₋ |
| PVY ⁿ | TMV W U1 | | 0,62 ± 0,14 | 0,40 ± 0,15 | 65 ** | + ₋ |
| HgCl ₂ | TMV W U1 | | 0,85 ± 0,10 | 0,40 ± 0,07 | 47 ** | - |
| gist-RNA | TMV W U1 ^g | | 0,72 ± 0,09 | 0,56 ± 0,12 | 77 ** | - |
| gist-RNA | TMV W U1 ^h | | 0,59 ± 0,12 | 0,55 ± 0,07 | 92 | - |
| TMV W U1 | TNV | | 0,35 ± 0,15 | 0,25 ± 0,09 | 70 ** | + ₋ |
| TNV | TNV | | 0,35 ± 0,15 | 0,18 ± 0,10 | 51 ** | + ₋ |

^a van vier weken tevoren geïnoculeerde planten die een systemische reactie vertoonden, werden zonodig drie bladniveaus onderscheiden: hoog = jonge bladeren; middel = jong volgroeide bladeren; laag = oudere bladeren.

^b diameters werden bepaald met behulp van een binoculair met oculairmicrometer bij een vergroting van 10x en gemeten in twee richtingen loodrecht op elkaar.

^c de betekenis van de gevonden verschillen werd statistisch onderzocht bij gebruik van Students *t*-toets; ** significant op het 1% niveau of beter ($p < 0,01$).

^d vergelijk tabel 4.2.

^e planten werden in een plantengroeikamer gehouden.

^f planten werden tot aan de tweede inoculatie onder kasomstandigheden gehouden.

^g geïnoculeerde bladeren : verworven lokale resistentie.

^h jonge, niet-geïnoculeerde bladeren : verworven systemische resistentie.

ⁱ alleen componenten I en II.

sche resistentie teweeg zonder dat nieuwe componenten optraden. Aangenomen mag worden dat het kwikchloride de plant was binnengedrongen. In tabak worden opgenomen laag-moleculaire verbindingen snel door de gehele plant heen verspreid (Kuiper, persoonlijke mededeling). Het is bekend dat TMV-RNA geïnactiveerd wordt door $HgCl_2$ *in vitro* (Santelli, 1966). Eenzelfde verschijnsel zou ook *in vivo* kunnen optreden, waardoor de virusvermenigvuldiging geremd zou worden en het resultaat hetzelfde zou zijn als bij aanwezigheid van remmende componenten. Inoculatie met gist-RNA bracht wel een verworven resistentie teweeg op de geïnoculeerde bladeren, maar het effect op de jonge, zich ontwikkelende bladeren was niet significant. Dit mechanisme lijkt daarom verschillend van dat waarin de eerste maal met een necrose verwekkend virus werd geïnoculeerd.

Resumerend kan gesteld worden dat er een duidelijke correlatie bestaat tussen het voorkomen van de nieuwe componenten en het optreden van verworven systemische resistentie. Op grond van het feit dat ook met PVY^o geïnfecteerde planten duidelijk dit verschijnsel vertonen en deze slechts de nieuwe componenten I en II bevatten, lijkt het waarschijnlijk dat één van deze componenten of beide primair van belang zijn voor het optreden van resistentie. Het voorkomen van de nieuwe componenten is echter niet de enige factor die hiervoor verantwoordelijk kan zijn. In de homologe combinatie (TMV - TMV; TNV - TNV) werd een in hoge mate significant sterker effect gevonden dan in de heterologe (TMV - TNV; TNV - TMV). Virusspecifieke factoren spelen daarom eveneens een rol.

5.6.2. Afwezigheid van een remmend effect van de nieuwe componenten *in vitro*

Uit niet-geïnfecteerde en 7 dagen tevoren met TMV W U1 geïnoculeerde Samsun NN planten werd een gezuiverde oplosbare eiwitfractie bereid, uitgaande van de fracties die na de beginpiek geëluëerd werden bij gelfiltratie over Sephadex G 50 (vgl. Van Loon en Van Kammen, 1968). De nieuwe componenten zijn in deze latere fracties aanwezig (vgl. 5.7.2). De gezuiverde fracties werden ingespoten in bladhelften van Samsun NN planten waarvan alle bladeren op drie na verwijderd waren, in een concentratie van 1 mg eiwit per ml. De aantallen vlekken die op deze bladhelften ontstonden na inoculatie met 1 µg TMV per ml zijn weergegeven in tabel 5.5. Hieruit blijkt dat in alle gevallen onder invloed van eiwit uit geïnfecteerde planten een groter aantal vlekken werd waargenomen. Een verschil in diameter van de vlekken leek niet op te treden.

De eiwitfracties werden eveneens getoetst door inoculatie gelijktijdig of 24 uur voor inoculatie met TMV. Uit tabel 5.5 blijkt dat ook in dit geval een toename van het aantal vlekken op de met eiwit uit geïnfecteerde planten geïnoculeerde bladhelften werd waargenomen.

Daar een eventueel effect van de nieuwe componenten op aantal of diameter van de vlekken in deze experimenten gemaskeerd zou kunnen zijn door effecten van andere aanwezige eiwitten, werd getracht experimenten uit te voeren met zo veel mogelijk één

Tabel 5.5. Invloed van een gezuiverde oplosbare eiwitfractie uit met TMV W U1 geïnfecteerde Samsun NN tabak op de vorming van lokale vlekken op dezelfde variëteit bij inoculatie met dezelfde virusstam

| Toediening ^a | Tijdstip van inoculatie ^b | Aantal vlekken per bladhelft | | Percentage t.o.v. controle |
|-------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--------------------|----------------------------|
| | | controle ^c | proef ^d | |
| inspuiting | 1 uur | 9 | 14 | 166 |
| | 24 uur | 420 | 574 | 137 |
| inoculatie | gelijktijdig | 75 | 82 | 109 |
| | 24 uur | 1313 | 1595 | 122 |

- ^a gezuiverde eiwitfracties uit niet-geïnfecteerde en 7 dagen tevoren met 100 µg TMV per ml geïnoculeerde Samsun NN planten werden ingespoten in, respectievelijk geïnoculeerd op overeenkomstige bladhelften van Samsun NN planten in een concentratie van 1 mg eiwit per ml.
- ^b bladeren werden geïnoculeerd met 1 µg TMV W U1 per ml.
- ^c bladhelften ingespoten of geïnoculeerd met eiwit uit niet-geïnfecteerde planten.
- ^d bladhelften ingespoten of geïnoculeerd met eiwit uit met TMV geïnoculeerde planten.

component bevattende fracties. Onmiddellijk na elektroforese van extracten uit met TMV W U1 geïnfecteerde Samsun NN planten, werden van alle gels, op één na, met een scheermesje plakjes uitgesneden die, op grond van de verwachte R_f waarde, één der nieuwe componenten bevatten. De overgebleven gel werd gekleurd en de positie van de nieuwe componenten na ontkleuring vergeleken met die der uitgesneden plakjes. In sommige gevallen werden plakjes uitgesneden die zowel component I als II bevatten. Overeenkomstige plakjes werden tezamen geëluëerd. De hoeveelheid eiwit die bij deze werkwijze kon worden verkregen was zo gering, dat een eventueel effect van toediening door inspuiting niet getoetst kon worden. De eluaten werden daarom gemengd met TMV en vervolgens uitgestreken op bladhelften van Samsun NN en *N. glutinosa*. Terwijl albumine in een concentratie van 20 µg per ml een reductie van het aantal vlekken van gemiddeld 23% teweegbracht, werd van geen der geëxtraheerde fracties enig effect op het aantal of de diameter van de ontstane vlekken waargenomen.

Door middel van preparatieve elektroforese in polyacrylamidegel werd ongeveer 150 µg vrijwel zuivere component IV gewonnen. Bij toetsing op dezelfde wijze trad wederom geen significant effect op het aantal of de diameter der vlekken op. Daar in 5.6.1 werd gevonden dat verworven resistentie waarschijnlijk eerder samenhangt met de aanwezigheid van de componenten I en II, behoeft dit resultaat geen verwondering te wekken. In de componenten I en II bevattende eluaten was de eiwitconcentratie waarschijnlijk zeer laag, waardoor een eventueel effect mogelijk niet tot uiting kwam. Het is

ook mogelijk dat de componenten op andere wijze dan door inoculatie in de cellen gebracht moeten worden om hun werking uit te oefenen. Tenslotte is het niet uitgesloten dat bij extractie en zuivering de biologische activiteit verloren gaat.

5.6.3. Correlatie tussen het voorkomen van de nieuwe componenten en remming van de virussynthese *in vivo*

In met TNV geïnoculeerde planten worden de nieuwe componenten eveneens geïnduceerd in de jonge, zich ontwikkelende bladeren (vgl. 5.5), terwijl het virus gelokaliseerd blijft in de geïnoculeerde bladeren. Indien de nieuwe componenten een remmend effect zouden hebben op de virussynthese, zou de vermenigvuldiging van TMV bij inoculatie van de jonge bladeren van 14 dagen tevoren met TNV geïnoculeerde Samsun planten moeten achterblijven bij de vermeerdering in oorspronkelijk met water geïnoculeerde planten. Dit werd nader onderzocht door 3 dagen na inoculatie van deze bladeren met TMV W U1 de virusconcentratie hierin te bepalen.

Zoals blijkt uit tabel 5.6 werd bij toetsing van gecentrifugeerde extracten op bladhelften van *N. glutinosa*, in oorspronkelijk met TNV geïnfecteerde Samsun planten een aanzienlijk lagere infectiositeit gevonden dan in oorspronkelijk met water geïnoculeerde planten. In één van de experimenten werd het virus verder gezuiverd. Hierbij bleken de verhoudingen van de aanwezige hoeveelheden virus niet significant te

Tabel 5.6. Invloed van voorafgaande infectie met TNV op de synthese van TMV W U1 in Samsun tabak ^a

| Exp. | Infectiositeit ^b | | Perc. t.o.v. controle | Hoeveelheid ^e | | Perc. t.o.v. controle |
|------|---|--------------------|-----------------------------|--|--------------------|-----------------------------|
| | aantal vlekken per bladhelft controle ^c | proef ^d | | µg virus/g blad controle ^c | proef ^d | |
| I | 182 | 42 | 23 | - ^f | - | - |
| II | 143 | 91 | 64 | 24 | 17 | 71 |

^a Samsun planten waren 17 dagen tevoren geïnoculeerd met water of TNV (100 µg/ml). De jonge bladeren die zich nadien ontwikkeld hadden waren 3 dagen tevoren geïnoculeerd met TMV W U1 (100 µg/ml). Infectiositeit en hoeveelheid van TMV in de geïnoculeerde bladeren werden bepaald.

^b gecentrifugeerde extracten werden uitgestreken op 12 bladhelften van *N. glutinosa*.

^c extracten uit oorspronkelijk met water geïnoculeerde planten.

^d extracten uit oorspronkelijk met TNV geïnoculeerde planten.

^e de hoeveelheid virus werd spectrofotometrisch bepaald na voorafgaande zuivering.

^f - : niet onderzocht.

verschillen van die der infectiositeiten in de oorspronkelijke extracten, zodat de specifieke infectiositeit van het virus niet was verminderd. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de lagere infectiositeit in tevoren met TNV geïnfecteerde planten niet berustte op een grotere hoeveelheid remstoffen, maar gezocht moet worden in een verminderde virussyntese. Verworven systemische resistentie komt klaarblijkelijk niet alleen tot uiting als de tweede inoculatie plaatsvindt met een virus waarop tabak hypersensitief reageert, maar evenzeer bij herinoculatie met een systemisch infecterend virus. Het verschijnsel van verworven systemische resistentie heeft dus een algemener karakter dan tot dusverre werd aangenomen.

5.7. Onderzoek naar verdere kwalitatieve verschillen in eiwitconstitutie tussen niet-geïnfecteerde en met TMV W U1 geïnfecteerde tabak cv. Samsun NN

Hoewel gebleken is dat er een duidelijke correlatie bestaat tussen het voorkomen van de nieuwe componenten en een remming van de virussyntese *in vivo*, kon *in vitro* geen activiteit van de nieuwe componenten aangetoond worden. Het is daarom mogelijk dat nog andere eiwitten in geïnfecteerde planten aanwezig zijn die een rol kunnen spelen bij dit verschijnsel. Niet uitgesloten is dat één of meer in tabel 4.1 als kwantitatief beschreven veranderingen in feite kwalitatieve veranderingen vertegenwoordigen, maar door het samenvallen met andere banden in de eiwitpatronen niet als zodanig onderkend konden worden. Om hierin meer inzicht te verkrijgen, werd een drietal fractioneringstechnieken beproefd.

5.7.1. Gefractioneerde precipitatie met ammoniumsulfaat

Bij gefractioneerd uitzouten van gezuiverde eiwitoplossingen met ammoniumsulfaat in trappen van 20% verzadiging, werd een verdeling van de hoeveelheid gezuiverd eiwit gevonden als weergegeven in tabel 5.7. Verreweg de grootste hoeveelheid eiwit werd neergeslagen tussen 20 en 40% verzadiging. Wanneer zoveel mogelijk gelijke hoeveelheden eiwit uit de verschillende fracties aan elektroforese in 7,5% gels werden onderworpen, bleken de aldus verkregen patronen een vloeiende reeks te vormen met voornamelijk banden bij lage R_f waarden (0-20 en 20-40% verz.) tot voornamelijk banden bij middel en hoge R_f waarden (60-80 en 80-100% verz.). De in 3.5 beschreven kwantitatieve verschillen tussen niet-geïnfecteerde en met TMV W U1 geïnfecteerde planten werden hierin zeer duidelijk bevestigd. Daarnaast werd in de fractie 0-20% verz. uit geïnfecteerde planten een opvallende band 0,13 waargenomen, die niet als zodanig aanwezig was in dezelfde fractie uit niet-geïnfecteerd materiaal. Tevens leek een zwakke nieuwe band aanwezig bij R_f 0,28, terwijl ook sporen van de nieuwe componenten I, II en III voorkwamen. Band 0,13 was in zwakkere vorm eveneens aanwezig in de fractie 20-40% verz. uit geïnfecteerd materiaal. Hierin was band 0,28 opvallend en traden zwakke banden op de posities van de nieuwe componenten I-III op. Fractie 40-60% verz. werd gekenmerkt

Tabel 5.7. Verdeling van gezuiverd oplosbaar eiwit uit Samsun NN tabak bij gefractioneerd uitzouten met ammoniumsulfaat

| Fractie | Niet-geïnfecteerd materiaal | Met TMV W U1 geïnfecteerd materiaal |
|---------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 0-20% verz. | 6% | 2% |
| 20-40% verz. | 65% | 58% |
| 40-60% verz. | 17% | 28% |
| 60-80% verz. | 8% | 11% |
| 80-100% verz. | 4% | 1% |
| totaal | 100% | 100% |

door kwantitatieve verschillen in een groot aantal banden en het voorkomen van relatief hoge concentraties van de componenten I, II en III, en waarschijnlijk eveneens IV. In de fractie 60-80% verz. waren de componenten I en II nog slechts als zwakke banden aanwezig; component III vormde een zeer sterke band, terwijl een extreem hoge band aan het front de aanwezigheid van component IV vertegenwoordigde. De fractie 80-100% verz. bevatte nog slechts sporen van de componenten III en IV.

Uit het bovenstaande volgt dat mogelijk ook nieuwe componenten aanwezig waren bij R_f 0,13 en 0,28. De nieuwe componenten I en II werden grotendeels in de fractie 40-60% verz. neergeslagen; de componenten II en IV voor een gedeelte in dezelfde fractie, doch voor het grootste deel in de fractie 60-80% verz. Op deze wijze kan dus reeds een aanzienlijke zuivering van de nieuwe componenten tot stand gebracht worden.

5.7.2. Gelfiltratie over Sephadex G 100

Gelfiltratie van gezuiverde eiwitoplossingen over Sephadex G 100 leidde tot elutiepatronen als weergegeven in Fig. 5.4 voor oplosbaar eiwit uit niet-geïnfecteerde planten. Fracties werden op de in de figuur aangegeven wijze verzameld, geconcentreerd en onderworpen aan elektroforese in 7,5% gels. De resultaten zijn weergegeven in Fig. 5.5 en 5.6.

Bij toepassing van de door Determann (1969) gegeven formule: $\log MW = 5,941 - 0,847 (V_e/V_0)$ kan een schatting gemaakt worden van het molecuulgewicht van de in de achterevolgende fracties geëluëerde eiwitten. In deze formule heeft V_e betrekking op het elutievolume van een bepaalde eiwitfractie, terwijl V_0 het dode volume van de kolom aangeeft. Voor de betrokken kolom bleek deze formule van toepassing bij molecuulgewichten > 20.000, zoals was gebleken bij calibratie met serum-albumine (MW 66.500) en trypsine (MW 23.800). Lysozym (MW 14.400) werd echter aanmerkelijk later geëluëerd dan met de formule overeenkwam. Aannemende dat de „fraction I proteïn“ bevattende beginpiek direct na het dode volume van de kolom werd geëluëerd en rekening houdend met

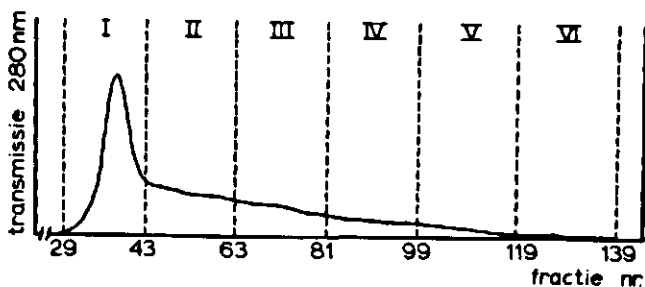


Fig. 5.4. Elutiepatroon van een gezuiverde eiwitoplossing uit tabak cv. Samsun NN op Sephadex G 100. De aangegeven fracties werden verzameld, geconcentreerd en onderworpen aan elektroforese.

het feit dat de bij het concentreren van de fracties gebruikte UM 10 membraan verbindingen met een molecuulgewicht < 10.000 doorlaat, komt men voor de fracties ruwweg tot de volgende molecuulgewichtsverdeling: fractie I: > 100.000 ; fractie II: $60.000-100.000$; fractie III: $20.000-60.000$; fractie IV: $15.000-20.000$; fractie V: $12.000-15.000$; fractie VI: $10.000-12.000$.

Fractie I bevatte verreweg de grootste hoeveelheid eiwit (vgl. Fig. 5.4), maar vertoonde een relatief weinig complex patroon met een beperkt aantal banden met lage R_f waarden (Fig. 5.5 a en 5.6 a). „Fraction I proteïn”, de voornaamste eiwitband, werd in deze fractie geëluëerd. Kleuring direct onder het grensvlak tussen concentratiegel en scheidingsgel in de overige patronen was een gevolg van aspecifieke aggregatie ontstaan tijdens de bewerkingen. Duidelijk blijkt uit de patronen dat in de latere fracties een verschuiving van de R_f waarden der banden naar hogere waarden algemeen was. Daarom moet het zeefeffect van de polyacrylamidegel een belangrijke rol spelen bij de scheiding van de eiwitten gedurende de elektroforese.

Aanzienlijke verschillen traden op tussen de patronen van overeenkomstige fracties uit niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde planten, vooral in de fracties IV-VI (Fig. 5.5 d-f en 5.6 d-f). De patronen vervolgens van lage naar hoge R_f waarden konden de volgende veranderingen worden vastgesteld in geïnfecteerd materiaal, waarbij getracht werd deze veranderingen in verband te brengen met de in 3.5 beschreven veranderingen (vgl. 4.9, 4.10; Tabel 4.1):

- het verschijnen van een blijkbaar nieuwe band 0,09 in fractie IV, welke een duidelijke piek vormde in fractie V (14);
- een sterke stijging in band 0,13 in fractie II (15);
- het verdwijnen van band 0,14 in fractie IV en V (16);
- een sterke stijging in band 0,15 in fractie II (17);
- een sterke daling van band 0,17 in fractie I en II;

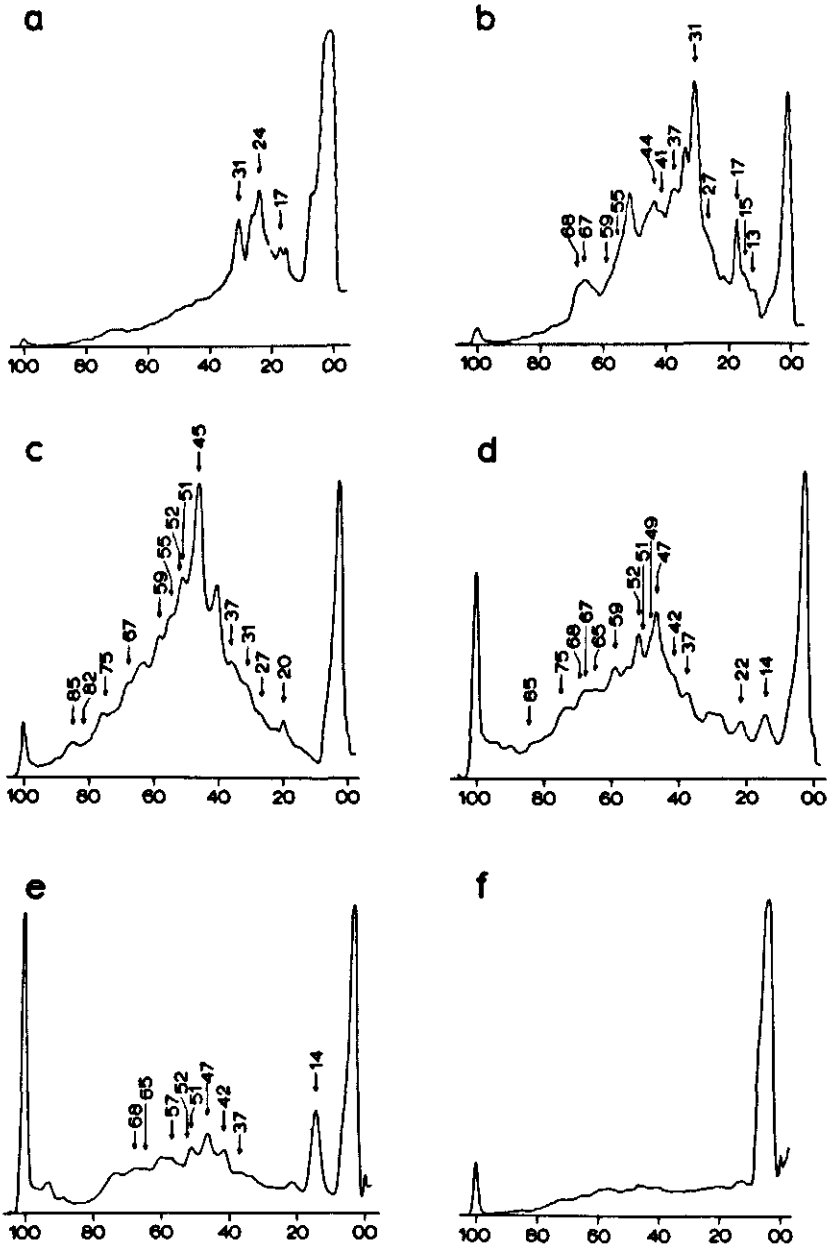


Fig. 5.5. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van tabak cv. Samsun NN, 7 dagen na inoculatie met gedem. water; gezuiverde oplosbaar eiwitfracties, verkregen door gelfiltratie over Sephadex G 100. Elektroforese van 100 μ g eiwit uit fractie I (a), II (b), III (c), IV (d) en V (e) en 80 μ g uit fractie VI (f) vond plaats in 7,5% polyacrylamidiegels; kleuring met amidoblack.

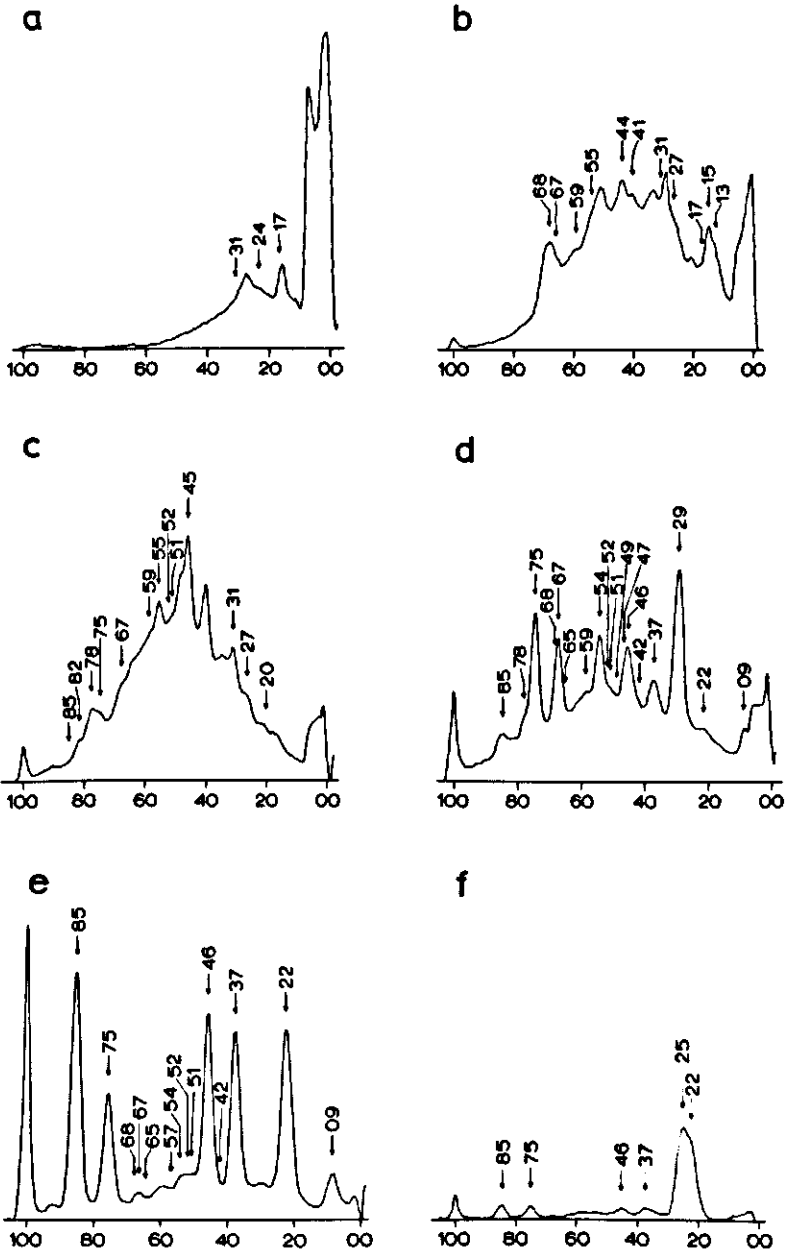


Fig. 5.6. Densitometergrafieken van eiwitpatronen van tabak cv. Samsun NN, 7 dagen na inoculatie met 100 µg TMV W U1 per ml: gezuiverde oplosbaar eiwitfracties, verkregen door gelfiltratie over Sephadex G 100. Elektroforese van 100 µg eiwit uit fractie I (a), II (b), III (c), IV (d) en V (e) en 50 µg uit fractie VI (f) vond plaats in 7,5% polyacrylamidegels; kleuring met amidoblack.

- een daling van band 0,20 in fractie III;
- het voorkomen van een mogelijk nieuwe band 0,22 in hoge concentratie in fractie V en VI; een aanzet hiertoe werd reeds gevonden in fractie IV. Bij niet-geïnfecteerd materiaal kwam alleen in fractie IV een zwakke doch duidelijke band 0,22 voor. Klaarblijkelijk betrof dit een andere band met dezelfde R_f waarde (20);
- een sterke daling van band 0,24 in fractie I (22);
- het verschijnen van een nieuwe band 0,25 in fractie VI;
- een stijging van band 0,27 in fractie II en III;
- het verschijnen van een blijkbaar nieuwe band 0,29 in fractie IV;
- een sterke daling van band 0,31 in fractie I en II; in fractie III was echter een stijging in deze band opgetreden. Klaarblijkelijk werd deze stijging veroorzaakt door een andere band met dezelfde R_f waarde (26);
- het verdwijnen van band 0,37 in fractie II; in fractie III e.v. was band 0,37 bij niet-geïnfecteerd materiaal nog slechts aanwezig als een zwakke band; in fractie IV was bij geïnfecteerd materiaal een relatief sterke stijging in deze band opgetreden. Klaarblijkelijk werd deze stijging veroorzaakt door een andere, mogelijk nieuwe band met dezelfde R_f waarde. Band 0,37 vormde een zeer hoge piek in fractie V en was als zwakke band aanwezig in fractie VI (27, 28, 29);
- een stijging van band 0,41 in fractie II (30);
- tenminste een sterke daling van band 0,42 in fractie IV en V;
- een stijging van band 0,44 in fractie II (32);
- een sterke daling van band 0,45 in fractie III;
- het voorkomen van een mogelijk nieuwe band 0,46 in hoge concentratie in fractie IV en V. Bij niet-geïnfecteerd materiaal kwam in beide fracties een band met R_f waarde 0,47 voor. Band 0,46 was nog als zwakke band aanwezig in fractie VI. Indien band 0,46 inderdaad verschillend zou zijn van band 0,47, zou aangenomen moeten worden dat band 0,47 sterk gedaald is in fractie IV (34);
- een sterke daling van band 0,49 in fractie IV;
- een sterke daling van band 0,51-0,52 (mogelijk twee verschillende banden) in fractie III, IV, V;
- het voorkomen van een mogelijk nieuwe band 0,54 in relatief hoge concentratie in fractie IV; een aanzet hiertoe was mogelijk reeds aanwezig in de stijging in band 0,55 in fractie II en III; band 0,54 was nog als zwakke band aanwezig in fractie V (37);
- het lijkt niet waarschijnlijk dat de stijging in band 0,55 in fractie II en III geheel voor rekening zou kunnen komen van band 0,54;
- tenminste een sterke daling van band 0,57 in fractie V;
- een stijging in band 0,59 in fractie II en III en een daling in dezelfde band in fractie IV. Klaarblijkelijk werd deze daling veroorzaakt door een andere band met dezelfde R_f waarde (41);
- tenminste een sterke daling van band 0,65 in fractie IV en V;

- een sterke stijging van band 0,67 in fractie II; in fractie III was deze band bij niet-geïnfecteerd materiaal intenser, bij geïnfecteerd materiaal even intens gekleurd als in de voorgaande fractie; in fractie IV was bij geïnfecteerd materiaal opnieuw een zeer sterke stijging in deze band opgetreden. Klaarblijkelijk werd deze stijging veroorzaakt door een andere, mogelijk nieuwe band met dezelfde R_f waarde; deze was nog slechts als een zwakke band in fractie V aanwezig (43);
- een sterke stijging in band 0,68 in fractie II en een sterke daling in dezelfde band in fractie IV en V. Klaarblijkelijk werd deze daling veroorzaakt door een andere band met dezelfde R_f waarde;
- het voorkomen van een nieuwe band 0,75 in hoge concentratie in fractie IV en V; een aanzet hiertoe werd reeds gevonden in fractie III; deze band was als een zwakke band aanwezig in fractie VI. Bij niet-geïnfecteerd materiaal kwam in fractie III en IV een band voor met dezelfde R_f waarde, doch het lijkt duidelijk dat deze band de nieuwe component I is;
- het voorkomen van een nieuwe component 0,78 in de vorm van een weinig opvallende band in fractie III en IV. Dit betrof klaarblijkelijk de nieuwe component II.
- een sterke stijging van band 0,82 in fractie III (X);
- een sterke daling van band 0,85 in fractie III en een sterke stijging in dezelfde band in fractie IV. Deze stijging werd veroorzaakt door de nieuwe component III die in zeer hoge concentratie aanwezig was in fractie V en als een zwakke band in fractie VI. Klaarblijkelijk viel deze component samen met een zwakke band.

De hierboven beschreven veranderingen zijn aanzienlijk gecompliceerder dan die welke werden waargenomen bij elektroforese van ongefractioneerde extracten of fracties verkregen door partiële precipitatie met ammoniumsulfaat. Dit is te danken aan de versterkingsfactor die het gevolg is van de relatief vergaande fractionering. Deze versterkingsfactor is des te groter naarmate de hoeveelheid eiwit en het aantal banden in een bepaalde fractie kleiner is. Nadat verreweg het grootste gedeelte van het aanwezige oplosbare eiwit met „fraction I proteïn” reeds in fractie I geëluëerd was, waren de individuele eiwitbanden in de volgende fracties bij dalende eiwitconcentratie relatief steeds sterker vertegenwoordigd. In het totaalpatroon onopvallende verschillen werden daardoor duidelijk herkenbaar, vooral in de weinig eiwit bevattende fracties IV-VI. Alle fracties gaven gecompliceerde patronen te zien, maar bij dalende eiwitconcentratie trad een vermindering van het aantal banden op, waardoor de verschillen nog geprononceerder werden.

Bij gebruik van deze fractioneringstechniek konden aanwijzingen worden verkregen dat verschillende banden meer dan één eiwitcomponent bevatten. Wat R_f 0,22 betreft was zowel in niet-geïnfecteerd als in geïnfecteerd materiaal in fractie I een zeer zwakke band aanwezig. Fractie II bevatte in beide gevallen een zwakke, doch duidelijke band, die in fractie III vrijwel geheel ontbrak. Niet-geïnfecteerd materiaal leverde in fractie IV wederom een duidelijke band bij deze R_f waarde met slechts sporen

hiervan in fractie V. Daarin was een band verschenen met R_f 0,21. In geïnfecteerd materiaal was bij R_f 0,22 in fractie IV nauwelijks kleuring te zien doch in fractie V was een zeer intense component aanwezig. Mogelijk waren bij deze R_f waarde dus drie eiwitcomponenten in het geding. Dergelijke verschijnselen traden ook op bij band 0,37, terwijl band 0,67 en 0,68 tezamen vier eiwitcomponenten leken te omvatten.

Zeer sterke kwantitatieve verschillen, als in een aantal gevallen waargenomen, werken echter bij gelijkblijven van de opgebrachte hoeveelheid eiwit door in de relatieve hoeveelheden van andere banden. Het is daarom mogelijk dat verschillende van de relatief kleine kwantitatieve veranderingen minder extreem zijn dan beschreven, of in het geheel niet de werkelijke situatie weerspiegelen. Dit kan echter slechts door een nauwkeurige bepaling van de hoeveelheden van iedere eiwitcomponent afzonderlijk tot klaarheid worden gebracht.

Merkwaardig is het optreden in geïnfecteerd materiaal van een elftal banden in de fracties IV, V en VI, die zonet kwalitatieve, dan tenminste zeer sterke kwantitatieve veranderingen weerspiegelen. Uit deze gecompliceerde patronen bleek niet dat de nieuwe componenten I, II, III inderdaad een kwalitatief verschil vertegenwoordigden, zoals uit vroeger beschreven experimenten is gebleken. Daarom is evenmin uit te sluiten dat de andere banden kwalitatieve verschillen vertegenwoordigen. Met uitzondering van component II, die voornamelijk in fractie III voorkwam, werden deze componenten grotendeels gezamenlijk en vrijwel buiten aanwezigheid van andere eiwitten aangetroffen in de laatst geëluëerde fracties. Klaarblijkelijk betreft het hier eiwitten met een relatief laag molecuulgewicht (10.000-20.000), doch aanzienlijke verschillen in lading, daar zij bij elektroforese verspreid over het gehele gel voorkomen. Op grond van deze eigenschappen kan waarschijnlijk op vrij eenvoudige wijze een zuivering van deze componenten tot stand gebracht worden, waarmee verdere karakterisering mogelijk wordt.

5.7.3. Chromatografie op DEAE-cellulose

Chromatografie van gezuiverde eiwitoplossingen op DEAE-cellulose leidde bij trapsgewijze verhoging van de zoutconcentratie tot elutie van tot 80% van de opgebrachte hoeveelheid eiwit bij 0,15 M NaCl. Ook bij aanleggen van een continue zoutgradiënt werden de oplosbare eiwitten binnen een klein traject geëluëerd zonder dat scheiding in fracties optrad. Chromatografie op DEAE-cellulose lijkt daarom veel minder geschikt voor de fractionering van de oplosbare eiwitten uit tabak dan gelfiltratie. Uit het feit dat verreweg het grootste deel van de eiwitten binnen een beperkt gebied van de gradiënt geëluëerd werd, kan worden afgeleid dat deze eiwitten bij de gebruikte pH niet sterk in lading verschilden. Deze conclusie versterkt de mening dat bij elektroforese van deze eiwitten in polyacrylamidegel de scheiding op grond van deeltjesgrootte prevaleert boven de scheiding op grond van lading.

5.8. Kwalitatieve veranderingen in isoënzym patronen van tabak cv. Samsun NN na infectie met TMV W U I

5.8.1. Ribonuclease

Voor het zichtbaar maken van eventuele isoënzymen van ribonuclease werd de volgende methode ontwikkeld. In de gels werd 0,05% polyuridylzuur ingepolymeriseerd. Na beëindiging van de elektroforese werden de gels gedurende 2 uur gefincubeerd in 7% azijnzuur. Het duurt enige tijd voordat de pH in de gel de waarde van de azijnzuuroplossing heeft aangenomen en inactivering en fixatie van de aanwezige enzymen heeft plaatsge-

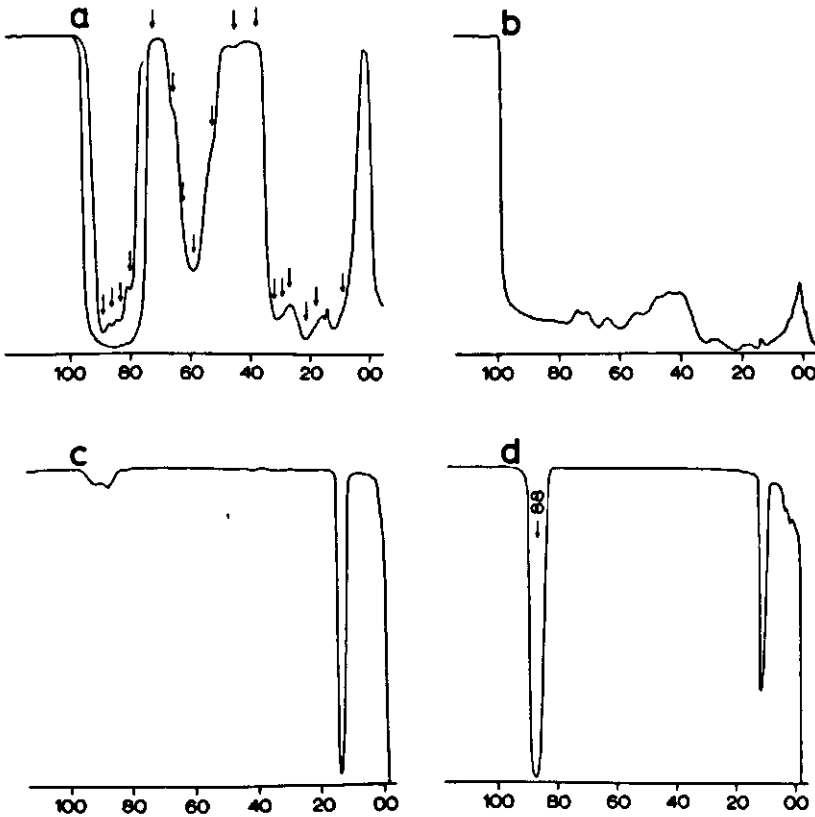


Fig. 5.7. Densitometergrafieken van isoënzym patronen van tabak cv. Samsun NN, 7 dagen na inoculatie met gedem. water (a,c) of 100 µg TMV W U I per ml (b,d): reactie op ribonuclease (a,b) en overeenkomstige controles (c,d). Elektroforese van 0,05 ml gecentrifugeerd extract vond plaats in 7,5% polyacrylamidegels. De inzet in a stamt uit een ander experiment en toont duidelijk de aanwezigheid van vier banden in het betrokken gebied. Het dal rondom positie 0,14 is een artefact als gevolg van de aanwezigheid van de zeer veel eiwit bevattende „fraction I protein” band.

vonden. In dit interval doorloopt de gel een pH-traject van 9,5 tot ca. 2, zodat activiteit van enzymen met verschillende pH-optima tot uiting kan komen. Na incubatie werden de gels gedurende een nacht gekleurd met een oplossing van 1% pyronine Y in 7% azijnzuur, vervolgens gespoeld met 7% azijnzuur en tenslotte bewaard in dezelfde vloeistof. Als controle dienden gels die onmiddellijk na elektroforese gedurende 10 min. verhit waren op 100°.

Bij gebruik van deze methode ontstonden zeer scherp begrensde, kleurloze banden op een helderrode achtergrond na elektroforese van gecentrifugeerde extracten uit niet-geïnfecteerde Samsun NN planten (Fig. 5.7 a). Zeven dagen na inoculatie met TMV W U1 waren alle banden sterk toegenomen in intensiteit (Fig. 5.7 b). Bij deze „negatieve kleuring” bleek verhoogde activiteit behalve in een dieper, vooral in een breder dal in de densitometergrafieken tot uiting te komen. Dit schijnt het gevolg te zijn van migratie van het enzymewit langs de substraatmoleculen (Stegemann, persoonlijke mededeling).

In de overeenkomstige controles werden in het geval van niet-geïnfecteerde planten sporen van de meest actieve banden gevonden (Fig. 5.7 c). Geïnfecteerde planten waren echter gekenmerkt door een zeer intense band met R_f waarde 0,88 (Fig. 5.7 d). Deze positie kwam niet precies overeen met die van één van de vier in dit gebied aanwezige banden (vgl. Fig. 5.7 a). Bij elektroforese van extracten uit geïnfecteerde planten in 10% gels bleek soms dat naast deze vier isoënzymen een vijfde band onderscheiden kon worden bij R_f 0,63. Deze waarde kwam overeen met die van de band die in dat geval in de controle verscheen. Hoewel het niet uitgesloten kan worden geacht dat sporen van dit isoënzym aanwezig zijn in niet-geïnfecteerde tabak, wijst het optreden van deze intense band in de controle van geïnfecteerde planten op een kwalitatief verschil. Dit betekent dat waarschijnlijk een nieuw isoënzym van ribonuclease wordt geïnduceerd na infectie van Samsun NN planten met TMV W U1, dat slechts herkend kan worden op grond van de eigenschap dat het zijn activiteit behoudt bij verhitting op 100°. Gezien de R_f waarden van deze band bij elektroforese in 7,5 en 10% gels, is dit isoënzym waarschijnlijk identiek met band X (Tabel 4.1) die relatief aanzienlijk toenam na infectie (vgl. 5.7.2).

Het is verleidelijk voor dit nieuwe isoënzym van ribonuclease een rol te postuleren bij de afbraak van virus-RNA, maar hieromtrent werden geen gegevens verkregen. In ieder geval bleek de betrokken band niet herkenbaar in de jonge, zich na infectie ontwikkelende bladeren. Een relatie met verworven systemische resistentie ligt dan ook zeker niet voor de hand.

5.8.2. Peroxidase

Voor het aantonen van peroxidase-activiteit werden de gels na elektroforese gedurende 30 min. gepreïncubeerd in een oplossing die 0,02 M waterstofdonor bevatte, waarna de reactie in gang gezet werd door overbrengen van de gels in 0,1% H₂O₂ (Macko *et*

al., 1967). Hierbij bleek dat een groep van banden met relatief hoge R_f waarden relatief sterk gekleurd werd bij incubatie met hoge concentraties H_2O_2 in neutraal milieu, terwijl een aantal banden met lage R_f waarden relatief sterker gekleurd werd in aanwezigheid van lage concentraties substraat en bij lage pH. Een representatief kwalitatief totaalbeeld werd verkregen bij incubatie in 0,1% H_2O_2 in ongebufferd milieu, waarbij de eerste groep banden gekleurd werd, 15 min. later gevolgd door overbrengen van de gels in 7% azijnzuur. Tijdens het doorlopen van het pH-traject (vgl. 5.8.1) daalde de concentratie van H_2O_2 in de gels door diffusie van het substraat in de vloeistof, waardoor gunstige omstandigheden geschapen werden voor het zichtbaar maken van de tweede groep banden.

Bij elektroforese van gezuiverde eiwitpreparaten uit niet-geïnfecteerde en 7 dagen tevoren met TMV W U1 geïnfecteerde Samsun NN planten en gebruik van guaiacol als waterstofdonor (Rudolph en Stahmann, 1964) ontstonden de patronen, weergegeven in Fig. 5.8. In extracten uit geïnfecteerde planten bleek een nieuwe, buitengewoon sterk gekleurde band aanwezig bij R_f 0,12 (Fig. 5.8 b). Deze band bezat een veel grotere affiniteit tot guaiacol dan tot *o*-difenolen of benzidine en werd slechts als een relatief zeer zwakke band waargenomen na stoppen met gedem. water. Bij incubatie bij pH 4,0 en vooral 2,5 werd deze band daarentegen onmiddellijk sterk gekleurd. Dit wijst er op dat dit isoënzym een lager pH-optimum bezit dan elk der overige isoënzymbanden van peroxidase.

De nieuwe band was gewoonlijk voor het eerst herkenbaar op dag 4, bereikte een max-

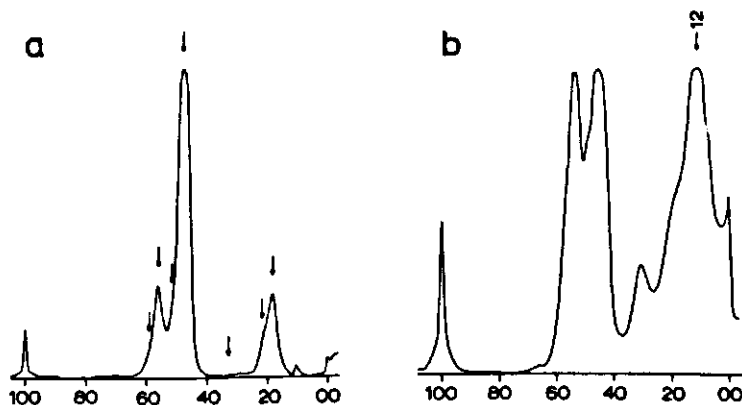


Fig. 5.8. Densitometergrafieken van isoënzypatronen van tabak cv. Samsun NN, 7 dagen na inoculatie met gedem. water (a) of 100 µg TMV W U1 per ml (b): reactie op peroxidase (waterstofdonor: guaiacol). Elektroforese van 0,1 ml gecentrifugeerd extract vond plaats in 7,5% polyacrylamidegels. Het piekje bij R_f 0,10 is een artefact als gevolg van de aanwezigheid van de zeer veel eiwit bevattende „fraction I protein” band. De band aan het front is veroorzaakt door het merken van positie 1,00 met Oostindische inkt.

imale activiteit op dag 6, en verdween daarna geleidelijk. Hij ontbrak 14 dagen na inoculatie in de jonge bladeren. Bij vergelijking van verschillende experimenten bleek de activiteit van deze band gecorreleerd met de vlektheid op de bladeren: in extracten van bladeren die geïnoculeerd waren met 100 µg TMV per ml overtrof de kleurintensiteit van deze band die van alle andere aanzienlijk; na inoculatie met 1 µg TMV per ml was de hoogte van de piek echter geringer dan die van de beide opvallende isoënzymen met hoge R_f waarden. Onder laatstgenoemde omstandigheden was de nieuwe band ook pas op dag 5 herkenbaar. Hieruit blijkt dat dit isoënzym aanzienlijk later verscheen dan zichtbare symptomen. De snelle toename viel samen met een afnemende uitbreidingsnelheid van de lokale vlekken, terwijl de maximale activiteit bereikt werd wanneer de symptoomontwikkeling als geëindigd beschouwd kon worden.

Inoculatie met TMV W U1 van de jonge bladeren 14 dagen na een voorgaande inoculatie van de planten met dezelfde stam leidde eveneens pas tot het verschijnen van de nieuwe isoënzymband op dag 4 of 5.

In met TMV HR geïnfecteerde Samsun planten was dezelfde nieuwe peroxidaseband herkenbaar vanaf dag 8. De activiteit hiervan nam toe tot dag 12, samenvallend met de beëindiging van de symptoomontwikkeling, en vervolgens weer af. Ook hier werd de band niet waargenomen in bladeren die geen symptomen vertoonden. De activiteit was in deze combinatie aanzienlijk lager dan in de combinatie TMV W U1 - Samsun NN.

De nieuwe peroxidaseband werd eveneens in geringe mate geïnduceerd na infectie met PVX of PVY⁰ in Samsun en Samsun NN planten die nagenoeg geen of zeer zwakke symptomen van vlekkerigheid vertoonden, terwijl een extreem intense band optrad na het verschijnen van symptomen van necrose in beide variëteiten als gevolg van infectie met TNV of TRV. De band trad niet op na infectie van beide variëteiten met TMV W U1 bij 30⁰, in de combinaties TMV W U1 - Samsun EN, TMV HR - Samsun EN, TMV HR - Samsun NN, CMV - Samsun en CMV - Samsun NN, of na bespuiting met HgCl₂, en werd evenmin waargenomen na bevriezing of in natuurlijk of kunstmatig verouderende bladeren. Inductie door een virus schijnt dus noodzakelijk. Ook op grond van het al of niet aanwezig zijn van band 0,12 kan dus een duidelijk onderscheid gemaakt worden tussen door een virus of kunstmatig geïnduceerde necrose (vgl. 4.8).

Daar de maximale activiteit van dit isoënzym in met TMV geïnfecteerde planten samenviel met het einde van de symptoomontwikkeling, zou het optreden van dit isoënzym mogelijk kunnen bijdragen tot het beperken van de verspreiding van het virus door de plant. Omdat verworven systemische resistentie optrad bij afwezigheid van het nieuwe isoënzym lijkt deze verklaring echter niet erg waarschijnlijk.

6. ALGEMENE DISCUSSIE

Elektroforese in polyacrylamidegel bleek uitstekend toepasbaar om oplosbare eiwitten uit tabaksbladeren in componenten te scheiden. Deze scheiding beruiste grotendeels op verschillen in grootte van de verschillende eiwitten, maar, vooral in extracten uit geïnfecteerde planten, bleken ook verschillen in lading van belang. Door gebruik te maken van 5, 7,5 en 10% gels om respectievelijk langzaam, matig snel en snel migrerende eiwitten te scheiden, en toepassing van histo- en cytochemische kleuringstechnieken voor het zichtbaar maken van verschillende enzymactiviteiten op de gels, kon een aanmerkelijke karakterisering van de eiwitconstitutie van tabak bereikt worden. Vergelijking van de eiwitpatronen in verschillende virus - waardplant combinaties bij toepassing van de verschillende gelconcentraties maakte het daarbij mogelijk de aard en de specificiteit van de optredende verschillen nauwkeuriger te onderzoeken dan wanneer slechts één gelconcentratie was gebruikt.

In een vroegere publikatie (Van Loon en Van Kammen, 1968) is gewezen op het belang van een voorafgaande zuivering van de oplosbare eiwitfractie door gelfiltratie voor het verkrijgen van betrouwbare, reproduceerbare patronen met een optimale scheiding. Een dergelijke stap kon echter niet toegepast worden bij extracten uit planten die symptomen van necrose vertoonden. Bij elektroforese direct aansluitend aan de centrifugering bleken de verkregen patronen evenwel volledig vergelijkbaar met die van gezuiverde eiwitextracten, en bovendien geen aggregatie te vertonen in het gebied 0,00-0,10 (vgl. Van Loon en Van Kammen, 1968). Zelfs bij bewaring onder stikstof gedurende één of twee dagen traden echter reeds kwantitatieve veranderingen in de patronen van deze extracten op, terwijl de banden diffuser werden en de achtergrondskleuring toenam. Terwille van een juiste vergelijking werden in het merendeel der experimenten gecentrifugeerde extracten gebruikt. Hiertoe was het noodzakelijk de extracten steeds vers te bereiden. Een bijkomend nadeel was dat de eiwitconcentratie pas achteraf kon worden bepaald. Daar staat tegenover dat bij elektroforese van gelijke volumina een indruk verkregen kon worden van de concentraties der verschillende eiwitcomponenten zoals die in de plant voorkwamen.

Tussen niet-geïnfecteerde planten van de variëteiten Samsun en Samsun NN bleken geen verschillen in eiwitconstitutie aantoonbaar. Na virusinfectie werden echter karakteristieke veranderingen geïnduceerd, afhankelijk van het reactietype en de symptoomexpressie. Aan slechts enkele eiwitcomponenten waarin veranderingen optraden na infectie kon een specifieke functie worden toegekend. De betekenis van de overige veranderingen blijft vooralsnog duister.

Tot nog toe is bij het onderzoek naar pathogenese en symptoomexpressie steeds de nadruk gelegd op veranderingen in enzymactiviteiten en zelfs is het optreden van de hypersensitieve reactie verklaard uit een verhoging van de polyfenoloxidase-activiteit (Farkas *et al.*, 1960). Het blijkt echter hoe langer hoe meer dat de veranderingen in enzymactiviteiten secundaire effecten vertegenwoordigen (vgl. Van Loon en Geelen,

1972). Van de door ons onderzochte tabaksoorten is alleen in *N. glutinosa* het optreden van een nieuw enzym na infectie met TMV geconstateerd (vgl. Tabel 1.4). In alle andere gevallen liggen de veranderingen in de activiteiten van de onderzochte enzymen tussen een maximaal drievoudige af- en toename. Dit vormt een opmerkelijk verschil met het optreden van de door ons in met TMV W U1 geïnfecteerde Samsun NN planten waargenomen nieuwe componenten. Daar de meeste enzymen zodanig kleine hoeveelheden eiwit vertegenwoordigen dat zij niet als afzonderlijke banden op de gels zichtbaar zijn (vgl. Fig. 5.3), vormt het verschijnen van een twaalftal, ten dele zeer duidelijk als afzonderlijke pieken, ten dele duidelijk in de vorm van geprononceerde kwantitatieve verschuivingen herkenbare, banden in met amidoblack of coomassieblue gekleurde eiwitpatronen een verandering in de oplosbare fractie van kwantitatief veel groter belang. Het optreden van deze banden duidt op processen die tot nog toe over het hoofd gezien zijn, maar waarvan het belang voor een juist begrip van de mechanismen van pathogenese en symptoomexpressie minstens zo groot kan zijn.

Van de nieuwe banden die na infectie verschenen, kon de aard van de bij elektroforese in 7,5% gels optredende banden 0,32 in met TMV W U1 en 0,37 in met TMV HR geïnfecteerde Samsun planten onomstotelijk worden vastgesteld als het A-proteïne van de onderscheidenlijke virusstammen. Uit de R_f waarden in 5, 7,5 en 10% gels lieten zich retardatiecoëfficiënten berekenen die het mogelijk maakten een schatting te maken van de molecuulgewichten volgens de door Zwaan (1967) beschreven methode. Hieruit bleek dat het vrije TMV-mantelwit in de gels aanwezig was als trimeer, bestaande uit drie subeenheden met molecuulgewicht 17.500. Vergelijkbare waarnemingen van McCarthy (1968) en Gianinazzi en Vallée (1969) bevestigen deze conclusie.

In weerwil van de zeer sterke virussynthese in op infectie met TMV W U1 met systemische mozaïeksymptomen reagerende tabak (Weintraub en Ragetli, 1964a) en de daarmee gepaard gaande geprononceerde lichtgroene-donkergroene mozaïeksymptomen, werd in de eiwitpatronen van mozaïekzieke Samsun planten slechts een relatief klein aantal verschillen waargenomen vergeleken met niet-geïnfecteerde planten. Het opvallendst was de verminderde elektroforetische mobiliteit van de „fraction I protein” band. Dit verschijnsel trad in geen enkel geval op na infectie met één der andere bij het onderzoek betrokken virussen, en lijkt daarmee karakteristiek voor infectie met (de W U1 stam van) TMV. In tabakplanten die systemisch geïnfecteerd zijn met de normale stam van TMV, blijken bij elektronenmicroscopisch onderzoek veranderingen te zijn opgetreden in de structuur van de chloroplasten (Milne, 1966a; Esau en Cronshaw, 1967; Faccioli, 1968), terwijl in sommige gevallen TMV-deeltjes in deze organellen zijn waargenomen (Esau en Cronshaw, 1967; Willison en Cocking, 1969; Granett en Shalla, 1970). Zowel de RNA- als de eiwitsynthese in chloroplasten worden zeer sterk geremd na TMV-infectie (Hirai en Wildman, 1969; Fraser, 1969). Eerstgenoemde auteurs postuleerden daarom dat een door TMV geïnduceerd produkt zou fungeren als repressor van de transcriptie van chloroplast-DNA, hetgeen direct zou leiden tot het optreden van chlorose. De door

ons waargenomen veranderingen in de „fraction I protein" band zouden direct met bovengenoemde verschijnselen kunnen samenhangen.

In sommige gevallen kan AMD in tabak symptomen veroorzaken die vergelijkbaar zijn met door TMV geïnduceerde mozaïeksymptomen (Hirai en Wildman, 1967). Door Hirai en Wildman (1969) is verondersteld dat dit effect het gevolg zou zijn van een remming van de transcriptie van chloroplast-DNA, analoog aan de hierboven voor TMV-RNA gepostuleerde werking. Onze waarneming dat de effecten van AMD en TMV op de eiwitsynthese in Samsun NN planten onder de gebruikte omstandigheden tenminste additief zijn (vgl. 5.3) wijst er echter op dat de werkingen van AMD en van TMV geenszins samenvallen.

Door andere auteurs wordt het optreden van chlorose vooral toegeschreven aan een optredend gebrek aan bouwstenen en energierijke verbindingen als gevolg van de intensieve virussyntese (Opel, 1965; Hofferek en Wolffgang, 1965; Hofferek, 1967). Zelfs in virus - waardplant combinaties waarin symptomen van necrose optreden konden de symptomen aanmerkelijk verzwakt worden door toediening van stikstofverbindingen of fosfaten, terwijl de als gevolg van infectie optredende veranderingen in verschillende enzymactiviteiten werden geremd (Hofferek en Wolffgang, 1965; Hofferek, 1967). Een vergelijkbare situatie doet zich voor in verouderende bladeren (Opel, 1965).

Beide bovengenoemde verklaringen sluiten elkaar niet uit, daar gebrek een gevolg kan zijn van verminderde activiteit van de chloroplasten. Het is bovendien bekend dat in verouderende bladeren geen incorporatie van radioactief gemerkt uracil en leucine in ribosomaal-RNA van chloroplasten en „fraction I protein" meer plaatsvindt (vgl. Patterson en Smillie, 1971). Beide hypothesen zijn echter onvoldoende om de waargenomen symptomen geheel te verklaren. Een regelmatige distributie van AMD zou een regelmatige chlorose doen verwachten in plaats van echte mozaïeksymptomen. Omgekeerd leidt gebrek tot een regelmatige chlorose en niet tot mozaïek. Voorts vertonen de geïnoculeerde - dit zijn veelal de oudere - bladeren nagenoeg geen symptomen terwijl de virusconcentratie hierin het hoogst oploopt (Copeman *et al.*, 1969). Bovendien verschillen verschillende stammen en mutanten van TMV in de kleurschakeringen van het mozaïek dat zij na infectie op tabak teweegbrengen. Dat verschillen in de doeltreffendheid waarmee transcriptie van het chloroplast-DNA wordt geremd en/of in de mate van vermenigvuldiging van het virus in de waardplant hiervoor alleen verantwoordelijk zouden zijn, kan in dit laatste geval niet worden uitgesloten, maar lijkt minder waarschijnlijk.

Donkergroene bladgedeelten van mozaïekzieke tabak bevatten veel minder virus dan lichtgroene of gele gedeelten (Atkinson en Matthews, 1967, 1970), klaarblijkelijk als gevolg van de aanwezigheid van een agens dat vermenigvuldiging van het infecterende virus belemmert in de donkergroene gedeelten (Atkinson en Matthews, 1970). Dit verschijnsel vertegenwoordigt daarmee een zekere vorm van resistentie, welke specifiek lijkt te zijn voor de infecterende virusstam. Een dergelijke opvatting is ook verenigbaar met het gedrag van TMV HR in Samsun planten, daar verhoging van de tempe-

ratuur tot 30° in deze combinatie tot een systemische infectie leidt, terwijl het door de W U1 stam veroorzaakte mozaïekpatroon geen belangrijke wijzigingen ondergaat bij temperatuursverhoging. Verhoging van de temperatuur van 20 naar 30° in 45 dagen tevoren met TMV (U1) geïnoculeerde Samsun tabak leidt echter wel tot een hernieuwde virussynthese (Cabanne en Martin, 1970).

Hoewel virusafhankelijke functies betrokken moeten zijn bij de vermenigvuldiging en de symptoomontwikkeling, werden in de oplosbare eiwitfractie geen door het virus gecodeerde eiwitten waargenomen die bij deze processen een rol zouden kunnen spelen. Het is daarom aannemelijk dat zij in andere fracties gezocht moeten worden: wat betreft de symptoomontwikkeling mogelijk in de chloroplasten en wat betreft de virusvermenigvuldiging in de membraanfractie die tezamen met de mitochondriën sedimenteert (Ralph en Wojcik, 1969; Ralph *et al.*, 1971). Door Zaitlin en Hariharasubramanian (1970a,b) werd in laatstgenoemde fractie uit 4 dagen tevoren met TMV geïnoculeerde Samsun planten die behandeld waren met AMD en radioactief gemerkt leucine, bij elektroforese in 5% polyacrylamidegels in aanwezigheid van SDS een viertal eiwitten waargenomen die preferentiëel gemerkt werden, terwijl een ander eiwit klaarblijkelijk in verminderde mate gesynthetiseerd werd. Het snelst migrerende sterk gemerkte eiwit werd geïdentificeerd als het vrije manteleiwit (monomeer). De aard van de overige vier eiwitten is niet duidelijk, daar het gebruik van SDS het vaststellen van enige functie of activiteit verhindert. Het is daarom niet na te gaan of het hier door de plant of door het virus gecodeerde eiwitten betreft.

Het feit dat in geïnfecteerde planten voortdurend nieuwe cellen geïnfecteerd worden en slechts een deel van de aanwezige cellen grote hoeveelheden virus produceert, vormt een belemmering voor het onderzoek naar door het virus gecodeerde eiwitten. Door Nilsson-Tillgren *et al.* (1969) is een systeem beschreven waarbij in tabaksbladeren een gesynchroniseerde TMV-synthese bereikt kan worden. Veelbelovender lijkt momenteel echter het gebruik van naakte protoplasten van tabakscellen (Takebe *et al.*, 1968), waarbij tot 90% van de cellen synchroon geïnfecteerd kan worden met TMV of TMV-RNA en zeer sterke virusvermeerdering plaatsvindt (Takebe en Otsuki, 1969; Aoki en Takebe, 1969).

Het ontstaan van lokale vlekken gaat gepaard met een veel geringere virussynthese (Weintraub en Ragetli, 1964a; Milne 1966b). Ook in op infectie met TMV hypersensitief reagerende tabak treden veranderingen op in de chloroplasten en wel vóór het optreden van necrose en later in de zone rondom de lokale vlekken waarin virusvermenigvuldiging plaatsvindt (Hayashi en Matsui, 1963, 1965; Weintraub en Ragetli, 1964b,c; Hrsel en Brck, 1964; Israel en Ross, 1967; Scalla *et al.*, 1969; Carroll en Kosuge, 1969; Ross en Israel, 1970). In de zich uitbreidende lokale vlek gaan vervolgens alle organellen te gronde tijdens het voortschrijdende necrotiseringsproces. Indien vermindering van de elektroforetische mobiliteit van de „fraction I protein“ band ook in dit geval zou optreden, zou deze toch door de relatieve overmaat aan niet-geïnfecte-

teerde cellen niet manifest zijn.

In alle combinaties waarin door virus geïnduceerde symptomen van necrose optraden werden één of meer nieuwe eiwitcomponenten geïnduceerd. Kwalitatief beschouwd waren deze componenten karakteristiek voor de waardplantsoort, kwantitatief gezien bleken de onderlinge verhoudingen enigszins te variëren met de waardplantvariëteit en het infecterende virus, terwijl deze verhoudingen evenmin constant waren gedurende de pathogenese. Hieruit volgt dat het onwaarschijnlijk is dat deze componenten selectieve afbraakprodukten zijn van een of enkele grotere eiwitmoleculen. Het feit dat aan deze componenten geen functie kon worden toegekend, moet daarom andere redenen hebben. Het is mogelijk dat het hier structurele eiwitten betreft, enzymatisch werkzame eiwitten die bij het vrijkomen uit celorganellen hun activiteit hebben verloren, enzymatisch actieve eiwitten die een andere functie bezitten dan die welke werden onderzocht, of factoren die een regulerende rol vervullen. De experimenten met met A'11 behandelde planten en de incorporatieproeven maken een uitsluitend vrijkomen zonder *de novo* synthese van deze eiwitcomponenten onwaarschijnlijk. Al lijken daarmee de beide laatstgenoemde mogelijkheden het meest voor de hand liggend, synthese in organellen en daaropvolgend vrijkomen door afbraakreacties is evengoed mogelijk.

Dat de waargenomen nieuwe componenten soortspecifiek zijn, is eveneens af te leiden uit resultaten van Gianinazzi *et al.* (1969, 1970a). Bij gebruikmaking van een overeenkomstige methodiek werd door deze auteurs in bij 20° met TMV geïnoculeerde Xanthi-nc planten aanvankelijk één nieuwe band waargenomen bij R_f 0,65 of 0,77 bij elektroforese in 7,5% gels, die ontbrak in bij 30° geïnfecteerde planten. Bij gelfiltratie over Sephadex en daaropvolgende elektroforese van de laatst geëluëerde fracties in 10% gels bleken evenwel acht nieuwe banden aanwezig. Deze zijn klaarblijkelijk vergelijkbaar met de door ons in 5.7.2 beschreven banden 0,22, 0,25, 0,37 en 0,46 in 7,5% gels, de nieuwe componenten I, III en IV, en de door ons in 5.8.1 beschreven nieuwe ribonucleaseband 0,63 in 10% gels. Het ontbreken van de overige door ons als (mogelijk) nieuwe banden beschreven componenten, waaronder component II, moet worden toegeschreven aan het feit dat genoemde auteurs de overige fracties niet geanalyseerd hebben: bij vergelijking met het in 5.7.2 beschrevene blijken dit juist die banden te betreffen die bij gelfiltratie in de eerdere fracties werden geëluëerd. In hypersensitief reagerende *N. sylvestris* bleken ten dele dezelfde, ten dele andere nieuwe componenten op te treden (Gianinazzi *et al.*, 1970a).

De nieuwe componenten bleken in Xanthi-nc planten 10 dagen na inoculatie eveneens aanwezig in niet-geïnoculeerde gedeelten van gedeeltelijk geïnfecteerde bladeren (Gianinazzi *et al.*, 1970a). De auteurs delen mee dat dezelfde componenten bovendien aanwezig waren in systemisch met T.MV geïnfecteerde Samsun en Xanthi-nc planten bij respectievelijk 20 en 32°, maar alleen op het moment waarop de virussynthese afneemt of beëindigd is. De extra sterke remming van de virusvermeerdering in bloeiende planten (Martin, 1958b; Grison en Martin, 1961) zou eveneens op het voorkomen van deze nieuwe componenten berusten (Gianinazzi, persoonlijke mededeling). Wij waren echter

niet in staat de aanwezigheid van nieuwe componenten vast te stellen in S III van bloeiende of beginnende bloemknopvorming vertonende Samsun NN planten (Van Loon, niet gepubliceerd). Het is echter niet uitgesloten dat zeer kleine hoeveelheden hiervan aanwezig waren en reeds een effect tweewegbrachten. Het is echter ook mogelijk dat onder dergelijke condities nieuwe componenten slechts optreden wanneer de planten geïnfecteerd worden. Zowel in hypersensitief als in met systemische mozaïeksymptomen reagerende tabak zou het voorkomen van deze componenten dan gebonden kunnen zijn aan beëindiging van de virussynthese, en daardoor vergelijkbaar zijn met de vorming van interferon in dierlijke cellen na virusinfecties. Door ons werden indirecte aanwijzingen verkregen dat de nieuwe componenten inderdaad een rol zouden kunnen spelen bij de belemmering van de virusvermenigvuldiging. Deze belemmering kan echter nooit een volledige remming zijn omdat hernieuwde virussynthese plaatsvindt bij overbrenging van hypersensitief reagerende planten naar 30°.

Met uitzondering van CMV (vgl. 4.3), brachten de overige onderzochte virussen dezelfde symptomen tweeweg op de variëteiten Samsun en Samsun NN en waren de onder invloed van infectie met één van deze virussen optredende veranderingen in de eiwitpatronen identiek. In geen van deze gevallen kon, als na infectie met TMV, het voorkomen van een virusspecifiek oplosbaar antigeen (vrij manteleiwit) worden aangetoond. Mozaïeksymptomen verwekkende virussen brachten relatief weinig opvallende kwantitatieve veranderingen tweeweg in de eiwitpatronen, ten dele identiek met die welke geïnduceerd werden door TMV; onder invloed van symptomen van necrose inducerende virussen daarentegen wijzigden de eiwitpatronen zich met name kwantitatief in sterke mate (vgl. Tabel 4.1). De bij elektroforese van S III verkregen patronen geven aanleiding te concluderen dat de waargenomen kwantitatieve veranderingen in deze gevallen algemeen, d.i. niet specifiek voor het betrokken virus zijn. Een deel van deze veranderingen kan daarom waarschijnlijk, evenals dat het geval is na infectie met TMV, toegeschreven worden aan kwalitatieve verschillen die eerst onderkend kunnen worden na voorafgaande gelfiltratie over Sephadex G 100.

In al deze gevallen werd tevens het optreden van de nieuwe eiwitcomponenten I-IV waargenomen. Hieruit volgt dat, of het virus nu wel of niet in staat is zich door de gehele plant heen te verspreiden, het optreden van necrose beschouwd moet worden als een specifieke reactie. Het is daarom mogelijk dat necrotisering een algemeen resistentiemechanisme vertegenwoordigt, dat na infectie met sommige pathogenen wel en bij aanwezigheid van andere niet effectief is. Dit mechanisme verschilt echter duidelijk van de gevolgen van mechanische beschadiging, omdat kunstmatige necrose door HgCl₂ geheel andere veranderingen in de eiwitpatronen tweewegbracht (vgl. 4.7). Daar resistentie een algemeen, vatbaarheid een uitzonderingsverschijnsel is, en in tabak overgevoeligheid gekenmerkt wordt door specifieke, gevoeligheid door meer specifieke verschillen in de oplosbaar eiwitpatronen, is het merkwaardig dat na infectie met sommige virussen (i.c. PVY⁰ en CMV) die vlekkerigheid of mozaïeksymptomen veroorzaken, sommige of alle nieuwe componenten I-IV werden waargenomen die in sterke mate op de

voorgond traden bij het optreden van necrose. Men moet echter met de mogelijkheid rekening houden dat één of meer van de overige in 5.7.2 beschreven nieuwe componenten in relatief geringe mate ook in één of meer van de overige combinaties waarin mozaïeksymptomen ontstaan, geïnduceerd worden. Bepaling van de specificiteit van deze componenten door gelfiltratie van eiwitextracten uit de diverse combinaties verdient daarom nadere aandacht.

Symptoomontwikkeling en -expressie in de variëteiten Samsun en Samsun NN bleken te verschillen na infectie met CMV (vgl. 4.3). Dit zou betekenen dat de aanwezigheid van de 11g chromosomen uit *N. glutinosa* ook invloed heeft op de pathogenese in met CMV geïnfecteerde tabak. Of dit berust op de *NN* genen of op hiermee gekoppelde factoren is niet na te gaan. In het eerste geval kan men verwachten dat de vermenigvuldiging van CMV zal interfereren met die van TMV. Dit is inderdaad het geval. Xanthi-nc planten die geïnfecteerd zijn met CMV zijn verminderd vatbaar voor TMV. Dit effect is maximaal 8-16 dagen na inoculatie en neemt daarna af (Marrou en Migliori, 1969). Java planten vertonen eenzelfde verschijnsel, waarbij bovendien de door een tweetal TMV-stammen op deze variëteit geïnduceerde lokale vlekken bij aanwezigheid van CMV een geringere diameter bezitten (Prochazkova, 1970). In hoeverre in met CMV geïnfecteerde, systemisch op TMV reagerende combinaties de vermenigvuldiging van beide virussen geremd wordt, is niet nagegaan. Dat interactie optreedt is echter af te leiden uit resultaten van Honda en Matsui (1969) dat in aanwezigheid van CMV TMV-deeltjes in de kernen van tabaksbladeren voorkomen, terwijl dit bij enkelvoudige infectie met TMV niet het geval is. Bovengenoemde resultaten zouden geïnterpreteerd kunnen worden als een competitie tussen CMV en TMV, maar het is ook mogelijk dat een mechanisme van de plant de vermenigvuldiging van CMV afremt en daarmee tevens de infectie door TMV belemmert (Marrou en Migliori, 1969). Daar eenzelfde verschijnsel zich voordoet na infectie met PVY, maar niet na infectie met PVX (Prochazkova, 1970; Davis en Ross, 1965, 1968), kunnen de nieuwe componenten hierbij een rol spelen.

Door Marrou en Migliori (1969) wordt vermeld dat de interferentie het sterkst was in de oudste bladeren en door Prochazkova (1970) dat de intensiteit van de symptomen een maat is voor de interferentie. In Samsun planten ontstonden na infectie met CMV eerder symptomen dan in de variëteit Samsun NN en waren de hoeveelheden der nieuwe componenten 4 weken na inoculatie groter. In tegenstelling tot de veranderingen in enzymactiviteiten, die in de latere stadia van de infectie geringer worden (vgl. Tabel 1.4), bleven de hoeveelheden van de nieuwe componenten in geïnfecteerde bladeren toenemen. Het verschil tussen de hoeveelheden van deze componenten in met CMV geïnfecteerde Samsun en Samsun NN planten zou daarom, in overeenstemming met de gepostuleerde werking van deze componenten, verklaard kunnen worden door aan te nemen dat zij gelokaliseerd zijn in de oudere bladeren die symptomen vertonen. Hierin kunnen zij een rol gespeeld hebben bij de cyclische variatie in de virusconcentratie die in met CMV geïnfecteerde planten vastgesteld is (Tomaru *et al.*, 1969) en eventuele beëindi-

ging van de virussyntese op een later tijdstip (vgl. Gianinazzi *et al.*, 1970a). Een dergelijke lokalisering zou eveneens verklaren waarom TMV op met CMV geïnfecteerde Samsun NN planten op de oudere bladeren kleinere, op de jonge bladeren grotere vlekken induceert dan op niet-geïnfecteerde planten.

Door een aucubastam van TMV (Limasset, 1969; Boudon *et al.*, 1970) worden op Samsun tabak symptomen geïnduceerd die niet te onderscheiden zijn van die van de gele stam van CMV op Samsun NN planten. Ook in eerstgenoemde combinatie treden de nieuwe componenten op (Gianinazzi, persoonlijke mededeling). Dit voorkomen lijkt dus eerder te wijzen op een verband met het optreden van de intens gele mozaïeksymptomen, dan dat hun aanwezigheid karakteristiek geacht kan worden voor CMV.

In hypersensitief reagerende tabak bleek 3-4 dagen na inoculatie met TMV de incorporatie van radioactief gemerkte aminozuren in de oplosbare eiwitten aanzienlijk geremd te zijn. Deze remming is niet toe te schrijven aan een verlies van ribosomen; deze zijn zelfs talrijker in de zone rondom de lokale vlekken (Israel en Ross, 1967), waarin een enorme synthetische activiteit plaatsheeft (vgl. Thrower, 1965; Doke en Hirai, 1970a). Daarentegen vermelden Diringer *et al.* (1967) dat de incorporatie van radioactief gemerkte aminozuren in met systemische mozaïeksymptomen reagerende tabak sterk verhoogd is. Deze verhoging komt grotendeels voor rekening van de TMV-synthese (Diringer *et al.*, 1967; Gianinazzi *et al.*, 1970a; Scalla *et al.*, 1971). De synthese van de oplosbare bladeiwitten blijkt in de experimenten van eerstgenoemde auteurs licht verhoogd, maar in die van laatstgenoemde geremd. Een remming is ook af te leiden uit de resultaten van Hirai en Wildman (1969). Bij toediening van $^{14}\text{CO}_2$ bleken in systemisch geïnfecteerde bladeren vlekjes voor te komen met een lokaal verhoogde radioactiviteit (Doke en Hirai, 1970a), maar de incorporatie in eiwitten bleek niet duidelijk verschillend in geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde bladeren (Doke en Hirai, 1970b). Wel bleek in deze experimenten de incorporatie in chloroplastcomponenten aanzienlijk geremd (vgl. Hirai en Wildman, 1969). Volgens Reddi (1963) zou de TMV-synthese geschieden ten koste van de ribosomen. Door Atkinson en Matthews (1967) en Kubo en Tomaru (1967) is inderdaad een vermindering van het aantal ribosomen waargenomen in de lichte gedeelten van geïnfecteerde bladeren, waarin sterke virusvermeerdering had plaatsgevonden. Deze afname zou een verklaring kunnen vormen voor een blijvend verminderde synthese van oplosbare eiwitten in bladeren waarin de virussyntese grotendeels of geheel beëindigd is. Dit zou overeenstemmen met onze waarneming dat systemisch met TMV geïnfecteerde tabaksbladeren minder oplosbaar eiwit bevatten dan niet-geïnfecteerde bladeren.

Door Scalla *et al.* (1971) is vastgesteld dat na overbrenging van bij 32° met TMV geïnfecteerde Xanthi-nc planten naar 20° de eiwitsynthese onverminderd voortgaat tot het verschijnen van symptomen van necrose. Vanaf dat moment wordt de eiwitsynthese in toenemende mate geremd. Het lijkt er dus op dat ook deze remming het gevolg is van het optreden van necrose. Het is in dit verband van belang na te gaan in hoeverre eenzelf-

de abrupte verandering optreedt bij het ontstaan van lokale vlekken bij 20° en of deze remming onmiddellijk een algemeen, dan wel een meer specifiek karakter heeft.

De nauwe correlatie tussen de aanwezigheid van de nieuwe componenten en het optreden van verworven systemische resistentie vormt nog geen directe aanwijzing dat het voorkomen van deze componenten de oorzaak is van het optreden van kleine lokale vlekken. In de jonge, zich na inoculatie ontwikkelende bladeren treden naast de aanwezigheid der nieuwe componenten nog verdere verschillen van kwantitatieve (vgl. 5.5) en vermoedelijk ook kwalitatieve (vgl. 5.7.2) aard op met niet-geïnfecteerde planten. In tegenstelling tot de activiteiten van alle andere onderzochte enzymen die in met TMV W U1 geïnoculeerde Samsun NN planten lokaal toenemen, is de peroxidase-activiteit in de niet-geïnoculeerde bladeren systemisch verhoogd en deze verhoogde peroxidase-activiteit is eveneens gecorreleerd met het optreden van verworven resistentie (Simons en Ross, 1971; Van Loon en Geelen, 1972). Dit verschijnsel is onafhankelijk van het optreden van de nieuwe isoënzymband bij R_f 0,12. Het lijkt er daarom op dat hoge peroxidase-activiteiten als zodanig in necrotiserende combinaties de uitbreidingssnelheid van lokale vlekken kunnen verminderen en daardoor (mede) verantwoordelijk kunnen zijn voor het tot expressie komen van verworven systemische resistentie (vgl. Van Loon en Geelen, 1972). De vorming van lokale vlekken na inoculatie met TMV met kleinere diameters als gevolg van voorafgaande bespuiting met $HgCl_2$ zou mogelijkerwijs gedeeltelijk terug te voeren zijn op de onder invloed van deze behandeling optredende verhoogde peroxidase-activiteit in de bladeren. De in 5.6.3 beschreven remming van de TMV-synthese in tevoren met TNV geïnoculeerde Samsun planten zou eveneens kunnen berusten op dit verschijnsel, daar na de eerste inoculatie een sterk verhoogde peroxidase-activiteit gehandhaafd bleef in de jonge, symptoomloze bladeren.

Veranderingen in het isoënzypatroon van peroxidase na virusinfecties zijn beschreven voor verschillende virus - waardplant combinaties, waaronder vooral in tabak. In enkele gevallen wordt melding gemaakt van het verschijnen van nieuwe isoënzymen die klaarblijkelijk niet tevens geïnduceerd werden bij veroudering, zoals in *N. glutinosa* na infectie met TMV of TNV of inductie van kunstmatige necrose met behulp van $HgCl_2$ (Solymosy *et al.*, 1967), of na infectie met TMV of PVX (Chant en Bates, 1970). Dit was niet het geval in *N. tabacum* na infectie met TMV of tabakstrepenvirus (Novacky en Hampton, 1968). Laatstgenoemde auteurs wijten de resultaten van Solymosy *et al.* (1967) aan onvermogen tot het aantonen van banden met lage activiteit die sterk toenemen na infectie. De door Solymosy *et al.* (1967) en Chant en Bates (1970) weergegeven patronen komen niet met elkaar overeen, zodat een vergelijking onmogelijk is.

In geen van bovengenoemde gevallen werd een nieuwe band waargenomen die specifiek is voor virusinfecties, en met name in extreem sterke mate optrad na het verschijnen van symptomen van necrose. Kleuring op peroxidase-activiteit na elektroforese van extracten uit niet-geïnfecteerde en met TMV geïnfecteerde *N. glutinosa* planten bevestigde het ontbreken van een dergelijke band in deze soort (Van Loon, niet gepubliceerd).

Dit enzym lijkt dus karakteristiek voor *N. tabacum*. Dat Novacky en Hampton (1968) dit isoënzym niet hebben waargenomen is te wijten aan het feit, dat zij benzidine als waterstofdonor gebruikten (vgl. 5.8.2).

Het optreden van het nieuwe isoënzym van peroxidase kon niet geremd worden door AMD, doch werd door dit antibioticum ongeveer 50% gestimuleerd, evenals alle andere aanwezige isoënzymen van dit enzym. Mits toegediend kort voor of kort na inoculatie, verkleinde AMD bovendien de diameters van de gevormde lokale vlekken (Van Loon en Geelen, 1972). Deze waarnemingen pleiten voor een remmend effect van peroxidase op de uitbreiding van de lokale vlekken in de eerste stadia van infectie. De nieuwe componenten verschenen pas nadat duidelijke vlekken gevormd waren en zouden daarom in de latere stadia de uitbreiding van het virus in het blad kunnen belemmeren.

Door Loebenstein *et al.* (1966) en White (1968) is inductie van een, met interferon vergelijkbare, factor gepostuleerd die zowel lokaal als systemisch actief zou zijn. Volgens Solymosy (1970) is verworven lokale resistentie specifiek en moet deze toegeschreven worden aan de door het virus geïnduceerde verhoogde synthetische activiteit in de cellen rondom de zich ontwikkelende lokale vlek; daarentegen acht hij systemische resistentie, al of niet als gevolg van de produktie van een AVF, niet specifiek. Deze auteur neemt aan dat iedere vorm van „stress“ die langere tijd aanhoudt, tot activering van synthetische processen leidt welke resistentie tot gevolg hebben. De inductie van een met interferon vergelijkbare factor is echter nooit direct aangetoond, terwijl onze waarneming dat AMD de hypersensitieve reactie versterkt, aan de conclusie van Loebenstein *et al.* (1968, 1969; vgl. 1.4) de grond ontnemt. Weliswaar kan in dierlijke cellen de door interferon geïnduceerde anti-virus activiteit gestimuleerd worden door AMD (Tan *et al.*; 1970; Chany *et al.*, 1971), maar dit effect is tijdsafhankelijk en de produktie van interferon in geïnfecteerde cellen wordt na korte tijd geremd door dit antibioticum (Tan *et al.*, 1970). De door ons waargenomen nieuwe componenten worden, tenminste gedeeltelijk, geremd door AMD en kunnen dus niet zonder meer verantwoordelijk zijn voor de lokalisering van het virus in bladeren die verworven resistentie vertonen.

Het feit dat AMD de hypersensitieve reactie versterkt, zou ook verklaard kunnen worden doordat dit antibioticum de vorming van een bepaald eiwit remt (vgl. 1.4; Thomas en Fulton, 1966, 1968b). In dat geval zou inductie van verworven resistentie door virusinfecties het gevolg kunnen zijn van de gesignaleerde remming van de eiwit-synthese, terwijl verhoogde peroxidase-activiteit als een begeleidend verschijnsel van dit laatste zou zijn op te vatten (vgl. Opel, 1965; Farkas en Lovrekovich, 1965). Een duidelijke daling of een totaal verlies van een band in patronen van Samsun NN tabak of *N. glutinosa* na infectie met T.MV, maar niet in die van mozaïekzieke Samsun planten, is zonder meer verdedigbaar, daar het niet eenzelfde band hoeft te betreffen in beide waardplantsoorten. Daar in tabak verworven resistentie ook geïnduceerd kan worden door PVY⁰ zou in deze soort dezelfde band in beide met dit virus geïnfecteerde variëteiten gedaald moeten zijn. Deze beperking maakt duidelijk dat het niet één van

de banden kan betreffen die in tabel 4.1 zijn aangegeven. De remming van de incorporatie in een groot aantal banden na infectie van Samsun NN planten met TMV of na inspuiting met AMD maakt een dergelijke verklaring echter niet onmogelijk.

In boon vindt evenals in tabak beïnvloeding van de vlekvorming als gevolg van een tweede inoculatie plaats door bij een eerste inoculatie gevormde vlekken van TMV of TNV (Wolffgang, 1969a,b), waarbij transport van „necrotiserende stoffen" plaatsvindt (Wolffgang, 1969b). De factor die in dit geval verantwoordelijk is voor het gelokaliseerd blijven van het virus is van structurele aard, en wel vorming van callose rondom de lokale vlek (Wu en Dimitman, 1970) en verbreken van plasmodemesnata tussen cellen in deze zone (Spencer en Kimmins, 1971). Thomas en Fulton (1968b) hebben gesuggereerd dat dit laatste ook een rol zou kunnen spelen bij verworven resistentie in tabak.

De vorming van callose wordt verhinderd door bestraling met U.V. licht (Wu en Dimitman, 1970) of door hittebehandeling (Wu *et al.*, 1969). De vergroting van de vlekdiameters als gevolg hiervan kan resulteren in een toename van het aantal zichtbare vlekken wanneer de oorspronkelijke vlekken microscopisch klein zijn, en in een toename van de hoeveelheid virus (Rappaport en Wu, 1963; Wu *et al.*, 1969).

Bestraling met U.V. licht vergroot eveneens de door TMV geïnduceerde lokale vlekken in tabak (Loebenstein *et al.*, 1970). Een korte hittebehandeling vóór het verschijnen van lokale vlekken in met dit virus geïnoculeerde Samsun NN planten had daarentegen een aanzienlijke reductie in vlekdiаметer tot gevolg (Ross en Israel, 1970). Genoemde auteurs schrijven dit effect toe aan activering van een resistentiemechanisme van de waardplant, maar een even goede verklaring is inactivering van een eiwit dat verantwoordelijk is voor uitbreiding van de vlekken (zie boven). Hittebehandeling ná het verschijnen van vlekken leidde tot collaps van een ring van cellen rondom de vlek en daarmee tot een vergroting van de vlekdiаметer. Deze behandeling remde de virusvermenigvuldiging en verhinderde klaarblijkelijk iedere verdere verspreiding van het virus (Ross en Israel, 1970). Een dergelijke collaps treedt ook op in geïnoculeerde bladeren onder condities waarin een systemische infectie plaatsvindt, maar verhindert in dat geval niet de verspreiding van het virus (Foster en Ross, 1968; Shimomura en Ohashi, 1971; Ohashi en Shimomura, 1971a,b). Boon en tabak blijken dus te verschillen in de hittegevoeligheid van de weefsels waarin virusvermenigvuldiging plaatsvindt. Dit verschil laat daarom niet toe een uitspraak te doen of het mechanisme van de viruslokalisering in tabak hetzelfde is als, of verschillend van dat in boon. Door Weintraub en Ragetli (1961) werd waargenomen dat de celwanden rondom lokale vlekken op tabak vooral calciumpectinaat bevatten, in tegenstelling tot normale celwanden die hoofdzakelijk pectinezuur bevatten. Het is mogelijk dat dit verschil een rol speelt bij de lokalisering van het virus.

Terwijl enige factoren kunnen worden aangewezen die mogelijkerwijs de symptoomexpressie beïnvloeden, is de vraag wat de biochemische grondslag van de symptoominduc-

tie is, geheel onopgehelderd gebleven. Hoewel Samsun, evenals Samsun NN tabak, in staat is met lokale vlekken te reageren na inoculatie met TMV, komt dit resistentiemechanisme in eerstgenoemde variëteit niet tot uiting na infectie met TMV. Dit suggereert dat primair de genexpressie beïnvloed is (Kuc, 1968). Door Hadwiger en Schwochau (1969) is een mechanisme opgesteld dat de inductie van een resistentiereactie verklaart op grond van genactivering. In het geval de resistentiegenen in de waardplant en de avirulentiegenen van het pathogeen dominant zijn, zou het pathogeen de synthese bewerkstelligen van verbindingen die de resistentiegenen van de waardplant activeren door combinatie met, of interferentie met de synthese van een repressor. Het produkt van de resistentiegenen van de waardplant zou vervolgens veranderen in, of desorganisatie van het celmetabolisme bewerkstelligen, hetgeen een hypersensitieve reactie tot gevolg zou hebben. Vergelijkbare verschijnselen kunnen in zo'n geval worden teweeggebracht door AMD en andere verbindingen die de conformatie van DNA wijzigen en daarmee de synthese van de repressor kunnen remmen (Schwochau en Hadwiger, 1969). Toegepast op de combinatie TMV W U1 - Samsun NN zou het virus aanleiding moeten geven tot de vorming van een produkt dat repressie van de voor de hypersensitieve reactie verantwoordelijke genen opheft. Dit lijkt zeer onwaarschijnlijk daar bij mutatie van het virus de eigenschap systemische mozaïeksymptomen op Java tabak teweeg te brengen wordt gewijzigd in de eigenschap lokale vlekken op deze variëteit te verwekken. TMV W U1 mag dus beschouwd worden als een pathogeen waarin virulentie dominant is over avirulentie, zodat het door Hadwiger en Schwochau opgestelde mechanisme voor de combinatie TMV - tabak klaarblijkelijk niet van toepassing is. Hoewel AMD de hypersensitieve reactie van met TMV geïnoculeerde Samsun NN planten versterkt, is dit effect primair van kwantitatieve en niet van kwalitatieve aard. Immers, dit antibioticum kan, indien toegediend aan Samsun planten korte tijd voor inoculatie met TMV, de reactie van de plant niet wijzigen ten gunste van een hypersensitieve reactie. Integendeel, het is in staat zelf mozaïeksymptomen teweeg te brengen (Hirai en Wildman, 1967). Het lijkt daarom aannemelijker dat TMV W U1 en AMD in Samsun tabak op eenzelfde wijze met het genoom interfereren, waarbij een hypersensitieve reactie uitblijft. Door Fraser (1969) is het door Jockusch en Jockusch (1968) voorgestelde mechanisme waarbij het manteleiwit een rol speelt bij de symptoomvorming, onwaarschijnlijk gemaakt, zodat ook in dat geval een interactie op genetisch niveau voor de hand ligt. Het is interessant dat mozaïeksymptomen in *N. glutinosa* in afwezigheid van virus eveneens geïnduceerd kunnen worden door plaatsing van de planten gedurende 4-8 dagen bij 38° (John en Weintraub, 1966; Weintraub en John, 1966).

Voor het optreden van de hypersensitieve reactie is virusvermenigvuldiging noodzakelijk (Martin, 1966; Osawa en Yamaguchi, 1970; Shiomura, 1971), maar ook factoren de plant betreffende spelen een rol. Virusvermenigvuldiging kan plaats hebben zonder dat vlekken gevormd worden op bladeren waarvan de epidermis, of op middennerf waarlangs het bladmoes verwijderd is (Yamaguchi en Shimomura, 1968). Het aftrekken van de bovenepidermis van 20 uur tevoren geïnoculeerde bladeren leidt tot het optreden van

diffuse lichtbruine of bruinwitte vlekken, terwijl aftrekken van de onderepidermis onder dezelfde omstandigheden het ontstaan van normale lokale vlekken niet verhindert (Dijkstra, 1964). De structurele organisatie van de plant komt dus ook een belangrijke rol toe.

Het feit dat in TMV - tabak combinaties die leiden tot een hypersensitieve reactie in een zeer vroeg stadium de incorporatie van ^{32}P in energierijke fosfaatesters geremd is, heeft geleid tot de veronderstelling dat ont koppeling van de oxidatieve fosforylering de hypersensitieve reactie inleidt (Scalla en Meignoz, 1967). Eenzelfde verschijnsel doet zich echter voor in systemisch met TMV geïnfecteerde tabaksplanten in de latere stadia van de pathogenese (Esanu en Savulescu, 1967; Esanu, 1969). Het lijkt daarom onwaarschijnlijk dat het optreden van de hypersensitieve reactie een direct gevolg van deze veranderingen is.

Volgens Goodman (1968) en Goodman en Plurad (1971) is de door bacteriën geïnduceerde hypersensitieve reactie in tabak een gevolg van veranderingen in de permeabiliteit van celmembranen. De grote snelheid waarmee de reactie optreedt is waarschijnlijk verantwoordelijk voor verschillen in symptoomexpressie tussen de door bacteriën en de door virussen veroorzaakte reactie (Nemeth *et al.*, 1969). Het wit blijven van de lokale vlekken in het eerste geval kan onder die omstandigheden veroorzaakt zijn doordat de tijd voor activering van peroxidase en polyfenoloxidase ontbreekt, zonder dat het mechanisme in beide gevallen verschillend hoeft te zijn. De veranderingen in de ultrastructuur van Samsun NN tabak tijdens de door *Erwinia amylovora* of *Pseudomonas pisii* geïnduceerde hypersensitieve reactie (Goodman en Plurad, 1971) sluiten goed aan bij de beschreven veranderingen in cellen van dezelfde variëteit na infectie met TMV (Ross en Israel, 1970). Een verschil is echter dat de door bacteriën teweeggebrachte reactie beschouwd wordt als het gevolg van de productie van een toxine, en het mechanisme van de hypersensitieve reactie in dat geval analoog geacht kan worden aan dat van de incompatibele reactie van *Cladosporium fulvum* op tomaat (Van Dijkman en Kaars Sijpesteijn, 1971). In laatstgenoemde combinatie wordt een interactie verondersteld tussen produkten van de schimmel en receptoren in de waardplant. De incompatibele reactie manifesteert zich vervolgens door een grotere uitlek van ionen dan de compatibele, hetgeen suggereert dat de receptoren gelegen zijn in de celmembranen. Dat TMV informatie zou bevatten voor de vorming van een dergelijk toxine is, gezien de genetische eigenschappen van het systeem TMV - tabak, nagenoeg uitgesloten.

In bladeren van *N. glutinosa* treden reeds 15-20 uur na inoculatie met TMV beschadigingen van celmembranen op (Weintraub en Ragetli, 1964b), zodat ook na infectie met TMV het optreden van de hypersensitieve reactie kan berusten op veranderingen in membraansystemen. Dit kan des te meer het geval zijn waar de vermenigvuldiging van dit virus zich waarschijnlijk afspeelt aan membraanoppervlakken (Ralph *et al.*, 1971). Het is daarom mogelijk dat Samsun en Samsun NN planten verschillen in bepaalde membraanstructuren, of de NN genen een regulerende functie hebben in de structurele organisatie van de cel. Nu het onderzoek naar oplosbare eiwitten tot nog toe noch door

het virus gecodeerde, noch bij inductie van resistentie betrokken eiwitten aan het licht heeft gebracht, kan onderzoek naar de bestanddelen van membraansystemen in beide variëteiten wellicht nieuwe informatie verschaffen. Technieken voor toepassing van elektroforese in polyacrylamidegel bij het onderzoek van membraaneiwitten zijn de laatste jaren beschikbaar gekomen (Takayama *et al.*, 1966; Neville, 1967, 1968; Fitzpatrick *et al.*, 1969; Evans, 1970; Kiehn en Holland, 1970; Hamaguchi en Cleve, 1971; Ray en Marinetti, 1971). Het feit dat hierbij onder denaturerende omstandigheden wordt gewerkt, behoeft geen bezwaar te zijn wanneer de gedachten in de eerste plaats uitgaan naar verschillen in structurele eiwitten, maar maakt het niet mogelijk aan eventuele virusspecifieke eiwitten activiteit toe te kennen. De bij gebruikmaking van een dergelijke methode door Zaitlin en Hariharasubramanian (1970a,b) behaalde resultaten rechtvaardigen verder onderzoek in deze richting, zowel in verband met de bijdrage van het virus als die van de plant in de pathogenese.

7. SAMENVATTING

De aard en de hevigheid van de reactie van een plant op infectie met een virus worden bepaald door de genetische eigenschappen van zowel virus als waardplant. Van beide komt de genetische informatie tot uiting in de vorming van eiwitten. Om inzicht te verkrijgen in de biochemische achtergrond van het mechanisme van pathogenese en symptoom-expressie en daarmee in de specificiteit van de interactie tussen virus en waardplant, werd nagegaan of inderdaad verschillen in eiwitconstitutie konden worden vastgesteld tussen niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde planten, en in hoeverre eventuele verschillen als karakteristiek beschouwd kunnen worden voor het infecterende virus dan wel voor de betrokken waardplant. Bij dit onderzoek werd gebruik gemaakt van tabaksvariëteiten die verschillen in reactietype ten opzichte van tabaksmozafekvirus (TMV) en van stammen van dit virus die zich onderscheiden in de symptomen die zij op tabak te weegbrengen. Omdat de vermenigvuldiging van TMV zich naar alle waarschijnlijkheid afspeelt in het cytoplasma, werd de oplosbare eiwitfractie onderzocht. Terwijl tot nog toe bij dit soort onderzoek de nadruk is gelegd op veranderingen in enzymactiviteiten, werd door ons in het bijzonder aandacht besteed aan de als gevolg van infectie geïnduceerde veranderingen die niet direct in de vorm van enzymatische activiteit tot uiting komen.

Met behulp van elektroforese in 5, 7,5 en 10% polyacrylamidegel konden in de oplosbare eiwitfractie uit bladeren van *Nicotiana tabacum* ruim vijftig verschillende eiwitcomponenten worden onderscheiden. Geen verschillen in eiwitpatronen werden waargenomen tussen de variëteiten Samsun en Samsun NN, hoewel Samsun planten op infectie met TMV W U1 reageren met de vorming van systemische mozafeksymptomen, Samsun NN planten – die de uit *N. glutinosa* afkomstige factor *N* bezitten – daarentegen met lokale vlekken bij temperaturen beneden 25°. Na infectie traden echter in de beide variëteiten verschillende, karakteristieke veranderingen in eiwitpatronen op. Naast een aantal kwantitatieve veranderingen bleek in mozafekzieke Samsun planten vier weken na infectie één nieuwe band aanwezig. Deze werd geïdentificeerd als het vrije manteleiwit van het virus met behulp van co-elektroforese en serologie. Tevens vertoonde de voornaamste eiwitband een verminderde elektroforetische mobiliteit.

In de geïnoculeerde bladeren van Samsun NN planten bleken een week na infectie vier nieuwe eiwitcomponenten (I-IV) aanwezig. Deze nieuwe componenten staan niet in verband met TMV-manteleiwit. In *N. glutinosa* werd na infectie met TMV W U1 één nieuwe band geïnduceerd en nam de intensiteit van twee andere banden zeer sterk toe, terwijl één band uit het eiwitpatroon verdween. Deze banden verschilden in elektroforetische mobiliteit van de nieuwe banden die werden waargenomen na infectie van Samsun NN planten. Geen van de nieuwe componenten I-IV kan daarom beschouwd worden als produkt van de, van *N. glutinosa* afkomstige, de factor *N* bevattende, Hg chromosomen. Dit werd bevestigd in patronen van Samsun planten die als gevolg van infectie met TMV HR semi-systemische gele, necrotische kringvlekken vertoonden. In deze combinatie bleken

zowel vrij TMV HR-mantelwit als de nieuwe componenten I-IV op te treden.

In met TMV W U1 of TMV HR geïnfecteerde Samsun planten werd slechts een beperkt aantal kwantitatieve veranderingen waargenomen. Daarentegen vertoonden met TMV W U1 geïnfecteerde Samsun NN planten een groot aantal kwantitatieve veranderingen die voor het merendeel niet optraden in beide eerder genoemde combinaties. De grootte van deze veranderingen was gecorreleerd met de vlek Dichtheid op de bladeren.

Wanneer bij 30° als gevolg van infectie met TMV W U1 systemische mozaïeksymptomen geïnduceerd werden in zowel Samsun als Samsun NN planten, werden dezelfde veranderingen waargenomen in de eiwitpatronen van beide variëteiten. Deze veranderingen waren identiek met die in de combinatie TMV W U1 - Samsun bij 20° en die in de combinatie TMV W U1 - Samsun EN, waarin dezelfde symptomen ontstaan. De vorming van lokale vlekken op de variëteit Samsun EN na infectie met TMV HR leidde daarentegen tot het optreden van de nieuwe componenten I-IV. Hieruit blijkt dat in de combinatie TMV - tabak de veranderingen in oplosbare eiwitten samenhangen met het symptoomtype en in alle gevallen van de waardplant afhankelijke veranderingen vertegenwoordigen.

Inductie van lokale of systemische necrose op Samsun en Samsun NN tabak met tabaksnecrosevirus (TNV), tabaksratelvirus (TRV) en aardappelvirus Yⁿ (PVYⁿ) leidde steeds tot het optreden van de vier nieuwe componenten in beide variëteiten, maar de onderlinge verhoudingen der banden verschilden met de gebruikte variëteit en met het lokaal blijven of systemisch worden van het virus. De vier nieuwe componenten werden in relatief lage concentratie waargenomen na infectie met komkommersmozaïekvirus, hoewel in deze combinaties geen necrose optrad. De banden I en II waren aanwezig na infectie met PVY⁰, dat slechts lichte vlekkerigheid veroorzaakt. Hoewel aardappelvirus X (PVX) vergelijkbare symptomen induceert, werden de nieuwe componenten in met dit virus geïnfecteerde planten niet waargenomen. In geen enkele van de combinaties kon de aanwezigheid van virusspecifieke eiwitten worden vastgesteld.

Een groot deel van de in de diverse combinaties waargenomen kwantitatieve veranderingen bleek onder uiteenlopende omstandigheden op te treden en vertegenwoordigde klaarblijkelijk algemene reacties, aangezien dezelfde veranderingen optraden na afsnijden of bevriezen van de bladeren. Daarnaast waren enige veranderingen karakteristiek voor het symptoomtype dat na virusinfectie ontstaat. Door afsnijden of bevriezen van de bladeren of teweegbrengen van kunstmatige necrose door bespuiting met HgCl₂ werden geen nieuwe componenten geïnduceerd. Het merendeel van de kwantitatieve veranderingen die optraden bij door een virusinfectie geïnduceerde necrose werd evenmin waargenomen na inductie van necrose door HgCl₂. Door virusinfecties en kunstmatig geïnduceerde necrose zijn dus duidelijk te onderscheiden op grond van de begeleidende veranderingen in de oplosbare eiwitfractie. Doordat bij afsnijden of bevriezing van de bladeren slechts ten dele dezelfde veranderingen optreden als bij door virusinfecties geïnduceerde necrose, lijken veroudering en beschadiging slechts bijkomstige factoren van de aan dit symptoomtype ten grondslag liggende metabolische veranderingen.

In de combinatie TMV W U1 - Samsun NN verschenen de vier nieuwe componenten aan

het begin van de lokale-vlekvorming. De banden namen in intensiteit toe met de tijd. Vijf dagen na inoculatie eindigde de toename in band I, maar de banden II, III en IV namen toe tot op dag 14. Vanaf dag 7 waren de vier banden eveneens aanwezig in de jonge bladeren die zich na inoculatie hadden ontwikkeld en noch symptomen vertoonden, noch virus bevatten. Ook in deze bladeren namen de banden in intensiteit toe met de tijd. De banden waren eveneens aanwezig in jonge bladeren die zich hadden ontwikkeld na inoculatie met TMV of TRV.

In de combinatie TMV W U1 - Samsun NN was de hoeveelheid van de vier nieuwe componenten gecorreleerd met de vlek Dichtheid. De intensiteit van de banden nam minder sterk toe wanneer de bladeren twee dagen na inoculatie waren ingespoten met actinomycine D (AMD). AMD remde de incorporatie van ^{35}S -methionine en ^{14}C -leucine in de oplosbare eiwitfractie voor 56-60%. Ook infectie met TMV als zodanig remde de synthese van oplosbare eiwitten in sterke mate. Beide effecten bleken tenminste additief. De remming van de hoeveelheid van de nieuwe componenten door AMD bedroeg echter steeds minder dan 50%. Hoewel preferentiële synthese van de nieuwe componenten via elektroforese van gemerkt eiwit niet kon worden aangetoond, wijzen de verhoudingen van de geïncorporeerde radioactiviteit in eiwitten uit geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde planten op een *de novo* synthese die slechts gedeeltelijk geremd wordt door AMD.

De nieuwe componenten zijn geen isoënzymen van een dertigtal onderzochte enzymen en bevatten geen suikers, vetten of RNA. Hun sterke kleuring met coomassieblauw wijst op een hoog gehalte aan basische aminozuren.

Een mogelijk verband tussen het voorkomen van deze nieuwe componenten in jonge, zich ontwikkelende bladeren die geen virus bevatten en de eigenschap van deze bladeren kleine vlekken te vormen na (een tweede) inoculatie met een virus dat lokale vlekken veroorzaakt, werd nader onderzocht. Het bleek dat er een duidelijke correlatie bestaat tussen de aanwezigheid van de nieuwe componenten en het optreden van verworven systemische resistentie. Een effect op aantal of grootte van de vlekken kon echter niet worden vastgesteld bij toediening van de vier nieuwe componenten bevattende eluaten uit gelschijfjes aan de planten, gelijktijdig of 24 uur voor inoculatie met TMV. Wel bleek de vermeerdering van TMV in zich na inoculatie met TNV ontwikkelende bladeren van Samsun planten aanzienlijk geremd te zijn als gevolg van de eerste infectie.

Fractionering met ammoniumsulfaat van gezuiverde eiwitfracties uit niet-geïnfecteerde en met TMV W U1 geïnfecteerde Samsun NN planten leidde tot de waarneming van twee andere nieuwe componenten. Bij gelfiltratie over Sephadex G 100 werden, behalve de nieuwe componenten I-IV, nog acht, langzamer migrerende componenten waargenomen. Deze twaalf nieuwe componenten bezitten alle molecuulgewichten tussen 10.000 en 20.000. Een aantal hiervan werd als kwantitatieve veranderingen waargenomen bij elektroforese van ongefractioneerde extracten. Omdat bij elektroforese van extracten uit niet-geïnfecteerde planten vooral scheiding op grond van molecuulgrootte optreedt, wijken de nieuwe componenten door hun relatief geringe lading af van het merendeel van de overige oplosbare eiwitten uit tabaksbladeren.

Naast deze twaalf nieuwe componenten werd een nieuw isoënzym van ribonuclease en van peroxidase waargenomen. Laatstgenoemd isoënzym onderscheidde zich door een laag pH-optimum en een veel grotere affiniteit tot guaiacol dan tot *o*-difenolen. Het werd geïnduceerd in alle combinaties waarin als gevolg van virusinfectie necrose optreedt en in geringe mate na infectie met PVX en PVY⁰. In de combinatie TMV W U1 - Samsun NN werd een maximale activiteit bereikt wanneer de symptoomontwikkeling als voltooid beschouwd kon worden. Geen van beide nieuwe isoënzymen was aanwezig in jonge, geen virus bevattende bladeren.

Op grond van literatuurgegevens is het niet onaannemelijk dat de nieuwe componenten ook aanwezig kunnen zijn in op TMV-infectie met systemische mozaïeksymptomen reagerende tabak, maar in dat geval alleen wanneer de virusvermeerdering beëindigd is. Het is daarom mogelijk dat zowel in hypersensitief als in met systemische mozaïeksymptomen reagerende tabak het optreden van de nieuwe componenten gebonden is aan beëindiging van de virussynthese, doordat zij de virusvermenigvuldiging direct of indirect remmen. Hun aanwezigheid zou, samen met het optreden van verhoogde peroxidase-activiteit – die gecorreleerd is met een verminderde uitbreidingssnelheid van lokale vlekken – verantwoordelijk zijn voor expressie van verworven resistentie bij een volgende inoculatie. Dit verschijnsel kan echter ook verklaard worden op grond van remming van de vorming van een bepaald eiwit, waardoor al of niet de inductie van nieuwe eiwitten en enzymen bewerkstelligd wordt.

De inductie van de hypersensitieve reactie en van necrose door virussen lijkt te berusten op een algemeen mechanisme. Men kan aannemen dat dit mechanisme door TMV W U1 in Samsun tabak wordt onderdrukt, waardoor het virus zich onbelemmerd kan vermenigvuldigen en verspreiden door de plant.

8. SUMMARY

The nature and the severity of the reaction of a plant to infection by a virus are determined by the genetic properties of both virus and hostplant. The genetic information of both is expressed in the formation of proteins. Our aim was to gain insight into the specificity of the interaction between virus and hostplant by investigating the biochemical mechanism of pathogenesis and symptom expression. Hence, we attempted to show if differences in protein constitution between noninfected and infected plants could indeed be established and whether such differences can be regarded as characteristic of the infecting virus or of the hostplant. In this study we made use of tobacco varieties that differ in reaction type to tobacco mosaic virus (TMV) and of strains of this virus that are distinguished by the symptoms they induce in tobacco. As the multiplication of TMV most probably takes place in the cytoplasm, the soluble protein fraction was investigated. Previous investigations have emphasized alterations in enzyme activities as a result of infection. In contrast to this, our attention was focused on changes in the electrophoretic pattern of protein bands induced by infection, not manifesting themselves immediately under the form of enzymatic activity.

By using electrophoresis in 5, 7.5 and 10% polyacrylamide gel, over fifty different protein components in the soluble protein fraction from leaves of *Nicotiana tabacum* could be distinguished. No differences in protein patterns were observed between non-infected plants of the varieties Samsun and Samsun NN, although Samsun plants react to infection with TMV W U1 by formation of systemic mosaic symptoms, while Samsun NN plants - which contain the factor *N* from *N. glutinosa* - develop local lesions at temperatures below 25°. However, in the two varieties different and characteristic changes in protein patterns appeared upon infection. Apart from a number of quantitative changes, one new band was present in mosaic-diseased Samsun plants four weeks after infection. This band was identified as the free coat protein of the virus by co-electrophoresis and serology. A reduction in the electrophoretic mobility of the major band was also recorded.

In the inoculated leaves of Samsun NN plants four new protein components (I-IV) were present one week after infection. These new components are not related to TMV coat protein. In *N. glutinosa* one new band was induced and two bands increased markedly after infection with TMV W U1, while one other band disappeared. These bands differed in electrophoretic mobility from the new bands observed after infection of Samsun NN plants. Therefore, none of the new components I-IV can be regarded as product of the Hg chromosomes, that are derived from *N. glutinosa* and contain the factor *N*. This was further substantiated by patterns from Samsun plants showing semi-systemic yellow ringspot symptoms as a result of infection with TMV HR. In this combination, both free TMV HR coat protein and the new components I-IV were apparent.

In Samsun plants infected by TMV W U1 or TMV HR only a limited number of quanti-

tative changes was observed. Contrary to this, Samsun NN plants infected by TMV W U1 showed a considerable number of quantitative changes, most of which did not appear in the two combinations mentioned earlier. The extent of these changes correlated with the lesion density on the leaves.

When systemic mosaic symptoms were induced in both Samsun and Samsun NN plants as a result of infection with TMV W U1 at 30^o, identical changes in protein patterns were observed for both varieties. These changes were the same as those in the combination TMV W U1 - Samsun at 20^o and those in the combination TMV W U1 - Samsun EN, in which identical symptoms are induced. On the other hand, the formation of local lesions on the variety Samsun EN upon infection with TMV HR led to the appearance of the new components I-IV. It follows that in the combination TMV - tobacco the changes in soluble proteins are connected with the type of symptoms - either mosaic or local lesions - produced, and that in all cases they are hostplant dependent.

The induction of local or systemic necrosis on Samsun and Samsun NN tobacco with tobacco necrosis virus (TNV), tobacco rattle virus (TRV) and potato virus Yⁿ (PVYⁿ) always led to the appearance of the four new components in both varieties, but the relative proportions of the bands varied with the variety used, and with the characteristic of the virus to remain local or become systemic. Relatively low concentrations of the four new components were observed after infection with cucumber mosaic virus, although no necrosis developed in these combinations. Bands I and II were present after infection with PVY^o, that only causes mild mottling. Although potato virus X (PVX) induces a similar mottling, the new components were not detected in plants infected by this virus. In none of the combinations the presence of virus-specific proteins could be established.

Many of the quantitative changes observed in the various combinations occurred under different conditions and evidently represented general reactions, as similar changes were detected after cutting or freezing of the leaves. Some changes, however, were characteristic of the type of symptoms produced after virus infection. Cutting or freezing of the leaves or production of artificial necrosis by spraying with HgCl₂ induced no new components. The greater part of the quantitative changes occurring as a result of necrosis induced by virus infection were not observed in HgCl₂ induced necrosis either. So necrosis due to virus infection and artificially induced necrosis can be clearly distinguished by the accompanying changes in the soluble protein fraction. Since cutting or freezing of the leaves induces changes that are only partly similar to those observed when necrosis is induced by virus infections, ageing and injury seem to be only minor facets of the metabolic alterations underlying this type of symptom.

In the combination TMV W U1 - Samsun NN the four new components first appeared at the onset of necrosis, and the bands increased in intensity with time. By five days after inoculation band I ceased to increase, whereas bands II, III and IV increased up to day 14. From day 7 onward, the four bands were also present in the young leaves

that had developed after inoculation and neither showed symptoms nor contained virus. In these leaves also, the bands increased in intensity with time. These bands were also present in the young leaves that had developed after inoculation with TMV or TRV.

In the combination TMV W U1 - Samsun NN the amount of the four new components correlated with lesion density. The increase in intensity of the bands was reduced by treatment of the leaves with actinomycin D (AMD) two days after inoculation. AMD inhibited the incorporation of ^{35}S -methionine and ^{14}C -leucine in the soluble protein fraction by 56-60%. Infection with TMV in itself also strongly inhibited synthesis of soluble proteins. These two effects appeared to be at least additive. However, the inhibition of the amount of the new components by AMD always amounted to less than 50%. Although preferential synthesis of the new components could not be demonstrated by electrophoresis of labeled proteins, the ratios of the radioactivities incorporated into protein from infected and noninfected plants point to *de novo* synthesis which can be only partly inhibited by AMD.

The new components are not isoenzymes of thirty enzymes studied, and do not contain carbohydrate, lipid or RNA. Their strong colouration with coomassieblue may indicate a high content of basic amino acids.

A possible relation between the occurrence of these new components in young, developing leaves not containing virus, and the ability of these leaves to react with the formation of small lesions after (a second) inoculation with a virus that induces local lesions, was further investigated. There appeared to be a distinct correlation between the presence of the new components and the state of systemic acquired resistance. However, when eluates from gel slices that contained the four new components were applied to the plants simultaneously or 24 hours before inoculation with TMV, no effect on number or size of the lesions could be demonstrated. On the other hand, the multiplication of TMV in leaves that developed after inoculation of Samsun plants with TMV did appear to be inhibited to a considerable extent as a result of the first infection.

Ammonium sulfate fractionation of purified protein fractions from noninfected and TMV W U1-infected Samsun NN plants revealed two other new components. Upon gel filtration on Sephadex G 100, in addition to the new components I-IV, another eight, more slowly migrating components were detected. These twelve new components all have molecular weights between 10,000 and 20,000. A number of these were observed as quantitative changes upon electrophoresis of unfractionated extracts. During electrophoresis of extracts from noninfected plants separation due to differences in molecular size prevailed. Therefore, the new components differ from the majority of the other soluble proteins from tobacco leaves by their relatively small charges.

In addition to these twelve new components, a new ribonuclease and a new peroxidase isoenzyme were detected. The peroxidase isoenzyme was distinguished by a low pH optimum and a far greater affinity towards guaiacol than towards *o*-diphenols. It was induced in all combinations in which necrosis due to virus infection occurs, and to a

small extent after infection with PVX and PVY⁰. In the combination TMV W U1 - Samsun NN maximal activity was reached when symptom development could be considered complete. The new isoenzymes were not present in young, symptomless leaves not containing virus.

On the basis of data given in the literature, it can be envisaged that the new components might also be present in tobacco plants which, upon TMV infection, react with systemic mosaic symptoms, but in that case only after the multiplication of the virus has stopped. Therefore, it seems possible that both in hypersensitively reacting tobacco plants and in plants that react with systemic mosaic symptoms, the appearance of the new components is connected with a slowing down of viral synthesis through a direct or indirect inhibition of virus multiplication. Their presence, together with the occurrence of increased peroxidase activity – that is correlated with a decreased rate of lesion enlargement – might be responsible for the expression of acquired resistance to subsequent inoculation. However, this phenomenon could also be explained by inhibition of the formation of a specific protein which may not, or in turn may result in the induction of new proteins and enzymes.

The induction of the hypersensitive reaction and of necrosis by viruses seems to be governed by a common mechanism. Presumably TMV W U1 in Samsun tobacco represses this mechanism. This would enable the virus to multiply and spread throughout the plant.

Parts of this study have been published earlier (Van Loon and Van Kammen, 1968, 1970; Van Loon, 1971; Van Loon and Geelen, 1972).

9. LITERATUUR

- Aach, H.G., Funatsu, G., Nirenberg, M.W. en Fraenkel-Conrat, H. (1964). *Biochemistry* 3, 1362-1366.
- Albouy, J. en Lapierre, H. (1969). *C.R. Acad. Sc. Paris D* 268, 220-223.
- Amon, A. en Markakis, P. (1969). *Phytochemistry* 8, 997-998.
- Aoki, S. en Takebe, I. (1969). *Virology* 39, 439-448.
- Atkinson, P.H. en Matthews, R.E.F. (1967). *Virology* 32, 171-173.
- Atkinson, P.H. en Matthews, R.E.F. (1970). *Virology* 40, 344-356.
- Babos, P. en Kassanis, B. (1963). *J. Gen. Microbiol.* 32, 135-144.
- Babos, P. en Shearer, G.B. (1969). *Virology* 39, 286-295.
- Babos, P. (1971). *Virology* 43, 597-606.
- Bald, J.G. (1964). *Virology* 22, 377-387.
- Balls, A.K. en Martin, L.F. (1938). *Enzymologia* 5, 233-238.
- Bates, D.C. en Chant, S.R. (1970). *Ann. Appl. Biol.* 65, 105-110.
- Baur, J.R., Richardson, B., Halliwell, R.S. en Langston, R. (1967). *Virology* 32, 580-588.
- Bobbitt, J.M. (1956). *Adv. Carbohydrate Chem.* 11, 1-41.
- Boudon, E., Martin, C. en Carré, M. (1970). *C.R. Acad. Sc. Paris D* 270, 2508-2511.
- Boyd, J.B. en Mitchell, H.K. (1965). *Anal. Biochem.* 13, 28-42.
- Bozarth, R.F. en Ross, A.F. (1964). *Virology* 24, 446-465.
- Bray, G.A. (1960). *Anal. Biochem.* 1, 279-285.
- Brewer, J.M. (1967). *Science* 156, 256-257.
- Brouwer, D. (1970). *Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen* 70 (6), 1-101.
- Burstone, M.S. (1962). *Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms*, Academic Press, New York.
- Cabanne, F., Scalla, R. en Martin, C. (1968). *Ann. Physiol. Vég.* 10, 199-208.
- Cabanne, F. en Martin, C. (1970). *C.R. Acad. Sc. Paris D* 271, 1599-1602.
- Cabanne, F., Scalla, R. en Martin, C. (1971). *J. Gen. Virol.* 11, 119-122.
- Carroll, T.W. en Kosuge, T. (1969). *Phytopathology* 59, 953-962.
- Carter, N.D. en Parr, C.W. (1967). *Nature* 216, 511.
- Cech, M. (1967). *Phytopath. Z.* 59, 72-82.
- Chant, S.R. en Bates, D.C. (1970). *Phytochemistry* 9, 2323-2326.
- Chany, C., Fournier, F. en Rousset, S. (1971). *Nature New Biology* 230, 113-114.
- Cheo, P.C., Lindner, R.C. en McRitchie, J.J. (1968). *Virology* 35, 82-86.
- Choules, G.L. en Zimm, B.H. (1965). *Anal. Biochem.* 13, 336-344.
- Chrumbach, A., Reisfeld, R.A., Wyckoff, M. en Zaccari, J. (1967). *Anal. Biochem.* 20, 150-154.
- Commoner, B. en Yamada, M. (1955). *J. Gen. Physiol.* 38, 459-473.
- Copeman, R.J., Hartman, J.R. en Watterson, J.C. (1969). *Phytopathology* 59, 1012-1013.
- Davis, B.J. (1964). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.

- Davis, R.E. en Ross, A.F. (1965). *Phytopathology* 55, 1054.
- Davis, R.E. en Ross, A.F. (1968). *Virology* 34, 509-520.
- Determann, H. (1969). *Gel chromatography*, 2e druk, Springer-Verlag, Berlijn.
- Diener, T.O. (1963). *Ann. Rev. Phytopathology* 1, 197-218.
- Diringer, H., Anderer, F.A. en Schramm, G. (1967). *Z. Naturforsch.* 22b, 1280-1291.
- Dische, Z. en Schwarz, K. (1937). *Mikrochim. Acta* 2, 13-19.
- Doekes, G.J. (1969). *Wheat grain proteins*, Proefschrift Leiden, Bronder-Offset N.V., Rotterdam.
- Doke, N. en Hirai, T. (1969). *Phytopath. Z.* 65, 307-317.
- Doke, N. en Hirai, T. (1970a). *Phytopathology* 60, 988-991.
- Doke, N. en Hirai, T. (1970b). *Virology* 42, 68-77.
- Dijkman, A. van, en Kaars Sijpesteijn, A. (1971). *Neth. J. Pl. Path.* 77, 14-24.
- Dijkstra, J. (1964). *Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen* 64 (2), 1-83.
- Ellis, R.J. (1969). *Science* 163, 477-478.
- Esanu, V. en Savulescu, A. (1967). *Phytopath. Z.* 59, 347-351.
- Esanu, V. (1969). *Phytopath. Z.* 64, 221-241.
- Esau, K. en Cronshaw, J. (1967). *J. Cell Biol.* 33, 665-678.
- Evans, W.H. (1970). *Biochem. J.* 116, 833-842.
- Faccioli, G. (1968). *Phytopath. Medit.* 6, 100-103.
- Fairbanks, G., Levinthal, C. en Reeder, R.H. (1965). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20, 393-399.
- Fantes, K.H. en Furminger, I.G.S. (1967). *Nature* 215, 750-751.
- Farkas, G.L., Kiraly, Z. en Solymosy, F. (1960). *Virology* 12, 408-421.
- Farkas, G.L. en Kiraly, Z. (1962). *Phytopath. Z.* 44, 105-150.
- Farkas, G.L. en Solymosy, F. (1962). *Biochem. J.* 84, 113 P.
- Farkas, G.L., Dezsi, L., Horvath, M., Kisban, K. en Udvardy, J. (1964). *Phytopath. Z.* 49, 343-354.
- Farkas, G.L. en Lovrekovich, L. (1965). *Phytopathology* 55, 519-524.
- Farkas, G.L. en Solymosy, F. (1965). *Phytopath. Z.* 53, 85-93.
- Farkas, G.L., Solymosy, F. en Lovrekovich, L. (1965). *Tag.-Ber. Dtsch. Akad. Landwirtsch.-Wiss. Berlin* 74, 71-81.
- Farkas, G.L. en Stahmann, M.A. (1966). *Phytopathology* 56, 669-677.
- Farkas, G.L. (1968). in *Biochemical regulation in diseased plants or injury* (Hirai, T., Hidaka, Z. en Uritani, I., red.), pp. 123-135, *Phytopath. Soc. Japan, Tokyo*.
- Fazekas de St. Groth, S., Webster, R.G. en Datyner, A. (1963). *Biochim. Biophys. Acta* 71, 377-391.
- Fitt, P.S. en Wille, H. (1969). *Biochem. J.* 112, 489-495.
- Fitzpatrick, D.F., Davenport, G.R., Forte, L. en Landon, E.J. (1969). *J. Biol. Chem.* 244, 3561-3569.
- Foster, J.A. en Ross, A.F. (1968). *Phytopathology* 58, 1050.
- Fottrell, D.F. (1968). *Phytochemistry* 7, 23-29.

- Fraenkel-Conrat, H. (1957). *Virology* 4, 1-4.
- Fraser, R.S.S. (1969). *Molec. Gen. Genetics* 106, 73-79.
- Fric, F. en Fricova, L. (1968). *Biologia* 23, 289-292.
- Furusawa, I., Ouchi, S. en Akai, S. (1970). *Phytopath. Z.* 68, 232-243.
- Gerstel, D.U. (1943). *Genetics* 28, 533-536.
- Gerstel, D.U. (1945). *Genetics* 30, 448-454.
- Gianinazzi, S., Vallée, J.-C. en Martin, C. (1969). *C.R. Acad. Sc. Paris D* 268, 800-802.
- Gianinazzi, S. en Vallée, J.-C. (1969). *C.R. Acad. Sc. Paris D* 269, 593-595.
- Gianinazzi, S., Martin, C. en Vallée, J.-C. (1970a). *C.R. Acad. Sc. Paris D* 270, 2383-2386.
- Gianinazzi, S., Scalla, R. en Rigaud, J. (1970b). *C.R. Acad. Sc. Paris D* 270, 2882-2885.
- Gicherman, G. en Loebenstein, G. (1968). *Phytopathology* 58, 405-409.
- Goldberger, R.F. (1968). *Anal. Biochem.* 25, 46-54.
- Goodman, R.N., Kiraly, Z. en Zaitlin, M. (1967). *The biochemistry and physiology of infectious plant disease*, D. Van Nostrand Comp., Inc., Princeton, N.J.
- Goodman, R.N. (1968). *Phytopathology* 58, 872-873.
- Goodman, R.N. en Plurad, S.B. (1971). *Physiol. Pl. Path.* 1, 11-15.
- Granett, A.L. en Shalla, T.A. (1970). *Phytopathology* 60, 419-425.
- Grell, E.H. (1967). *Science* 158, 1319-1320.
- Grison, C. en Martin, C. (1961). *Ann. Epiphyties* 12, 89-94.
- Gubanski, M. (1960). *Nature* 186, 657-658.
- Gubanski, M. en Kurstak, R. (1960). *Experientia* 16, 407.
- Gubanski, M. (1962). *Acta Soc. Botan. Polon.* 31, 77-82.
- Hadwiger, L.A. en Schwochau, M.E. (1969). *Phytopathology* 59, 223-227.
- Hamaguchi, H. en Cleve, H. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 233, 320-333.
- Harpaz, I., Bar-Joseph, M. en Sela, I. (1969). *Ann. Appl. Biol.* 64, 57-64.
- Hay, A.J., Skehel, J.J. en Burke, D.C. (1968). *J. Gen. Virol.* 3, 175-184.
- Hayashi, T. en Matsui, C. (1963). *Virology* 21, 525-527.
- Hayashi, T. en Matsui, C. (1965). *Phytopathology* 55, 387-392.
- Hebert, T.T. (1963). *Phytopathology* 54, 362.
- Hecht, E.I. en Bateman, D.F. (1964). *Phytopathology* 54, 523-530.
- Henika, F.S. (1932). *J. Agric. Res.* 44, 477-493.
- Hirai, A. en Wildman, S.G. (1967). *Virology* 33, 467-473.
- Hirai, A. en Wildman, S.G. (1969). *Virology* 38, 73-82.
- Hjerten, S., Jerstedt, S. en Tiselius, A. (1965). *Anal. Biochem.* 11, 219-223.
- Hoagland, D.R. en Arnon, D.I. (1950). *Circular 347, Calif. Agric. Exp. Station.*
- Hofferek, H. en Wolffgang, H. (1965). *Tag.-Ber. Dtsch. Akad. Landwirtsch.-Wiss. Berlin* 74, 49-70.
- Hofferek, H. (1967). *Phytopath. Z.* 58, 214-238.

- Holden, M. en Tracey, M.V. (1948). *Biochem. J.* 43, 151-156.
- Holland, J.J. (1968). *Science* 160, 1346-1348.
- Holmes, F.O. (1934). *Phytopathology* 24, 984-1002.
- Holmes, F.O. (1938). *Phytopathology* 28, 553-561.
- Holmes, F.O. (1941). *Phytopathology* 31, 1089-1098.
- Holmes, F.O. (1952). *Phytopathology* 42, 113.
- Holmes, F.O. (1953). *Phytopathology* 43, 475-476.
- Holmes, F.O. (1955). *Ann. Appl. Biol.* 42, 129-139.
- Holmes, F.O. (1960). *Virology* 12, 59-67.
- Honda, Y. en Matsui, C. (1969). *Virology* 39, 593-595.
- Honold, G.R., Farkas, G.L. en Stahmann, M.A. (1966). *Cereal Chem.* 43, 517-529.
- Hoogendam, B.W., Ravenswaay Claasen, J.C. van, Bosselaar, A., Voorma, H.O. en Bosch, L. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 157, 579-588.
- Hrsel, I. en Brcak, J. (1964). *Virology* 23, 252-258.
- Israel, H.W. en Ross, A.F. (1967). *Virology* 33, 272-286.
- Jockusch, H. (1966a). *Z. VererbungsL.* 98, 320-343.
- Jockusch, H. (1966b). *Z. VererbungsL.* 98, 344-362.
- Jockusch, H. (1966c). *Phytopath. Z.* 55, 185-192.
- Jockusch, H. (1968). *Virology* 35, 94-101.
- Jockusch, H. en Jockusch, B. (1968). *Molec. Gen. Genetics* 102, 204-209.
- John, V.T. en Weintraub, M. (1966). *Phytopathology* 56, 502-506.
- John, V.T. en Weintraub, M. (1967). *Phytopathology* 57, 154-158.
- Johnson, J. (1926). *Phytopathology* 16, 141-149.
- Johnson, L.B., Brannaman, B.L. en Zscheile, F.P. (1966). *Phytopathology* 56, 1405-1410.
- Kado, C.I. en Knight, C.A. (1966). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 55, 1276-1283.
- Kammen, A. van, (1963). *Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen* 63 (12), 1-71.
- Kammen, A. van, en Brouwer, D. (1964). *Virology* 22, 9-14.
- Kamp, J. van der, en Bloemendal, H. (1966). *Chem. Weekblad* 62, 393-398.
- Kassanis, B. (1952). *Ann. Appl. Biol.* 39, 358-369.
- Kassanis, B. (1964). *Ann. Inst. Phytopath. Benaki* 6, 7-26.
- Kataoka, M., Doke, N. en Hirai, T. (1969). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 35, 329-338.
- Kato, T. en Yamaguchi, A. (1971). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 37, 117-123.
- Kiehn, E.D. en Holland, J.J. (1970). *Biochemistry* 9, 1716-1728.
- Kikuchi, M. en Yamaguchi, A. (1960). *Nature* 187, 1048-1049.
- Kimmins, W.C. (1969). *Can. J. Bot.* 47, 1879-1886.
- Kinard, F.E. (1957). *Rev. Sci. Instr.* 28, 293-294.
- Klement, Z. (1963). *Nature* 199, 299-300.
- Knight, C.A. (1962). in *Biochemical preparations* (Coon, M.J., red.) vol. 9, pp. 132-136, John Wiley and Sons, New York.
- Knowles, B.B. en Fristrom, J.W. (1967). *J. Insect Physiol.* 13, 731-737.
- Köhler, E. en Panjan, M. (1943). *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 61, 175-180.

- Kosuge, T. (1969). *Ann. Rev. Phytopathology* 7, 195-222.
- Kubo, S. (1966). *Virology* 28, 229-235.
- Kubo, S. en Tomaru, K. (1967). in *Biochemical regulation in diseased plants or injury* (Hirai, T., Hidaka, Z. en Uritani, I., red.), pp. 35-48, Phytopath. Soc. Japan, Tokyo.
- Kuc, J. (1968). *World Rev. Pest Control* 7, 42-55.
- Langenberg, W.G. en Schlegel, D.E. (1969). *Virology* 37, 86-93.
- Laver, W.G. (1970). *Virology* 41, 488-500.
- Lerch, B. (1968). *Experientia* 24, 889-890.
- Lerch, B. en Stegemann, H. (1969). *Anal. Biochem.* 29, 76-83.
- Li, Y.-Y. en Schmelzer, K. (1964). *Zbl. Bakt. Abt. II* 118, 229-248.
- Limasset, P. (1969). *Ann. Phytopathol.* 1, 641-643.
- Linskens, H.F. (1959). in *Papierchromatographie in der Botanik* (Linskens, H.F., red.), 2e druk, pp. 185-188, Springer-Verlag, Berlijn.
- Loebenstein, G. (1960). *Nature* 185, 122-123.
- Loebenstein, G. (1962). *Virology* 17, 574-581.
- Loebenstein, G. en Ross, A.F. (1963). *Virology* 20, 507-517.
- Loebenstein, G. en Linsey, N. (1966). *Israel J. Bot.* 15, 163-167.
- Loebenstein, G. en Lovrekovich, L. (1966). *Virology* 30, 587-591.
- Loebenstein, G., Rabina, S. en Praagh, T. van, (1966). in *Viruses of plants* (Beemster, A.B.R. en Dijkstra, J., red.), pp. 151-157, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam.
- Loebenstein, G., Rabina, S. en Praagh, T. van, (1968). *Virology* 34, 264-268.
- Loebenstein, G., Sela, B. en Praagh, T. van, (1969). *Virology* 37, 42-48.
- Loebenstein, G., Chazan, R. en Eisenberg, M. (1970). *Virology* 41, 373-376.
- Loon, L.C. van, en Kammen, A. van, (1968). *Phytochemistry* 7, 1727-1735.
- Loon, L.C. van, en Kammen, A. van, (1970). *Virology* 40, 199-211.
- Loon, L.C. van, (1971). *Phytochemistry* 10, 503-507.
- Loon, L.C. van, en Geelen, J.L.M.C. (1972). in *Proceedings of the Conference on biochemical and ecological aspects of plant-parasite relations*, Boedapest 1970, in druk.
- Lovrekovich, L., Lovrekovich, H. en Stahmann, M.A. (1968). *Phytopathology* 58, 1034-1035.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. en Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lozano, J.C. en Sequeira, L. (1970). *Phytopathology* 60, 875-879.
- McCarthy, D. (1968). *J. Gen. Virol.* 3, 417-425.
- McCorquodale, D.J. en Buchanan, J.M. (1968). *J. Biol. Chem.* 243, 2550-2559.
- Macko, V., Honold, G.R. en Stahmann, M.A. (1967). *Phytochemistry* 6, 465-471.
- Maia, E. en Morel, G. (1967). *C.R. Soc. Biol.* 161, 535-537.
- Mallah, G.S. (1943). *Genetics* 28, 525-532.
- Mann, E.W. (1969). *Phytopathology* 59, 658-662.

- Mapson, L.W. en Wardale, D.A. (1968). *Biochem. J.* 107, 433-442.
- Marcinka, K. (1970). *Biologia* 25, 599-602.
- Marrou, J. en Migliori, A. (1969). *Ann. Phytopathol.* 1, 507-515.
- Martin, C. (1958a). *C.R. Acad. Sc. Paris D* 246, 2026-2029.
- Martin, C. (1958b). *Etude de quelques déviations de métabolisme chez les plantes atteintes de maladies à virus*, Proefschrift, I.N.R.A., Parijs.
- Martin, C. (1966). *Bull. Soc. Franç. Physiol. Vég.* 12, 345-354.
- Martin, C. en Gallet, M. (1966a). *C.R. Acad. Sc. Paris D* 262, 646-649.
- Martin, C. en Gallet, M. (1966b). *C.R. Acad. Sc. Paris D* 262, 997-1000.
- Martin, C. en Gallet, M. (1966c). *C.R. Acad. Sc. Paris D* 263, 1316-1318.
- Maurer, H.R. (1968). *Disk-Elektrophorese*, Walter de Gruyter & Co., Berlijn.
- Melchers, G., Schramm, G., Trurnit, H. en Friedrich-Freksa, H. (1940). *Biol. Zbl.* 60, 524-556.
- Melchers, G. (1942). *Naturwissenschaften* 30, 48-49.
- Melchers, G., Jockusch, H. en Sengbusch, P. von, (1966). *Phytopath. Z.* 55, 86-88.
- Meneghini, M., Musumeci, M.R. en Moraes, W.B.C. (1969). *Arq. Inst. Biol. S. Paulo* 36, 5-7.
- Merrett, M.J. (1962). *Physiol. Plant.* 15, 465-472.
- Merrett, M.J. en Bayley, J. (1969). *Botan. Rev.* 35, 372-392.
- Milne, R.G. (1966a). *Virology* 28, 79-89.
- Milne, R.G. (1966b). *Virology* 28, 527-532.
- Mitchell, W.M. (1967). *Biochim. Biophys. Acta* 147, 171-174.
- Möller, J. en Poucke, M. van, (1970). *Phytochemistry* 9, 1803-1805.
- Mudd, J.A. en Summers, D.F. (1970). *Virology* 42, 328-340.
- Mundry, K.W. en Gierer, A. (1958). *Z. Vererbungsl.* 89, 614-630.
- Mundry, K.W. (1965). in *Reproduction: molecular, subcellular and cellular* (Locke, M., red.), pp. 65-94, Academic Press, New York.
- Mundry, K.W. (1967). *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 80, 502-511.
- Nakagaki, Y., Hirai, T. en Stahlmann, M.A. (1970). *Virology* 40, 1-9.
- Nathans, D., Oeschger, M.P., Eggen, K. en Shimura, Y. (1966). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56, 1844-1851.
- Nemeth, J., Klement, Z. en Farkas, G.L. (1969). *Phytopath. Z.* 65, 267-278.
- Neville, D.M. (1967). *Biochim. Biophys. Acta* 133, 168-170.
- Neville, D.M. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 154, 540-552.
- Newmark, P. en Fraser, D. (1956). *J. Am. Chem. Soc.* 78, 1588-1590.
- Nienhaus, F. en Hoogen, H. (1970). *Phytopath. Z.* 69, 38-48.
- Nilsson-Tillgren, T., Kolehmainen-Seveus, L. en Wettstein, D. von, (1969). *Molec. Gen. Genetics* 104, 124-141.
- Nolla, J.A.B. (1935). *J. Agric. Univ. Puerto Rico* 19, 29-49.
- Nolla, J.A.B. (1938). *J. Heredity* 29, 42-48.
- Novacky, A. en Hampton, R.E. (1967). *Phytopathology* 57, 824.

- Novacky, A. en Hampton, R.E. (1968). *Phytopathology* 58, 301-305.
- Ohashi, Y. en Shimomura, T. (1971a). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 37, 22-28.
- Ohashi, Y. en Shimomura, T. (1971b). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 37, 211-214.
- Opel, H. (1965). *Tag.-Ber. Dtsch. Akad. Landwirtsch.-Wiss. Berlin* 74, 83-97.
- Ornstein, L. en Davis, B.J. (1960). *Preprint, Distillation Products Industries, Rochester, N.Y.*
- Ornstein, L. (1964). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321-349.
- Osawa, K. en Yamaguchi, A. (1970). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 36, 254-259.
- Ouchi, S., Furusawa, I. en Akai, S. (1969). *Phytopath. Z.* 65, 279-287.
- Owen, P.C. (1955). *Ann. Appl. Biol.* 43, 265-272.
- Owen, P.C. (1957). *Ann. Appl. Biol.* 45, 456-461.
- Palm, E.W. (1967). *The effect of salt-soluble protein fractions of Nicotiana species on tobacco mosaic virus infectivity*, Proefschrift N. Dak. Sta. Univ., Diss. Abstr. 27 B: 2224.
- Patterson, B.D. en Smillie, R.M. (1971). *Plant Physiol.* 47, 196-198.
- Peacock, A.C. en Dingman, C.W. (1967). *Biochemistry* 6, 1818-1827.
- Peterson, P.D. en McKinney, H.H. (1938). *Phytopathology* 28, 329-342.
- Pierpoint, W.S. (1968). *J. Exp. Bot.* 19, 264-275.
- Polter, C. (1967). *Z. Naturforsch.* 22b, 340-347.
- Price, W.C. (1934). *Phytopathology* 24, 743-761.
- Prochazkova, Z. (1970). *Biol. Plant.* 12, 297-304.
- Ralph, R.K. en Wojcik, S.J. (1969). *Virology* 37, 276-282.
- Ralph, R.K., Bullivant, S. en Wojcik, S.J. (1971). *Virology* 43, 713-716.
- Rappaport, I. en Wu, J.-H. (1963). *Virology* 20, 472-476.
- Ray, T.K. en Marinetti, G.V. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 233, 787-791.
- Reddi, K.K. (1959). *Biochim. Biophys. Acta* 33, 164-169.
- Reddi, K.K. (1963). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 50, 75-81.
- Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. en Williams, D.E. (1962). *Nature* 195, 281-283.
- Riedel, A. en Wünsch, E. (1959). *Z. Physiol. Chem.* 316, 61-70.
- Ross, A.F. (1961a). *Virology* 14, 329-339.
- Ross, A.F. (1961b). *Virology* 14, 340-358.
- Ross, A.F. (1966). in *Viruses of plants* (Beemster, A.B.R. en Dijkstra, J., red.), pp. 127-150, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam.
- Ross, A.F. en Israel, H.W. (1970). *Phytopathology* 60, 755-770.
- Rubin, B.A. en Arcichovskaja, E.V. (1967). *Phytopath. Z.* 58, 101-121.
- Rudolph, K. en Stahmann, M.A. (1964). *Nature* 204, 474-475.
- Rudolph, K. en Stahmann, M.A. (1966). *Plant Physiol.* 41, 389-394.
- Sänger, H.L. en Knight, C.A. (1963). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 13, 455-461.
- Santelli, V. (1966). *Phytopathology* 56, 326-333.
- Scalla, R. en Meignoz, R. (1967). *Ann. Physiol. Vég.* 9, 383-396.
- Scalla, R., Meignoz, R., Noiroot-Timotheé, C. en Martin, C. (1969). *C.R. Acad. Sc.*

Paris D 268, 527-530.

- Scalla, R., Gianinazzi, S. en Martin, C. (1971). *J. Gen. Virol.*, in druk.
- Scandalios, J.G. (1964). *J. Heredity* 55, 281-285.
- Schlegel, D.E., Smith, S.H. en Zoeten, G.A. de, (1967). *Ann. Rev. Phytopathology* 5, 223-246.
- Schuster, G. (1969). in *Plant virology, Proceedings of the 6th conference of the Czechoslovak plant virologists, Olomouc, 1967* (Blattny, C., red.), pp 97-106, Academia, Praag.
- Schwartz, J.H. (1967). *J. Mol. Biol.* 30, 309-322.
- Schwochau, M.E. en Hadwiger, L.A. (1969). *Arch. Biochem. Biophys.* 134, 34-41.
- Sela, B., Loebenstein, G. en Praagh, T. van, (1969). *Virology* 39, 260-264.
- Sela, I. en Applebaum, S.W. (1962). *Virology* 17, 543-548.
- Sela, I., Harpaz, I. en Birk, Y. (1964). *Virology* 22, 446-451.
- Sela, I., Harpaz, I. en Birk, Y. (1966). *Virology* 28, 71-78.
- Semal, J. (1969). *Ann. Phytopathol.* 1, 517-522.
- Sengbusch, P. von, (1965). *Z. Vererbungsl.* 96, 364-386.
- Sequeira, L. (1971). in *Summaries from the 3th international conference on plant pathogenic bacteria, Wageningen, 1971*, p. 21.
- Shalla, T.A. (1968). *Virology* 35, 194-203.
- Shepherd, G.R. en Gurley, L.R. (1966). *Anal. Biochem.* 14, 356-363.
- Shimomura, T. (1971). *Phytopath. Z.* 70, 185-196.
- Shimomura, T. en Ohashi, Y. (1971). *Virology* 43, 531-532.
- Shimono, H., Ben-Porat, T. en Kaplan, A.S. (1969). *Virology* 37, 49-55.
- Siegel, A. en Wildman, S.G. (1954). *Phytopathology* 44, 277-282.
- Siepmann, R. en Stegemann, H. (1967). *Z. Naturforsch.* 22b, 949-955.
- Simons, T.J. en Ross, A.F. (1970). *Phytopathology* 60, 383-384.
- Simons, T.J. en Ross, A.F. (1971). *Phytopathology* 61, 293-300.
- Singer, S.J., Bald, J.G., Wildman, S.G. en Owen, R.D. (1951). *Science* 114, 463-465.
- Smith, S.H. en Schlegel, D.E. (1964). *Science* 145, 1058-1059.
- Smith, S.H. en Schlegel, D.E. (1965). *Virology* 26, 180-189.
- Solymosy, F., Farkas, G.L. en Kiraly, Z. (1959). *Nature* 184, 706-707.
- Solymosy, F. en Farkas, G.L. (1962). *Nature* 195, 835.
- Solymosy, F. en Farkas, G.L. (1963). *Virology* 21, 210-221.
- Solymosy, F. en Farkas, G.L. (1964). *Phytopath. Z.* 51, 153-161.
- Solymosy, F., Szirmai, J., Beczner, L. en Farkas, G.L. (1967). *Virology* 32, 117-121.
- Solymosy, F. (1970). *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.* 5, 55-63.
- Spear, P.G. en Roizman, B. (1968). *Virology* 36, 545-555.
- Spencer, D.F. en Kimmins, W.C. (1971). *Can. J. Bot.* 49, 417-421.
- Stahmann, M.A., Clare, B.G. en Woodbury, W. (1966). *Plant Physiol.* 41, 1505-1512.
- Staples, R.D. en Stahmann, M.A. (1964). *Phytopathology* 54, 760-764.
- Stegemann, H. (1968). *Z. Anal. Chem.* 243, 573-578.

- Stein, A. en Loebenstein, G. (1970). *Nature* 226, 363-364.
- Summers, D.F., Maizel, J.V. en Darnell, J.E. (1965). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 54, 505-513.
- Suseno, H. en Hampton, R.E. (1966). *Phytochemistry* 5, 819-822.
- Takahashi, T. en Hirai, T. (1963). *Virology* 19, 431-440.
- Takahashi, T. en Hirai, T. (1965). *Physiol. Plant.* 18, 219-228.
- Takahashi, T. (1971). *Phytopath. Z.* 72, 29-33.
- Takahashi, W.N. en Ishii, M. (1953). *Amer. J. Bot.* 40, 85-90.
- Takahashi, W.N. (1956). *Phytopathology* 46, 654-656.
- Takahashi, W.N. (1967). in *The dynamic role of molecular constituents in plant-parasite interaction* (Mirocha, C.J. en Uritani, I., red.), pp. 283-299, Amer. Phytopath. Soc., St. Paul, Minn.
- Takayama, K., McLennan, D.H., Tsagaloff, A. en Stoner, C.D. (1966). *Arch. Biochem. Biophys.* 114, 223-230.
- Takebe, I., Otsuki, Y. en Aoki, S. (1968). *Plant & Cell Physiol.* 9, 115-124.
- Takebe, I. en Otsuki, Y. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 64, 843-848.
- Tan, Y.H., Armstrong, J.A., Ke, Y.H. en Ho, M. (1970). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 67, 464-471.
- Thang, M.-N., Thang, D.-C. en Leautey, J. (1967). *C.R. Acad. Sc. Paris D* 265, 1823-1826.
- Thomas, P.E. en Fulton, R.W. (1966). *Phytopathology* 56, 904.
- Thomas, P.E. en Fulton, R.W. (1968a). *Virology* 34, 459-469.
- Thomas, P.E. en Fulton, R.W. (1968b). *Virology* 35, 108-111.
- Thrower, L.H. (1965). *Phytopathology* 55, 558-562.
- Tomaru, K., Shiroya, T. en Takanami, Y. (1969). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 35, 41-46.
- Trown, P.W. (1965). *Biochemistry* 4, 908-918.
- Tsugita, A., Fraenkel-Conrat, H., Nirenberg, M.W. en Matthaei, J.H. (1962). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 48, 846-853.
- Uritani, I., Asahi, T., Minamikawa, T., Hyodo, H., Oshima, K. en Kojima, M. (1967). in *The dynamic role of molecular constituents in plant-parasite interaction* (Mirocha, C.J. en Uritani, I., red.), pp. 342-356, Amer. Phytopath. Soc., St. Paul, Minn.
- Vager, R.M. (1955). *Zh. Obshch. Biol.* 16, 298-305.
- Valleau, W.D. (1942). *Phytopathology* 32, 1022-1025.
- Valleau, W.D. (1943). *Phytopathology* 33, 14.
- Valleau, W.D. en Johnson, E.M. (1943). *Phytopathology* 33, 210-219.
- Valleau, W.D. (1952). *Phytopathology* 42, 40-42.
- Vinuela, E., Algranati, I.D. en Ochoa, S. (1967). *European J. Biochem.* 1, 3-11.
- Warburg, O. en Christian, W. (1942). *Biochem. Z.* 310, 384-421.
- Weber, D.J., Clare, B. en Stahmann, M.A. (1967). *Phytopathology* 57, 421-424.
- Weber, P.V.V. (1951). *Phytopathology* 41, 593-609.

- Weintraub, M. en Ragetli, H.W.J. (1961). *Phytopathology* 51, 215-219.
- Weintraub, M. en Ragetli, H.W.J. (1964a). *Can. J. Bot.* 42, 533-540.
- Weintraub, M. en Ragetli, H.W.J. (1964b). *Phytopathology* 54, 870-871.
- Weintraub, M. en Ragetli, H.W.J. (1964c). *J. Cell Biol.* 23, 499-509.
- Weintraub, M., Ragetli, H.W.J. en Dwurazna, M.M. (1964). *Can. J. Bot.* 42, 541-545.
- Weintraub, M. en John, V.T. (1966). *Phytopathology* 56, 705-709.
- White, N.H. (1968). *Austr. J. Sci.* 31, 223-225.
- Wieme, R.J. (1959). *Clin. Chim. Acta* 4, 317-321.
- Wildman, S.G., Cheo, C.C. en Bonner, J. (1949). *J. Biol. Chem.* 180, 985-1001.
- Willison, J.H.M. en Cocking, E.C. (1969). *J. Gen. Virol.* 4, 229-233.
- Wittmann, H.G. (1959). *Z. Vererbungsl.* 90, 463-475.
- Wolf, G. (1968). *Experientia* 24, 890-891.
- Wolfgang, H. en Keck, A. (1958). *Phytopath. Z.* 34, 57-65.
- Wolfgang, H. (1969a). *Phytopath. Z.* 64, 77-89.
- Wolfgang, H. (1969b). *Phytopath. Z.* 64, 124-128.
- Wood, K.R. (1971). *Physiol. Pl. Path.* 1, 133-139.
- Wu, J.-H., Blakeley, L.M. en Dimitman, J.E. (1969). *Virology* 37, 658-666.
- Wu, J.-H. en Dimitman, J.E. (1970). *Virology* 40, 820-827.
- Wynd, F.L. (1942). *J. Gen. Physiol.* 25, 649-661.
- Yamaguchi, A. en Shimomura, T. (1968). *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.* 3, 293-300.
- Yasuda, Y., Noguchi, T., Okada, K. en Aoki, A. (1970). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 36, 27-35.
- Young, R.W. en Fulhorst, H.W. (1965). *Anal. Biochem.* 11, 389-391.
- Zaitlin, M. en Jagendorf, A.T. (1960). *Virology* 12, 477-486.
- Zaitlin, M., Spencer, D. en Whitfield, P.R. (1967) in *Biochemical regulation in diseased plants or injury* (Hirai, T., Hidaka, Z. en Uritani, I., red.), pp. 91-103, *Phytopath. Soc. Japan, Tokyo*.
- Zaitlin, M. en Hariharasubramanian, V. (1970a). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 1031-1036.
- Zaitlin, M. en Hariharasubramanian, V. (1970b). *Phytopathology* 60, 1537-1538.
- Zwaan, J. (1967). *Anal. Biochem.* 21, 155-168.
- Zwartz, J.A. (1967). *Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen* 67 (9), 1-139.
- Zweerink, H.J. en Joklik, W.K. (1970). *Virology* 41, 501-518.

DANKWOORD

Gaarne wil ik mijn dank betuigen aan Professor Dr. Ir. J.P.H. van der Want voor zijn voortdurende belangstelling en vele stimulerende gesprekken, aan Dr. A. van Kammen voor zijn inspirerende en behulpzame leiding bij dit onderzoek, en aan Mevrouw Dr. J. Dijkstra en Dr. D. Noordam voor het beschikbaar stellen van hun kennis aangaande diverse virus - waardplant combinaties. Veel dank ben ik verschuldigd voor het feit dat Mevrouw M. Rem-Sibie en Mevrouw H. Visser-Roos enige tijd in staat werden gesteld mij op kundige wijze te assisteren. Voorts komt dank toe aan de heer G. Looijen voor de supervisie over het plantmateriaal, aan Ir. W. Welling, in wiens laboratorium ik de gelfiltratie-experimenten kon verrichten, en aan Dr. D. Simons voor het corrigeren van de engelse samenvatting van dit proefschrift.

De voorbereiding van de uitgave van dit proefschrift werd verzorgd door Mevrouw B. Konijnenberg-de Jong (typewerk) en de heren K. Boekhorst en G. Eimers (tekeningen en foto's). De uitvoering in offset was in handen van het PUDOC.

Zeer erkentelijk ben ik de European Molecular Biology Organization voor het toekennen van een beurs van de Volkswagen Foundation voor een studiereis naar Duitsland.

CURRICULUM VITAE

Leendert Cornelis van Loon werd op 15 september 1941 geboren te Delft. Hij bezocht de Stedelijke Gymnasia te Nijmegen en te Delft en behaalde in 1959 het eindexamen gymnasium β . In hetzelfde jaar ging hij studeren aan de Landbouwhogeschool te Wageningen. Na in 1963 kandidaatsexamen richting Planteziektenkunde te hebben gedaan, was hij gedurende acht maanden werkzaam bij het Centre National de Recherches Agronomiques te Versailles. In 1966 behaalde hij het ingenieursdiploma met lof (hoofdvak virologie; bijvakken organische chemie en biochemie).

Van oktober 1966 tot juni 1970 was hij als wetenschappelijk assistent werkzaam bij de afdeling Virologie van de Landbouwhogeschool. Sindsdien is hij als wetenschappelijk medewerker verbonden aan de afdeling Plantenfysiologie.