

was spraying followed by rinsing the leaves with tapwater after 5 hours. However, mixing the extract with diluted infective sap *in vitro* resulted in inhibition of virus activity. Further studies are in progress.

VIREN EN LOOISTOFFEN

With a summary: Viruses and tannins

DOOR

T. H. THUNG en J. P. H. VAN DER WANT

Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen

Door BAWDEN en KLECZKOWSKI (1) is aannemelijk gemaakt, dat bij het uitpersen van viruszieke aardbeibladeren de looistoffen uit deze bladeren met de viren een binding aangaan ten gevolge waarvan de virusactiviteit teloor gaat. Deze onderzoekers mengden daartoe gezuiverd tabaksmozaïekvirus met sap van aardbeibladeren en namen waar, dat de concentratie van actief virus verminderde met toenemende hoeveelheid sap uit aardbeibladeren.

Ook belemmeren looistoffen de overbrenging met sap van dahliamozaïekvirus van dahlia op dahlia (2). Tengevolge van de binding van dit virus met de looistoffen is het evenmin mogelijk het virus te isoleren en er een antiserum tegen te bereiden. Immers, tijdens het centrifugeren van het sap wordt het virus-looistof-complex gesedimenteerd. Om nu de vorming van dit complex te verhinderen voegden LIMASSET *et al.* (2) vóór het uitpersen aan het dahliablade nicotinesulfaat tot ongeveer 10 % van het gewicht van het blad toe. Het is nl. bekend, dat nicotinesulfaat gemakkelijk looistoffen kan binden. Na uitpersen en centrifugeren bleek inderdaad in het heldere dahliasap een belangrijke hoeveelheid virus achter te zijn gebleven. Dit virus kon vervolgens met ammoniumsulfaat worden geconcentreerd en van verontreinigingen gezuiverd.

Het bezwaar van nicotinesulfaat is echter, dat het slechts met uiterste voorzichtigheid vanwege de grote giftigheid gehanteerd mag worden. Naar aanleiding hiervan is door ons onderzocht in hoeverre nicotinesulfaat door andere, niet of minder giftige looistofbindende stoffen kan worden vervangen. Voor deze proeven is, naast nicotinesulfaat, gebruik gemaakt van: aluminiumhydroxyde, kininesulfaat, loodacetaat, poeder van gemalen huid en taptmelkpoeder. Deze middelen werden getoetst op de viren van ratelziekte en tabaksmozaïek, terwijl als looistofbron blad van gezonde frambozenplanten werd gekozen. Tabaksbladeren, waarin beide viren gelijktijdig voorkwamen, werden in kleine stukjes geknipt (de nerven waren vooraf verwijderd) en gemengd met fijngeknipt frambozenblad in de verhouding van 10 g tabaksblad op 30 g frambozenblad. Hier werden de bovengenoemde stoffen aan toegevoegd in de volgende hoeveelheden: 40 % nicotinesulfaat 4 ml, aluminiumhydroxyde 4 g, kininesulfaat 4 g, loodacetaat 1 g, huidpoeder 4 g en taptmelkpoeder 6 g. Daarna werd het mengsel fijngevreven in een mortier, door kaasdoek uitgeperst, het sap gecentrifugeerd en de heldere vloeistof gedurende een nacht in stromend leidingwater gedialyseerd. Als controles deden dienst: sap uit 10 g geïnfecteerd tabaksblad, sap uit een mengsel van 10 g geïnfecteerd tabaksblad en 30 g frambozenblad, en sap uit monsters van 10 g geïnfecteerd tabaksblad, welke vooraf met de genoemde middelen waren gemengd. Ook van deze controles werd het sap na het

centrifugeren gedialyseerd. Na dialyse werden de volumina der vloeistoffen gemeten en alle met water aan elkaar gelijk gemaakt, d.i. gelijk aan dat van het grootste volume. Vervolgens werden op de gebruikelijke wijze met elk van de vloeistoffen 5 tabaksplanten White Burley en 3 planten van *Nicotiana glutinosa* geïnoculeerd. White Burley diende om ratelvirus, *N. glutinosa* om tabaksmozaïekvirus aan te tonen.

De proeven leverden, samengevat, het volgende resultaat op. Nicotinesulfaat inactieveert, bij afwezigheid van looistoffen, de viren van ratelziekte en tabaksmozaïek gedeeltelijk. Bij aanwezigheid van looistoffen bindt het deze echter en worden de genoemde viren door geen van beide geïnactiveerd. Aluminiumhydroxyde, kininesulfaat en huidpoeder beïnvloeden de viren niet merkbaar, doch binden geen looistoffen. Loodacetaat slaat het ratelvirus slechts gedeeltelijk neer; het tabaksmozaïekvirus evenwel geheel. Dit is dus een methode om deze viren *in vitro* van elkaar te scheiden. Loodacetaat bindt de looistoffen echter niet op merkbare wijze. Huidpoeder verlaagt de virusactiviteit niet, evenmin bindt het de looistoffen. Taptemelkpoeder verlaagt de activiteit van de beide viren aanzienlijk; zijn daarentegen looistoffen aanwezig dan worden deze door het taptemelkpoeder gebonden en blijft een groter deel van de viren actief dan wanneer alleen looistoffen of alleen melkpoeder bij de viren aanwezig zijn. In dit opzicht gedraagt taptemelkpoeder zich gelijk aan nicotinesulfaat, al geeft de laatste stof betere resultaten met betrekking tot behoud van de virusactiviteit bij aanwezigheid van looistoffen.

SUMMARY

Samples of finely cut tobacco leaves, at the same time infected with rattle and tobacco mosaic viruses, were mixed with ditto leaves of healthy raspberry in the proportion of 10 g to 30 g. To these lots were added respectively: 4 ml of 40 % nicotine sulphate, 4 g of aluminum hydroxyde, 4 g of quinine sulphate, 2 g of lead acetate, 4 g of hide powder, and 6 g of skimmed milk powder to test the ability of these substances to protect the viruses from precipitation by the tannins of the raspberry leaf. The mixtures were ground in a mortar, the sap squeezed through cheese cloth, centrifuged and the clear supernatants dialyzed one night in running tap water. Check objects treated in the same way were: 10 g of tobacco leaf infected with both viruses, and a mixture of 10 g of infected tobacco leaf and 30 g of raspberry leaf. After dialyzing the volumes of all objects were brought up to the same as that of the greatest volume. Inoculations were made in the usual way into leaves of White Burley tobacco plants (to test the rattle virus content) and into leaves of *Nicotiana glutinosa* (to test the tobacco mosaic virus content).

Only nicotine sulphate proved to protect both viruses satisfactorily from precipitation by the tannins of raspberry. It was found that in the concentration mentioned above, lead acetate precipitates tobacco mosaic virus, whereas the rattle virus is not precipitated. In this way both viruses can be separated *in vitro*.

LITERATUUR

1. BAWDEN, F. C. and A. KLECZKOWSKI, Protein precipitation and virus inactivation by extracts of strawberry plants. J. Pom. Hort. Sci. 21: 2-7, 1945.
2. LIMASSET, P., P. CORNUET et C. MARTIN, Extraction du virus de la mosaïque du dahlia (Marmor Dahliae Holmes) à partir de dahlias infectés et obtention de son antisérum. C. R. Ac. Sci. 231: 913-914, 1950.