

ONDERZOEKINGEN OVER HET
AANTONEN VAN AARDAPPEL-Y^N-VIRUS
MET BEHULP VAN TOETSPLANTEN

With a summary:

DETECTION OF POTATO VIRUS Y^N BY MEANS OF TEST PLANTS



CENTRALE LANDBOUWCATALOGUS



0000 0092 5202



Dit proefschrift met stellingen van

JACOB ANNÉ DE BOKX,

landbouwkundig ingenieur, geboren te Sittard, 19 maart 1927, is goedgekeurd door de promotor,
Dr. Ir. J. P. H. van der Want, hoogleraar in de Virologie.

De Rector Magnificus der Landbouwhogeschool,
W. F. Eijsvoogel

Wageningen, 14 mei 1964

NN 0'201,371. ~~no 371~~

C^o

ONDERZOEKINGEN OVER HET AANTONEN VAN AARDAPPEL-Y^N-VIRUS MET BEHULP VAN TOETSPLANTEN

With a summary:

DETECTION OF POTATO VIRUS Y^N BY MEANS OF TEST PLANTS

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE LANDBOUWKUNDE OP GEZAG VAN DE
RECTOR MAGNIFICUS, IR. W. F. EIJSVOOGEL,
HOGLERAAR IN DE HYDRAULICA, DE BEVLOEI-
ING, DE WEG- EN WATERBOUWKUNDE EN
DE BOSBOUWARCHITECTUUR, TE VERDEDIGEN
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN EEN COMMISSIE
UIT DE SENAAAT VAN DE LANDBOUWHOGE-
SCHOOL TE WAGENINGEN OP DINSDAG
30 JUNI 1964 TE 16 UUR

DOOR

J. A. DE BOKX

UITGEVERIJ EN DRUKKERIJ HOLLANDIA N.V. - BAARN

1511-104512-03

BIBLIOTHEEK
DER
LANDBOUWHOGESCHOOL
WAGENINGEN

Dit proefschrift verschijnt tevens als Mededeling No. 342 van het Instituut voor Plantenziektenkundig
Onderzoek te Wageningen.

STELLINGEN

I

De aanwezigheid van het Y^N-virus in de knol van primair besmette aardappelplanten kan, bij gebruik van gekneusde spruiten van deze knollen als inoculum, betrouwbaar met behulp van toetsplanten worden vastgesteld.

II

De door Click & Hackett vastgestelde eiwit- en nucleïnezuursynthese in verwonde delen van de aardappelknol zou een verklaring kunnen leveren voor de toeneming van de activiteit van het Y^N-virus in de wondvlakken van aangesneden besmette knollen.

R. E. Click & D. P. Hackett, Proc.
Nat. Acad. Sci. Washington
50: 243-250, 1963.

III

Bij de nomenclatuur van plantevirussen moet niet onder alle omstandigheden aan het prioriteitsbeginsel worden vastgehouden.

IV

De infectie van *Elaeis guineensis* Jacq. met *Ganoderma lucidum* (Leijs.) Karst. vindt in de grond plaats.

V

Bij het onderzoek naar de minimum-factoren in het floëmsap in verband met de voeding van bladluizen wordt ten onrechte veelal de nadruk gelegd op de aminozuren en amiden.

VI

Bij verjonging van oliepalmaanplantingen is het gewenst alle oude palmen door middel van natriumarseniet te doden alvorens tot herinplanten over te gaan.

VII

Stylosanthes gracilis H.B.K. en *Mikania scandens* (L.) Willd. zijn ongeschikt als bodembedekkers in meerjarige tropische cultures.

VIII

Het kweken van hybride rassen levert in principe minder moeilijkheden op bij het gebruik maken van incompatibiliteit dan bij de toepassing van mannelijke steriliteit.

IX

Voor een juiste uitoefening van zijn functie zou de maatschappelijk werker zich moeten kunnen beroepen op een zwijgplicht.

Aan mijn vrouw

Indien iemand zich inbeeldt
enige kennis verworven te hebben,
dan heeft hij nog niet leren
kennen, zoals het behoort;

1 Cor. 8:2

WOORD VOORAF

Bij het tot stand komen van dit proefschrift wil ik allen die hierbij op welke wijze dan ook betrokken zijn geweest, mijn hartelijke dank betuigen.

In de eerste plaats dank ik MIJN OUDERS, die zich voor de vorming van hun kinderen zo vele offers hebben getroost.

Hooggeleerde VAN DER WANT, hooggeachte Promotor, hoewel dit onderzoek grotendeels niet onder Uw leiding is verricht, hebt U toch de taak van Promotor op U willen nemen, ik ben U daarvoor zeer erkentelijk.

Hooggeleerde OORT, door Uw colleges werd ik ingeleid in de fytopathologische problemen. Dit heeft op mijn vorming grote invloed gehad.

U, zeergeleerde TEN HOUTEN, dank ik voor de vrijheid, die U mij bij het uitvoeren van mijn onderzoek hebt gelaten. Ook dank ik U voor het feit, dat U het mogelijk hebt gemaakt dit proefschrift als mededeling van het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek uit te geven.

Beste Riek QUAK, ROZENDAAL en BEEMSTER, de bereidwilligheid, waarmee jullie critiek op de inhoud van dit proefschrift hebt willen uiten stel ik evenals jullie vriendschap zeer op prijs.

U, bestuursleden en medewerkers van de Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor Zaaizaden en Aardappelpootgoed, ben ik zeer erkentelijk voor het in mij gestelde vertrouwen en voor de prettige wijze waarop werd samengewerkt.

Voor de grote ijver en toewijding, waarmee jullie, WATERREUS en MAAS, mij met jullie assistentie hebben bijgestaan, dank ik jullie van harte.

Een woord van dank gaat ook uit naar het personeel van de kassen, het technisch en administratief personeel van het I.P.O., dat op welke wijze dan ook, hulp heeft verleend.

Mevrouw NIJVELDT ben ik zeer erkentelijk voor het snelle en accurate typen van het manuscript, SCHEFFEL, voor het maken van de foto's en tekeningen en MASTENBROEK van de Landbouw Fysisch-Technische Dienst voor het maken van de foto's met de elektronen-microscop.

Tot slot wordt met erkentelijkheid vermeld de hulp, die door VAN DEN ANKER bij de wiskundige verwerking der proefresultaten werd verleend.

INHOUD

INLEIDING	11
1. ENIGE EIGENSCHAPPEN VAN HET Y ^N -VIRUS VAN DE AARDAPPEL	12
1.1. Inleiding	12
1.2. De benaming van het virus	12
1.3. Literatuur	13
1.4. Eigenschappen van het Y ^N -virus in vitro	13
1.4.1. Het verdunningseindpunt	13
1.4.2. Het verlies van infectievermogen bij verhitting	14
1.4.3. De besmettelijkheid van het Y ^N -virus bij bewaring van sap bij 20°C	14
1.4.4. Elektronenmicroscopie	16
1.5. De besmetting van gezonde aardappelplanten met Y ^N -virus door aanraking van het loof met dat van zieke planten	17
1.6. Waardplanten	18
1.7. Nabespreking	18
2. HET CONSERVEREN VAN Y ^N -VIRUS IN VITRO	19
2.1. Inleiding	19
2.2. Materiaal en methoden	20
2.3. Bewaren bij een temperatuur beneden 0°C	21
2.4. Drogen boven calciumchloride	22
2.5. Droogvriezen	23
2.6. Een vergelijking van de drie conserveringsmethoden	25
2.7. Nabespreking	27
3. DE <i>SOLANUM DEMISSUM</i> HYBRIDE 'A6' en <i>SOLANUM DEMISSUM</i> 'Y' ALS TOETSPLANTEN VOOR HET Y ^N -VIRUS	28
3.1. Inleiding en literatuur	28
3.2. Algemene begrippen	29
3.3. De vatbaarheid van 'A6' voor het Y ^N -virus	29
3.3.1. Transport van het Y ^N -virus in de 'A6'-plant	29
3.3.2. De invloed van het plukken en doorsnijden van toetsblad op het verschijnen van de lokale vlekken	30
3.3.3. De verdeling van de lokale vlekken over het 'A6'-toetsblad	31
3.4. De factoren, die het verschijnen van de lokale vlekken beïnvloeden	32
3.4.1. Materiaal en methoden	32
3.4.2. De invloed van de leeftijd van het toetsblad	32
3.4.3. De invloed van licht en temperatuur	34
3.4.4. De invloed van bemesting	36
3.5. Nabespreking	39
4. DE BLADTOETS	40
4.1. Inleiding en literatuur	40
4.2. Materiaal en methoden	40
4.3. De invloed van licht en temperatuur op het verschijnen van lokale vlekken na inoculatie met Y ^N - en Y ^O -virus	40
4.3.1. De invloed van licht op 'A6'-blad	41

4.3.2.	De invloed van de temperatuur op 'A6'-blad	43
4.3.3.	De invloed van licht op Sdy-blad	45
4.3.4.	De invloed van de temperatuur op Sdy-blad	47
4.4.	De invloed van slijpmiddelen en de wijze van inoculatie op het aantal lokale vlekken op 'A6'-blad	48
4.5.	Vergelijking van de vatbaarheid van 'A6'- en Sdy-blad voor Y ^N - virus	49
4.6.	Nabespreking	49
5.	DE <i>SOLANUM DEMISSUM</i> HYBRIDE 'A6' en <i>SOLANUM</i> <i>DEMISSUM</i> 'Y' ALS TOETSPLANTEN VOOR ANDERE VIRUSSEN	51
5.1.	Inleiding	51
5.2.	De vatbaarheid der toetsplanten	51
5.3.	De invloed van licht en temperatuur op het verschijnen van lokale vlekken op 'A6'-blad	52
5.4.	De invloed van licht en temperatuur op het verschijnen van lokale vlekken op Sdy-blad	53
5.5.	Nabespreking	54
6.	HET AANTONEN VAN Y ^N -VIRUS DOOR MIDDEL VAN 'A6'-TOETSBLAD	55
6.1.	Inleiding	55
6.2.	Materialen en methoden	55
6.3.	Het aantonen van Y ^N -virus in secundair besmette planten	56
6.3.1.	In blad en stengel	56
6.3.2.	In blad van verschillende aardappelrassen	57
6.3.3.	In knollen en spruiten	58
6.3.4.	De invloed van het verbreken van de kiemrust op de virusactivi- teit in de knol	60
6.3.5.	De invloed van het verwonden op de virusactiviteit in de knol	61
6.3.6.	De invloed van licht en temperatuur op de virusactiviteit in knol- len en spruiten	61
6.4.	Het aantonen van Y ^N -virus in primair besmette planten	63
6.4.1.	In blad en stengel	63
6.4.2.	In knollen	64
6.4.3.	De invloed van het verbreken van de kiemrust op de virusactivi- teit in de knol	64
6.4.4.	De invloed van het verwonden op de virusactiviteit in de knol	66
6.4.5.	Het aantonen van Y ^N -virus in spruiten	68
6.4.6.	De invloed van licht en temperatuur op de virusactiviteit in knol en spruit	70
6.5.	Nabespreking	72
	SAMENVATTING	74
	SUMMARY	76
	LITERATUUR	80

INLEIDING

In 1959 werden de Nederlandse telers van aardappelpootgoed geconfronteerd met een nieuwe vorm van het Y-virus, die verder als Y^N -virus zal worden aangeduid. Door de uitzonderlijk lange droogte en de daarmee samenhangende opbouw der bladluispopulaties had de verspreiding van dit virus op zeer grote schaal plaats. Hoewel de door dit virus veroorzaakte oogstreductie niet zo groot moet worden geacht (ARENZ & HUNNIUS, 1959) is het voor telers toch wel noodzakelijk voor het verkrijgen van hoogwaardig pootgoed dit virus zo grondig mogelijk uit het gewas te elimineren. Het is nl. moeilijk een gedeeltelijk besmet aardappelras weer vrij van dit virus te krijgen.

Dikwijls vertonen veel aardappelrassen na besmetting met dit virus onduidelijke symptomen, die soms pas laat in het groeiseizoen verschijnen. Het is duidelijk, dat hierdoor het „selecteren” (= het verwijderen van met virus besmette aardappelplanten uit een te velde staand gewas) wordt bemoeilijkt.

Een andere moeilijkheid is het feit, dat dit virus met behulp van de serologische toetsmethode niet betrouwbaar in besmette aardappelplanten kan worden aangetoond. Dit was voor de Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor Zaaizaden en Aardappelpootgoed (N.A.K.) aanleiding om de ontwikkeling van een geschikte toetsmethode te stimuleren.

In dit geschrift zal de ontwikkeling van een methode om het Y^N -virus met behulp van toetsplanten aan te tonen nader worden uiteengezet.

Na een bespreking van enige eigenschappen van het Y^N -virus op grond van literatuurgegevens en de resultaten van eigen werk, gevolgd door een studie over het bewaren van dit virus in vitro, wordt rekenschap gegeven van de waarde van de hybride 'A6' van *Solanum demissum* x *S. tuberosum* 'Aquila' (KÖHLER, 1953) en *Solanum demissum* 'Y' (COCKERHAM, 1958) als toetsplanten. De bladeren van beide reageren met necrotische vlekjes, nadat zij met Y^N -virusbevattend sap zijn ingewreven, ook als zij van de plant zijn afgeplukt en onder geschikte voorwaarden bewaard worden. Er is nagegaan welke omstandigheden, zoals licht, temperatuur en bemesting, de vatbaarheid van deze toetsplanten voor het Y^N -virus beïnvloeden. Tevens is onderzocht welke factoren van betekenis zijn voor het verschijnen van de vlekjes op de afgeplukte, geïnoculeerde bladeren. Voorts is aandacht besteed aan andere aardappelvirussen die ook op de genoemde toetsplanten lokale reacties teweegbrengen. Het is immers van belang te weten in hoeverre deze virussen bij een toetsing op Y^N -virus storend kunnen werken. Tenslotte is onderzoek verricht naar de betrouwbaarheid van de resultaten, als besmette aardappelen in verschillende stadia van ontwikkeling op de aanwezigheid van het Y^N -virus worden getoetst. Hiertoe is gebruik gemaakt van aangesneden knollen en gekneusde spruiten als inoculum. De uitspraak van NIENHAUS (1962): „Der Virusnachweis im Keimpreszsaft kann also zumindest bei mancher Sorten nicht befriedigen und wird sich deshalb als Test nicht eignen” stond ons hierbij mede voor ogen.

1. ENIGE EIGENSCHAPPEN VAN HET Y^N -VIRUS VAN DE AARDAPPEL

1.1. Inleiding

In het volgende zullen enige kenmerken van het Y^N -virus worden vermeld. Het bepalen van de eigenschappen van het virus was noodzakelijk om ingelicht te worden omtrent zijn identiteit. Dit was van belang omdat waarschijnlijk hetzelfde of een nauw verwant virus onder verschillende namen in de literatuur wordt aangegeven.

In de proeven is gebruik gemaakt van het Y^N -virus, dat werd gevonden in planten van het aardappelras 'Record'. Dit materiaal werd ons verstrekt door ir. A. ROZENDAAL, Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen. De door hem gebezigde benaming voor de virusstammen werd door ons overgenomen (ROZENDAAL, 1954). Het virus werd in stand gehouden door het al naar omstandigheden met sap over te brengen op tabak en aardappel.

1.2. De benaming van het virus

De benaming van het virus leverde moeilijkheden op. Vooral in kringen van de Nederlandse pootgoedtelers wordt het aangeduid als „nieuw” Y-virus. Omdat deze term tot verwarring zou kunnen leiden, stelde DE BOKX (1961) de aanduiding Y^N -virus voor.

In de Duitse en Engelse literatuur wordt dit virus respectievelijk „Tabakrippenbräune-Virus” en „tobacco vein necrosis virus” genoemd; deze namen zijn gebaseerd op de typische symptomen, die dit virus op genoemde waardplant doet ontstaan. Het voor het virus kenmerkende verschijnsel op tabak is de bruine verkleuring van de hoofd- en zijnerf van de bladeren. De symptomen, die na besmetting met het virus op verschillende aardappelrassen verschijnen, lopen sterk uiteen. Dit maakt het moeilijk een naam voor het virus te baseren op ziekteverschijnselen van de aardappelplant.

Omdat serologische verwantschap tussen het „Tabakrippenbräune-Virus” en het Y-virus kon worden aangetoond en ook andere eigenschappen van deze virussen overeenkomst vertonen, wordt het „Tabakrippenbräune-Virus” als een stam van het Y-virus beschouwd (BARTELS, 1958). Ook tussen het Y^N -virus en de reeds bekende stam van het Y-virus bestaat serologische verwantschap (VAN SLOGTEREN, mondelinge mededeling).

Gezien de grote verwarring bij de nomenclatuur van aardappelvirussen stelde BARTELS (1958) voor, de verschillende isolaties aan te duiden met een index, geplaatst onder bij de naam van het virus. In 1964 stelde hij verder voor, de stammen van het Y-virus in drie groepen in te delen, nl. normale (reeds bekende typen), necrotiserende („Tabakrippenbräune-Virus”) en anomale stammen. Het bezwaar van het systeem van BARTELS (1964) is, dat hierin geen bijzondere plaats is ingeruimd voor het aardappelstoppelstreepvirus, dat hier door zijn serologische verwantschap met Y-virus en zijn symptoomontwikkeling op aardappel recht op heeft (ROZENDAAL, 1954). De begrippen „normaal” en „anomaal” zijn verder in dit verband weinig zeggend.

Om tot een enigszins overzichtelijk geheel te komen worden daarom in dit geschrift het aardappel Y-, het „nieuwe” Y- en het stoppelstreepvirus respectievelijk als Y^O -, Y^N - en Y^C -virus aangeduid. Het gebruik van de term Y^C -virus voor stoppelstreepvirus is in navolging van BAWDEN (1936). Het Y^O -, Y^N - en Y^C -virus worden evenals door BARTELS als stammen van het Y-virus beschouwd. Tussen deze stammen bestaat een serologische verwantschap, maar geen of slechts een gedeeltelijke premunitie (ROZENDAAL, mondelinge mededeling). Van elk der drie stammen zijn verschillende varianten bekend, die als substammen zouden kunnen worden aangeduid.

1.3. Literatuur

In 1935 stelden SMITH & DENNIS (1940) reeds het voorkomen van een virus vast, waarvan zij veronderstelden, dat het een variant van het Y-virus was. BAWDEN & KASSANIS (1951) isoleerden een virus uit Zuidamerikaanse aardappelen en toonden de serologische verwantschap aan tussen dit virus en het toen bekende Y-virus.

In Duitsland werd in 1951 voor het eerst het voorkomen van het Y^N-virus (Tabak-rippenbräune-Virus) waargenomen (BODE & VÖLK, 1957) en reeds in 1952 onderscheidde men er enige substammen van (ENDEMANN, 1955; KÖHLER, 1955). Het onderscheid tussen de substammen was gebaseerd op de symptomen, die na inoculatie op tabak en andere waardplanten verschenen. De verbreiding van het Y^N-virus had snel plaats, vooral in die landen, waar tabak en aardappelen naast elkaar werden verbouwd. In Zwitserland (BOVEY, 1955) en Schotland (TODD, 1961) werd in 1953 het virus in het veld geconstateerd. In Nederland en waarschijnlijk eveneens in de andere Europese aardappelen producerende landen heeft het virus zijn grootste verspreiding in 1959 en 1960 verkregen. In Nederland is tot heden waarschijnlijk slechts één substam van het Y^N-virus gevonden (ROZENDAAL, mondelinge mededeling). KLINKOWSKI & SCHMELZER (1960) vonden, dat isolaties uit verschillende landen niet identiek waren. Volgens AUBERT (1959) zijn er ook substammen van het Y^N-virus („Virus de la nécrose des nervures du tabac”), die weinig of geen necrose op tabak doen ontstaan. De symptomen van deze substammen zouden pas enige maanden na de inoculatie op tabak verschijnen.

Met behulp van *Nicotiana tabacum* var. 'White Burley' kunnen „oude” en „nieuwe” stammen van het Y-virus worden onderscheiden. De eerste symptomen van beide groepen zijn gelijk, nl. oplichten der nerven en een zwak ombuigen der bladeren. Na inoculatie met necroseverwekkende stammen ontstaan afgestorven plekken op de hoofdnerf en op de stengel. De onderste bladeren buigen tegen de stengel, slechts enkele topbladeren behouden hun normale stand.

1.4. Eigenschappen van het Y^N-virus in vitro

Voor vergelijking en beschrijving van plantevirussen is de bestudering van de eigenschappen in vitro van het virus van belang. In het hierna volgende zullen alleen de eigenschappen in ruw plantesap worden behandeld, te weten het verdunningseindpunt, de thermale inactivering, de inactivering van het virus onder verschillende omstandigheden en de bepaling van de lengte der virusdeeltjes met behulp van de elektronenmicroscop. Deze bepalingen hebben met uitzondering van het elektronen-microscopisch onderzoek slechts een betrekkelijke waarde. Ze zijn nl. zeer afhankelijk van de concentratie die het virus in de plant heeft op het moment dat het sap wordt uitgeperst.

De bepalingen werden uitgevoerd volgens de standaardmethoden die BOS *et al.* (1960) hebben aangegeven.

1.4.1. Het verdunningseindpunt

KLINKOWSKI & SCHMELZER (1957), die tabak als waard- en toetsplant aanwendden, vonden voor het „Tabakrippenbräune-Virus” een verdunningseindpunt van 5×10^{-4} . NIENHAUS (1961/1962 c) concludeerde uit zijn proeven met de *Solanum demissum* bestaard 'A6' (in het vervolg aangeduid als 'A6'), dat het verdunningseindpunt 10^{-3} bedroeg. Uit zijn publikatie is echter niet af te leiden van welke besmette plantesoort hij voor deze bepaling uitging.

Het verdunningseindpunt van het Y^N -virus stelden wij in 1960 en 1963 vast. Hierbij is gewerkt met sap van respectievelijk secundair besmette aardappelplanten, rassen 'Bona' en 'Record', en sap van besmette tabaksplanten var. 'White Burley'. Als toetsplanten werden 'A6' en *Solanum demissum* 'Y' (Sdy) gebruikt. Uit de resultaten van de proeven bleek, dat het verdunningseindpunt van het virus in bladsap van bovengenoemde waardplanten tussen 10^{-3} en 10^{-4} ligt.

1.4.2. *Het verlies van infectievermogen bij verhitting*

In de literatuur worden omtrent de thermale inactivering van het Y-virus sterk uiteenlopende waarden vermeld. De auteurs KOCH & JOHNSON (1935) vonden als inactiveringstemperatuur 58°C ; SMITH (1957) 52°C ; FOLSOM & BONDE (1937) $60-65^{\circ}\text{C}$; DYKSTRA (1939) 57°C ; KÖHLER (1940) 58°C ; DARBY *et al.* (1951) $56-62^{\circ}\text{C}$.

Uit deze literatuurgegevens is het niet altijd duidelijk welke stam van het Y-virus onderzocht werd, doch waarschijnlijk ging het hier om het Y^O -virus. KÖHLER (1955) vond voor het „Tabakrippenbräune-Virus” een inactiveringstemperatuur van 60°C ; KLINKOWSKI & SCHMELZER (1957) vermeldden voor dit virus $60-62^{\circ}\text{C}$.

Om de inactiveringstemperatuur van het Y^N -virus te bepalen werden het sap van secundair met Y^N -virus besmette aardappelplanten (rassen 'Bintje', 'Record', 'Vorán') en het sap van besmette tabaksplanten var. 'White Burley' gebruikt. De aardappelplanten werden gekweekt in een luisvrije kas met wisselende temperatuur. Tabaksplanten met twee goed ontwikkelde bladeren werden in een luisvrije kas met een constante temperatuur van 20 tot 22°C geplaatst. Twee dagen na het oppotten werden de planten met Y^N -virus geïnoculeerd; ongeveer 12 dagen na de inoculatie werden ze voor de proefnemingen gebruikt. Het toetsen op de aanwezigheid van virus in het verhitte sap had plaats op bladeren van 'A6'. Uit de resultaten van de proeven bleek, dat de inactiveringstemperatuur voor het Y^N -virus in sap van aardappelplanten 57°C en in sap van tabaksplanten 60°C bedroeg. Dit laatste is dus in overeenstemming met hetgeen KÖHLER (1955) vond. Uit deze resultaten blijkt, dat de inactiveringstemperatuur van het virus afhankelijk is van de waardplant waarin het desbetreffende virus zich bevindt.

In proeven met Y-virus kwam BORGES (1963) tot een dergelijke conclusie. Zij stelde vast, dat de inactiveringstemperatuur van dit virus in sap van tabaksplanten ongeveer 60°C was. In het sap van *Datura metel* planten was de inactiveringstemperatuur echter 55°C . Deze verschillen kunnen waarschijnlijk worden verklaard uit een verschil in coagulatie van het sap van de waardplant. Uit onze proeven kwam nl. duidelijk naar voren dat dit niet werd veroorzaakt door verschillen in concentratie van het virus in de waardplanten op het moment dat het sap werd uitgeperst. Want door middel van de 'A6'-bladhelften-methode was aangetoond, dat de virusconcentratie in beide waardplanten gelijk was.

1.4.3. *De besmettelijkheid van het Y^N -virus bij bewaring van sap bij 20°C*

Voor het onderzoek van de houdbaarheid van Y^N -virus in plantesap gingen wij uit van sap dat na het persen in een fles bij 20°C werd bewaard. Op gezette tijden werd steeds een gelijke hoeveelheid sap uit de fles genomen en op 'A6'-bladeren uitgesmeerd.

In drie proeven werd de infectiositeit bepaald van sap van met Y^N -virus besmette tabaksplanten, var. 'White Burley' en van het sap van besmette aardappelplanten ras-

sen 'Bintje' en 'Record'. Na drie weken bewaren kon het virus niet meer in het plantsap worden aangetoond (Tabel 1). Deze waarneming is in overeenstemming met die van DARBY *et al.* (1951), die bij een onderzoek met 18 stammen van het Y-virus vaststelden, dat bij een bewaarperiode van 18 dagen bij een temperatuur van 20 tot 22°C het virus niet meer in het perssap aantoonbaar was. KLINKOWSKI & SCHMELZER (1957), die tabak als toetsplant gebruikten, concludeerden echter, dat het „Tabakripenbräune-Virus” 50 dagen na het uitpersen van besmette tabaksbladeren nog infectieus was, indien het sap bij kamertemperatuur was bewaard. Dit is dus tweemaal zo lang als door ons werd waargenomen. Een mogelijke verklaring hiervoor is, dat KLINKOWSKI & SCHMELZER tabak als toetsplant gebruikten, waarbij gewoonlijk een groter bladoppervlak wordt geïnoculeerd dan indien 'A6'-bladeren worden gebruikt. Hierdoor kan de kans op infectie bij de tabaksplanten groter zijn geweest dan bij de 'A6'-bladeren en is het mogelijk dat over een langere periode infectieus virus in het bladsap kan worden aangetoond.

TABEL 1. De infectiositeit van Y^N-virusbevattend sap bewaard bij 20°C, uitgedrukt in aantal lokale vlekken per 'A6'-blad (gemiddelde van tien blaadjes).
Ageing of virus Y^N expressed in number of local lesions per 'A6' leaf (average of ten leaflets).

Virusbevattend sap van <i>Virus-containing sap from</i>	Aantal dagen na bewaren <i>Number of days after storage</i>										
	0	1	4	7	12	14	18	21	22	28	29
tabaksbladeren <i>tobacco leaves</i>	73,5			3,0		0,9		0,8		0	
'White Burley' aardappelblad <i>potato leaves</i>	168,2	174,2	2,3		1,2		0		0,2		0
'Bintje' aardappelblad <i>potato leaves</i>	145,2	146,4	0,8		5,5		0,7		0,3		0
'Record'											

Omdat de besmettelijkheid van het Y^N-virus in vitro snel achteruit ging, werd ook nagegaan of dit reeds binnen enkele uren na het uitpersen is waar te nemen. Om dit te onderzoeken werd het virusbevattend sap uit tabaksplanten, var. 'White Burley' en dat uit aardappelplanten ras 'Bintje' op vier tijdstippen na het uitpersen op infectiositeit onderzocht. De aardappel- en tabaksplanten waren op dezelfde wijze gekweekt als aangegeven is onder 1.4.2. Na het uitpersen werd steeds op een bepaald tijdstip een gelijke hoeveelheid sap, dat bij kamertemperatuur was bewaard, op tien vergelijkbare kwartgedeelten van tien 'A6'-bladeren uitgesmeerd. De 'A6'-blaadjes werden in vieren gedeeld om mogelijke individuele verschillen tussen de bladeren met betrekking tot het ontstaan der lokale vlekken uit te sluiten. Binnen één 'A6'-blaadje kon dus de invloed van de tijd op de infectiositeit van het sap worden afgelezen. Na de incubatietijd werd uit elk kwartgedeelte 'A6'-blad met een kurkboor (ø 20 mm) een stukje geponst. De op deze stukjes voorkomende lokale vlekken werden geteld. Uit de resultaten van een proef bleek, dat respectievelijk 60, 90, 120 en 150 minuten na het uitpersen van het blad gemiddeld respectievelijk 23, 18, 17 en 13 lokale vlekken per 'A6'-bladstukje waren verschenen. Eenzelfde achteruitgang in infectiositeit werd ook vastgesteld in een tweede proef (zie Tabel 2, kolom 2).

Ook de infectiositeit van het sap van besmet aardappelblad liep in de eerste dag van het bewaren zeer sterk terug. Dit kan niet uit Tabel 1 worden afgelezen. Het is waarschijnlijk te wijten aan het feit, dat in dit geval niet op elke datum van toetsen 'A6'-bladeren van gelijke vatbaarheid zijn gebruikt.

In een tweetal proeven werd de invloed van het verdunnen van virusbevattend sap uit tabaksplanten op het verloop in de infectiositeit tijdens de bewaring onderzocht. Het sap werd in beide proeven verdund met gedestilleerd water of met 0,1 M fosfaat-citroenzuurbuffer pH 7 (McIlvaine) tot 1 op 25. Het toetsen van het sap op aanwezigheid van virus had op verschillende tijdstippen na het uitpersen op gedeelten van eenzelfde 'A6'-blad plaats. De resultaten van één der proeven zijn vermeld in Tabel 2 (kolom 3 en 4).

TABEL 2. De invloed van het verdunnen van virusbevattend sap van tabaksbladeren op de infectiositeit, bepaald op verschillende tijdstippen na het uitpersen.
Effect of diluting of virus Y^N containing sap of tobacco leaves on infectivity at different times after expressing sap.

Aantal minuten na uitpersen sap <i>Number of minutes after expressing sap</i>	Aantal lokale vlekken per 'A6'-blad ¹ <i>Number of local lesions per 'A6' leaf¹</i>		
	Onverdund sap <i>Undiluted sap</i>	Sap verdund met buffer <i>Buffer-diluted sap (1:25)</i>	Sap verdund met water <i>Water-diluted sap (1:25)</i>
15	41	10	14
75	16	8	10
135	18	4	19
195	11	5	19

¹ Gemiddelde van tien blaadjes.

¹ *Average of ten leaflets.*

Uit deze tabel kan worden geconcludeerd, dat de fosfaat-citroenzuurbuffer geen stabiliserende invloed heeft op de infectiositeit van het virus in het sap. Daarentegen blijft de infectiositeit gedurende tenminste drie uur constant, als het sap met water verdund is.

1.4.4. Elektronenmicroscopie

Uit een onderzoek, waarbij vijf substammen van het Y^O-virus waren betrokken, concludeerden BODE & PAUL (1956) dat de gemiddelde lengte van de virusdeeltjes 759 m μ bedroeg. De substammen van het Y^O-virus konden niet onderscheiden worden op grond van verschillen in de gemiddelde lengte der virusdeeltjes. BRANDES (1964) vermeldde voor de gemiddelde lengte van het aardappel-Y-virus (zonder nadere aanduiding van het type) 729 m μ .

Bij ons onderzoek waren de preparaten, die respectievelijk het Y^O- en het Y^N-virus bevatten, gemaakt volgens de zgn. „indoopmethode” (BRANDES, 1957). De opnamen met de elektronenmicroscopie (Philips EM 100) werden verricht door de Landbouw Fysisch-Technische Dienst te Wageningen. De metingen der deeltjes werden verricht volgens de standaardmethode van BOS *et al.* (1960). De preparaten waren geschaduwd met palladium en daarna bespoten met een suspensie van polystyreenbolletjes (ϕ 264 m μ). Beide onderzochte Y-virusstammen waren vermeerderd in tabaksplanten var. 'White Burley' en in aardappelplanten. Omdat het gebruik van polystyreenbolletjes als standaard voor de lengtemetingen tot onjuiste metingen kan leiden (BRANDES &

PAUL, 1957) werden preparaten gemaakt, waarin zowel deeltjes van het Y-virus als van het tabaksmozaïekvirus voorkwamen. Ook werden naast preparaten met Y-virus alleen, preparaten gemaakt, die aardappel-X-virus bevatten.

Op basis van de gemiddelde lengte der deeltjes van het aardappel-X-virus (513 m μ) en tabaksmozaïekvirus (300 m μ) (BRANDES, 1964) kon aldus worden bepaald in welke grootteklasse de meeste Y-virusdeeltjes voorkwamen. Op deze wijze konden geen verschillen in lengte tussen deeltjes van het Y^N- en Y^O-virus worden aangetoond. De resultaten van twee proeven waren als volgt. Voor het Y^N-virus werden de grootste aantallen deeltjes gevonden in resp. de klassen 725-750 m μ en 750-775 m μ (totaal respectievelijk 74 en 133 deeltjes). Voor het Y^O-virus waren deze klassen respectievelijk 700-725 m μ (totaal aantal deeltjes 106) en 725-750 m μ (totaal aantal deeltjes 110).

Hieruit blijkt, dat de door ons verkregen resultaten met die van BRANDES (1964) overeenkomen.

1.5. De besmetting van gezonde aardappelplanten met Y^N-virus door aanraking van het loof met dat van zieke planten

Uit de proeven van VÖLK (1959) is duidelijk gebleken, dat de substammen van het „Tabakrippenbräune-Virus” door verschillende soorten bladluizen op de aardappel kunnen worden overgebracht. Ook HILLE RIS LAMBERS (1960) wees op de grote rol, die de bladluizen bij de overdracht van het Y^N-virus spelen. Niet alleen *Myzus persicae* Sulz. maar ook andere niet op aardappelplanten levende bladluizen kunnen de besmetting met dit virus tot stand brengen.

De vraag rees of het Y^N-virus gelijk het aardappel-X-virus, ook door aanraken zou kunnen worden overgebracht. Het is bekend, dat de besmetting met het aardappel-X-virus gemakkelijk kan plaats vinden. Door werktuigen en kleding, die met X-virus-zieke planten in aanraking zijn geweest, kunnen gezonde planten worden besmet (TODD, 1958; MANZER & MERRIAM, 1961).

Respectievelijk acht en tien gezonde knollen van de aardappelrassen 'Eigenheimer' en 'Bintje' werden in een kas gepoot. Vier weken na het poten werd de helft van het aantal planten met Y^N-virus, de andere helft van het aantal planten met X-virus in aanraking gebracht. Dit had plaats door met de handen, die respectievelijk waren besmeerd met Y^N- en X-virusbevattend sap, langs de planten te strijken. Bij toetsing op aanwezigheid van virus door inoculatie van 'A6' en *Gomphrena globosa* zes weken na de aanvang van de proef, bleken alle planten met respectievelijk Y^N- en X-virus besmet te zijn.

Een ander proefje werd op de volgende wijze uitgevoerd. Drie gezonde en twee met Y^N-virus besmette aardappelplanten van het ras 'Bintje' (leeftijd zes weken) werden dicht tegen elkaar geplaatst. Een ventilator veroorzaakte een luchtstroom, waardoor gedurende een periode van tien dagen de zieke en gezonde planten langs elkaar bewogen. Door de sterke luchtstroom werden verschillende bladeren beschadigd. De na-teelten van de aanvankelijk gezonde planten bleken vrijwel geheel met Y^N-virus besmet te zijn. Ook ROZENDAAL (1963) concludeerde, dat op deze wijze het Y^N-virus op gezonde planten kan worden overgebracht. Buiten is dit zeker niet in deze mate het geval, gezien de geringe besmetting in zomers, waarin weinig bladluizen worden waargenomen. De resultaten van een in 1963 uitgevoerde proef wijzen er op, dat overbrenging van het Y^N-virus door contact in het veld van geen betekenis is (SCHEPERS, 1964).

1.6. Waardplanten

Een uitgebreid onderzoek naar de waardplanten van de nieuwe stam van het Y-virus werd door BODE (1959 b) verricht. Zijn conclusie, dat de waardplanten vrijwel alleen in de familie der *Solanaceae* werden aangetroffen, kon door DE BOKX (1961 a) worden bevestigd. In deze familie komen echter ook enige daartoe onderzochte soorten voor, die na inoculatie met Y^N-virusbevattend sap niet besmet raken. Dit zijn *Datura stramonium* L., *Nicotiana glauca* Grah., *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Cyphomandra betacea* Sendt., *Solanum melongena* L., *Solanum racemigerum* Zodda en *Solanum sodomaeum* L.

Door SCHMELZER *et al.* (1960) zijn voor Duitsland drie substammen van het „Tabakrippenbräune-Virus” genoemd, die door verschillen in symptomen op tabak, *Physalis floridana* Rydb. en *Petunia hybrida* Vilm. kunnen worden onderscheiden. De stam aangeduid met 'Wi', die op *Petunia hybrida* en *Physalis floridana* systemische symptomen teweegbrengt, vertoont gelijkenis met het Nederlandse Y^N-virus. Na besmetting met het Y^N-virus vertonen de drie laatstgenoemde plantesoorten nl. mozaïek-symptomen, evenals na inoculatie met de stam 'Wi'.

1.7. Nabespreking

In het voorgaande is gewezen op het voorkomen van een groot aantal vormen van het aardappel-Y-virus. Het blijkt dat de eigenschappen van het Y^N-virus vrijwel alle gelijk zijn aan die van het „Tabakrippenbräune-Virus”. Het is echter niet duidelijk of het Y^N-virus identiek is met een van de beschreven substammen van het „Tabakrippenbräune-Virus”.

2. HET CONSERVEREN VAN Y^N-VIRUS IN VITRO

2.1. Inleiding

Veel virussen kunnen in vitro lange tijd hun infectiositeit behouden, indien ze bij lage temperaturen worden bewaard. Het was niet bekend, hoe het Y^N-virus zich na bewaren bij lage tot zeer lage temperaturen zou gedragen. Hoewel het voor het in stand houden van bepaalde virusstammen van belang is als slechts een klein deel van de oorspronkelijke infectiositeit gedurende een betrekkelijk lange bewaarperiode kan worden behouden, is het voor kwantitatief werk belangrijker, dat men een conserveringsmethode heeft waarbij het infectievermogen gedurende geruime tijd constant op een redelijk niveau blijft, zodat over een „standaard”-inoculum kan worden beschikt.

Ofschoon in de proeven die in de volgende hoofdstukken zullen worden behandeld, geen gebruik van een dergelijk standaardinoculum is gemaakt, werd het toch wenselijk geacht het onderzoek omtrent het conserveren van Y^N-virus in vitro hier te vermelden. Het had betrekking op bewaring van virusbevattend sap en blad in bevroren toestand, op droging van met virus besmette bladeren boven calciumchloride en op het droogvriezen van besmette bladeren. Deze methoden werden met elkaar vergeleken teneinde vast te stellen welke de beste was om de besmettelijkheid van het Y^N-virus te conserveren.

Het drogen van virushoudend blad bij 2°C boven CaCl₂ is reeds door McKINNEY (1947) toegepast. Het aardappel-Y-virus, op deze manier bewaard, was volgens hem na 400 dagen nog infectieus. LAL & SILL (1958) meldden, dat het „wheat streak mosaic” virus, aldus behandeld, gedurende vijf jaar zijn besmettingsvermogen behield. In onze proeven werd Y^N-virusbevattend aardappelblad bij 4°C boven CaCl₂ gedroogd.

Bij het droogvriezen wordt biologisch actief materiaal snel bevroren, waarna het water door sublimatie wordt onttrokken. In het bevroren materiaal zijn de enzymatische processen sterk vertraagd. Door alleen te drogen kan men deze processen weliswaar ook hinderen, maar het materiaal wordt dan meestal ongunstig veranderd. Dit kan dikwijls worden voorkomen als het droogvriezen wordt toegepast. In de plantevirologie wordt deze methode vooral gebruikt voor labiele virussen, die moeilijk op een andere wijze in vitro kunnen worden bewaard. Ook hier gaat het er veelal alleen om het virus in stand te houden, zonder dat men er aandacht aan schenkt of het infectievermogen belangrijk daalt (VAN DER VEKEN, 1960). DYKSTRA & DU BUY (1942) droogden Y-virusbevattend sap uit aardappelplanten. De verwerking en droging geschiedde in een CO₂-rijke omgeving. Het drooggevroren materiaal was vier maanden nadien nog infectieus.

BEST & GALLUS (1953) publiceerden over het droogvriezen van blad besmet met „tomato spotted wilt” virus. Dit zeer labiele virus kon aldus 125 dagen in stand worden gehouden. FINLAY & PARKER (1954) gelukte het door middel van een gewijzigd procédé de infectiositeit van dit virus gedurende 21 maanden te behouden. HIDAOKA & TOMARU (1960) meldden, dat met hun werkwijze het komkommermozaïekvirus in drooggevroren tabaksblad 425 dagen infectieus bleef, zonder in besmettingsvermogen achteruit te gaan. In 1960 werd door HOLLINGS & LELLIOTT de houdbaarheid van 46 virussen na droogvriezen onderzocht. Het Y-virus was na 7 maanden nog infectieus, maar de besmettelijkheid was zeer gering. TIMIAN & KLOSTERMAN (1962) vonden, dat het „barley stripe mosaic” virus in drooggevroren blad 12 maanden kan worden bewaard, zonder dat het besmettingsvermogen achteruit ging. Het desbetreffende materiaal werd door hen bij -15°C bewaard.

2.2. Materiaal en methoden

Om na te gaan hoe de infectiositeit van het Y^N-virus in bevroren, virusbevattend blad of sap zou verlopen, werd dit materiaal bij -20°C bewaard; op gezette tijden werden monsters ervan direct na ontdooien door middel van inoculatie op toetsblaadjes op hun infectievermogen onderzocht. Hierbij waren ook proeven betrokken, waarin het effect van de toevoeging van reducerende stoffen werd nagegaan.

De droging van virusbevattend aardappelblad boven CaCl₂ geschiedde bij 4°C; bepaald werd hoeveel vocht er in dit proces werd onttrokken. Nadat aan het gedroogde blad zoveel water was toegevoegd als door droging was verdwenen, werd de besmettelijkheid van de suspensie door inoculatie op toetsblaadjes onderzocht.

Voor het droogvriezen werd gebruik gemaakt van een Phywe droogvriesapparaat, type L 2, geplaatst op het Laboratorium voor Virologie. Er werd hierbij gelet op enige factoren. In de eerste plaats kan de snelheid van het bevriezen van het te drogen materiaal invloed hebben op de mate waarin het planteweefsel wordt beschadigd. Algemeen neemt men aan, dat langzame bevrozing de cellen sterker schaadt dan een snelle bevrozing. Ten tweede is het van belang te weten bij welke temperatuur men het water aan het bevroren materiaal kan onttrekken, zonder dat het besmettingsvermogen van het virus aanzienlijk vermindert. De droging verloopt nl. sneller naarmate het materiaal minder diep is bevroren. Tenslotte dient men te weten hoeveel vocht er in het materiaal achter mag blijven, zonder dat hierdoor het besmettingsvermogen ongunstig wordt beïnvloed. Hiermede hangt samen de vraag, hoe het gedroogde materiaal het beste kan worden bewaard.

In een reeks proeven, waarbij het bevriezen en het drogen op verschillende wijzen werd uitgevoerd, onderzochten wij de infectiositeit van drooggevroren tabaksblad var. 'White Burley'. Het desbetreffende blad vertoonde duidelijke symptomen van het Y^N-virus. Het kweken der tabaksplanten geschiedde op de wijze, zoals beschreven in 1.4.2.

Van het drooggevroren tabaksblad werd het resterende gewicht bepaald en uitgedrukt in procenten van het verse gewicht. Bovendien werden in vele gevallen uit het gedroogde blad monsters getrokken, die in de droogstoof bij 110°C werden nagedroogd, hetgeen een betere indruk gaf van de hoeveelheid vocht die tijdens het droogvriesproces was verdwenen, respectievelijk achtergebleven.

Aan het drooggevroren blad werd zoveel gedestilleerd water toegevoegd als door droging was onttrokken. Het gedroogde blad werd vervolgens gedurende drie minuten met een stamper in een mortier intensief met het water gemengd, waarna de verkregen suspensie in onverdunde en in verdunde toestand op toetsblaadjes werd geïnoculeerd.

De infectiositeit werd bepaald met behulp van blaadjes van de toetsplanten 'A6' en Sdy en werd uitgedrukt in het gemiddelde aantal vlekken dat per eenheid van bladoppervlak was ontstaan.

Afgeplukte, geïnoculeerde toetsblaadjes werden onder continue belichting bij constante temperatuur bewaard. In het algemeen werden alleen de eindblaadjes van een samengesteld blad gebruikt. Ze werden bewaard in met glazen platen afgesloten zinken bakken (afmetingen 60x30x5 cm). Op kleine schaal werd ook gebruik gemaakt van plastic bakjes, omhuld door doorzichtige plastic zakken (DE BOKX & HIDDEMA, 1961). De geïnoculeerde blaadjes werden uitgelegd op vochtig filtreerpapier, dat op een raamwerk rustte te halver hoogte van de zinken bak. De randen van het filtreerpapier lagen op de bodem van de bak, waarop steeds een laagje water stond. Aldus was een hoge relatieve luchtvochtigheid in de bak verzekerd.

De bewaartemperaturen voor 'A6'- en Sdy-blad bedroegen respectievelijk 24 tot

25°C en 18 tot 20°C. Vijf en drie dagen na de inoculatie werden de vlekken op respectievelijk 'A6'- en Sdy-blad geteld.

De toetsblaadjes werden voor het inoculeren lichtelijk bestoven met Carborundum (siliciumcarbide) grofte 500. Het bestuiven had plaats met een kapperspoederspuit.

Voor de belichting van het geïnoculeerde toetsblad werden Philips TL-fluorescentielampen, 40 Watt, kleur 33 gebruikt. De geïnoculeerde 'A6'- en Sdy-blaadjes werden respectievelijk bij een lichtintensiteit van ongeveer 1500 en 1000 Lux bewaard.

Voor zover de resultaten van de proeven wiskundig werden verwerkt, werden de aantallen vlekken getransformeerd volgens de formule $Z = {}^{10}\log \frac{1}{2} [x + c + \sqrt{(x^2 + 2cx)}]$ (KLECZKOWSKI, 1955). Hierin is x het aantal vlekken, c een constante (hiervoor is een waarde 10 gekozen). Deze logaritmische transformatie houdt in, dat als het aantal vlekken nul bedraagt de waarde 0,7 wordt verkregen.

Een door een bepaalde behandeling veroorzaakt verschil wordt genoemd „zeer significant” als $P < 0,01$ en „significant” als $P < 0,05$.

2.3. Bewaren bij een temperatuur beneden 0°C

Ten einde de mogelijkheid na te gaan om Y^N -virusbevattend plantesap bij -20°C te bewaren, werd op 29 oktober 1962 sap van met dit virus besmette tabaksplanten var. 'White Burley' in gelijke porties bij -20°C geplaatst. Maandelijks werd een portie ontdooid en uitgesmeerd op tien 'A6'-blaadjes. Bij de aanvang der proef werden 109 vlekjes per toetsblad geteld. Reeds na een maand bewaren was dit aantal gedaald tot 29. Na 9 tot 12 maanden bewaren werden 3 tot 1 vlekje per blad waargenomen. Hieruit blijkt dus, dat er in het plantesap, bewaard bij -20°C , tenminste een jaar infectieus achterblijft. Het infectievermogen neemt echter vrij snel af.

In enige proeven kon worden vastgesteld, dat reeds één dag na het bevriezen van het virusbevattend materiaal een sterke vermindering van de infectiositeit kon worden waargenomen. Opvallend was, dat deze vermindering groter was, indien het blad, zowel van besmette aardappel- als tabaksplanten, ná het bevriezen inplaats van vóór het bevriezen was uitgeperst. De vermindering van het infectievermogen trad ook op als het virusbevattend blad bij -5°C werd bewaard. In deze proeven werd het infectievermogen van het bevroren en ontdooid materiaal vergeleken met de infectiositeit van het plantemateriaal dat een tot vijf dagen in een plastic zakje bij $+5^\circ\text{C}$ was bewaard. Bij langere bewaarperioden werd vers bladmateriaal van proefplanten uit de kas gebruikt.

De toetsingen werden steeds direct na het ontdooiden op 'A6'-blad volgens de zgn. bladhelften-methode uitgevoerd. In Tabel 3 zijn de resultaten van deze proeven samengevat.

Zoals in het voorgaande werd vastgesteld, neemt de infectiositeit af, naarmate het virusbevattend sap langer wordt bewaard. Het is denkbaar, dat het virus onder invloed van in het plantesap voorkomende stoffen wordt geoxydeerd of dat de virusdeeltjes aggregeren. Deze processen zouden ook plaats kunnen hebben bij het bevriezen van virusbevattend sap.

In enige proeven werd onderzocht of door toevoegen van reductiemiddelen aan het virusbevattend sap het verlies aan infectiositeit kon worden tegengegaan. Er werd vastgesteld, dat bij 5 en 20°C toevoeging van reductiemiddelen, zoals natriumascorbinaat en natriumsulfiet aan Y^N -virusbevattend sap de vermindering in infectievermogen tegenging. Het effect van natriumsulfiet (0,2%) was gunstiger dan dat van natriumascorbinaat (0,2%). Ook in het virusbevattend sap, dat bij -20°C werd be-

TABEL 3. Het infectievermogen van Y^N-virus, bepaald na bewaring bij temperaturen beneden 0°C.
Infectivity of virus Y^N after storage at temperatures below 0°C.

Proef No. <i>Experiment No.</i>	Bewaartempera- tuur <i>Storage tempera- ture</i>	Inoculum	Duur van bewa- ring (dagen) <i>Duration of storage (days)</i>	Infectiositeit ¹ <i>Infectivity¹</i>
625	-20°C	sap aardappelblad <i>sap of potato leaves</i>	1	156/ 923=16,9%
629	-20°C	sap tabaksblad <i>sap of tobacco leaves</i>	21	134/1320=10,1%
		tabaksblad <i>tobacco leaves</i>	21	20/1320= 1,5%
		sap aardappelblad <i>sap of potato leaves</i>	21	185/1247=14,8%
		aardappelblad <i>potato leaves</i>	21	43/1247= 3,4%
636	-5°C	aardappelblad <i>potato leaves</i>	1	57/ 509=11,1%
	-20°C		1	39/ 509= 7,6%
	-5°C		5	2/ 193= 1,0%
	-20°C		5	9/ 193= 4,6%
638	-20°C	sap tabaksblad <i>sap of tobacco leaves</i>	1	421/ 654=65%
	-20°C	tabaksblad <i>tobacco leaves</i>	1	564/ 870=64%

¹ Teller = aantal lokale vlekken op tien halve 'A6'-blaadjes na inoculatie met het bewaarde en ont-
dooidde materiaal.

Noemer = aantal lokale vlekken op tien halve 'A6'-blaadjes na inoculatie met vers materiaal.

¹ Numerator = number of local lesions on ten 'A6' half leaflets after inoculation with stored and
defrosted material.

Denominator = number of local lesions on ten 'A6' half leaflets after inoculation with fresh
material.

waard, kon vermindering van de infectiositeit worden tegengegaan, indien 0,2% na-
triumsulfiet aan het sap werd toegevoegd. De resultaten van de proeven betreffende
het toevoegen van natriumsulfiet aan verdund en onverdund Y^N-virusbevattend sap
voor het bevroren, zijn weergegeven in Tabel 4. Evenals uit Tabel 3, kan uit de resul-
taten weergegeven in Tabel 4, geconcludeerd worden, dat de infectiositeit sterk terug-
loopt in onverdund of met water verdund virusbevattend sap, dat bij -20°C wordt
bewaard. Door toevoeging van natriumsulfiet aan het virusbevattend sap vóór het
bevroren kan de vermindering in infectiositeit worden tegengegaan. In met water (1:5)
verdund virusbevattend sap is dit effect groter dan in onverdund sap. In het eerstge-
noemde is het effect zo groot, dat de infectiositeit gedurende tenminste 65 dagen
vrijwel constant blijft. Dit kan worden afgeleid uit het feit dat de infectiositeit van het
zonder meer met water verdunde sap regelmatig afneemt.

2.4. Drogen boven calciumchloride

Virusbevattend blad respectievelijk van de rassen 'Bintje' en 'Vorán' en van de ras-
sen 'Bintje' en 'Record', dat bij 4°C boven CaCl₂ was gedroogd, had zes weken nadat
het drogingsproces was begonnen ongeveer 92% van zijn gewicht aan vocht verloren.

TABEL 4. Infectiositeit van Y^N-virus na ontdooien in diepgevroren bladsap, waaraan natriumsulfiet was toegevoegd.
Infectivity of virus Y^N after thawing in deep-frozen sap of leaves which was mixed with sodium sulphite.

Proef No. <i>Experiment No.</i>	Aantal dagen na bewaren <i>Number of days after storage</i>	Infectiositeit na ontdooien ¹ <i>Infectivity after thawing¹</i>
635 onverdund sap <i>undiluted sap</i>	0	603/571
	14	602/230
	20	452/133
	27	570/74
	46	213/16
	56	295/15
	70	388/11
	103	308/7
636 verdund sap <i>diluted sap</i>	0	292/293
	14	232/99
	30	215/62
	65	237/42
	90	473/102
	120	132/37
637 verdund sap <i>diluted sap</i>	0	120/134
	14	27/5
	28	63/3
	63	127/14

¹ Teller = aantal lokale vlekken op tien 'A6'-blaadjes (ø 20 mm) na inoculatie met diepgevroren en ontdooid, natriumsulfiet bevattend bladsap.

Noemer = aantal lokale vlekken op tien 'A6'-blaadjes (ø 20 mm) na inoculatie met diepgevroren en ontdooid, onbehandeld bladsap.

¹ Numerator = number of local lesions on ten 'A6' leaflets (ø 20 mm) after inoculation with deep-frozen and defrosted sodium sulphite-containing leaf sap.

Denominator = number of local lesions on ten 'A6' leaflets (ø 20 mm) after inoculation with deep-frozen and defrosted untreated leaf sap.

Nadat aan het gedroogde blad zoveel water was toegevoegd als door droging was onttrokken, werd de besmettelijkheid van de suspensie door toetsing op 'A6'-blad onderzocht. Het bleek, dat het blad van een der proeven na 22 weken bewaren nog infectieus was. Het infectievermogen was echter gering, nl. gemiddeld vijf vlekken per 'A6'-blaadje (ø 20 mm). Het blad van een tweede proef werd 16 weken na inzetten der proef getoetst op aanwezigheid van virus. Het bladmateriaal bleek infectieus te zijn. De infectiositeit was gering (slechts 2 vlekken per 'A6'-blaadje ø 20 mm).

Uit het voorgaande kan worden vastgesteld, dat voor bepaalde doeleinden het Y^N-virusbevattend blad voor het conserveren van Y^N-virus op eenvoudige wijze boven calciumchloride kan worden gedroogd. Er treedt echter snel een sterke vermindering van infectiositeit op, zodat het aldus bewaarde materiaal niet als standaard bij de bepaling van virusconcentraties (respectievelijk infectiositeit) dienst kan doen.

2.5. Droogvriezen

Het drooggevroren tabaksblad bleek na bevochtiging het vocht zeer snel op te nemen. Het had hierna een lichtgroene kleur. Het besmettingsvermogen werd uitgedrukt in procenten van de infectiositeit van het verse blad. Dit blad, bestaande uit een monster getrokken uit het te behandelen blad, was bij +5°C bewaard. In Tabel 5 zijn de resultaten van de proeven samengevat.

TABEL 5. Invloed van het droogvriezen op de infectiositeit van Y^N-virus in tabaksblad.
Effect of freeze-drying on infectivity of virus Y^N in tobacco leaves.

Proef No. Experiment No.	Bevriezen Freezing	Drogen Drying	Droog- gewicht % Dry weight %	Vocht % Moisture %	Infectiositeit % ¹ Infectivity % ¹			
					B ²		GB ³	
					OV ⁴	V ⁵	OV ⁴	V ⁵
1031	met koolzuur sneeuw with dry ice	-10°C, 78 uur/hrs	13		25			
114		tot/to 10°C, 21 uur/hrs	9		75	41,5		
115		-20°C, 21 uur/hrs	11,7		73	43		
116		-5°C, 45 uur/hrs	8,7	9	90	86		
1111	in 4 uur van 0 tot -30°C in 4 hrs from 0 to -30°C	-10°C, 46 uur/hrs	10,5	20			22,5	30,1
1113		-10°C, 46 uur/hrs	13,5	41,2	24	22		
1115		-10°C, 54 uur/hrs	12,6	13,5			22,9	26,5
1121		-17°C, 96 uur/hrs	8,5	13,1	16	20		
1118	een half uur bij -30°C half an hour at -30°C	tot/to 10°C, 22 uur/hrs	11,4	14,1			38,9	25,5
1118			11,5	18,9	48	50		
1121		-10°C, 48 uur/hrs	9,9	22	31	46		
1121		-10°C, 96 uur/hrs	7,4	13,1	54	17		

$$^1 \text{ Percentage} = \frac{\text{Aantal lesies na inoculatie met drooggevroren materiaal}}{\text{Aantal lesies na inoculatie met vers materiaal}} \times 100.$$

$$^1 \text{ Percentage} = \frac{\text{Number of lesions after inoculation with freeze-dried material}}{\text{Number of lesions after inoculation with fresh material}} \times 100.$$

²B = Niet gesneden blad / *Uncut leaves.*

³GB = Gesneden blad / *Cut leaves.*

⁴OV = Onverdund sap / *Undiluted sap.*

⁵V = Verdund sap / *Diluted sap.*

Uit de resultaten van deze proeven blijkt, dat in het algemeen door het droogvriezen de infectiositeit van het virus wordt verminderd. Dit wordt blijkbaar versterkt als men een lange voorvriesperiode van het verse materiaal toepast. Gesneden bladeren drogen sneller dan hele bladeren. Hoewel aanvankelijk werd gedacht, dat het snijden van het te drogen blad een ongunstige invloed op de infectiositeit had, kon dit niet duidelijk worden aangetoond.

Het drooggevroren blad kan als droog worden aangemerkt als het vochtpercentage (na drogen bij 110°C) minder dan 20% bedraagt. Dit kan na ongeveer 48 uur worden bereikt. Er kan verder worden geconcludeerd, dat de droogtemperaturen tussen -20 en -5°C vrijwel hetzelfde effect op het besmettingsvermogen van het virus hebben. Voor een snelle droging zal daarom een temperatuur tussen -10 en -5°C de geschikste zijn.

In enige proeven is onderzocht op welke wijze het drooggevroren blad bewaard kan worden, zonder dat de infectiositeit noemenswaard achteruitgaat. Naast elkaar werden vergeleken het bewaren van drooggevroren blad boven CaCl₂ bij temperaturen van 4, 20 en -20°C. Er werd vastgesteld, dat in het blad, dat gedurende vier weken bij kamertemperatuur (20°C) was bewaard het virus niet meer aangetoond kon worden. Het bewaren in de diepvrieskast (-20°C) leverde de beste resultaten op. De infectiositeit van het drooggevroren blad bewaard bij -20°C was nl. in een bepaalde proef respectievelijk 50 en 94 dagen na het droogvriezen tweemaal zo hoog als hetzelfde soort blad bewaard boven CaCl₂ bij 4°C.

2.6. Een vergelijking van de drie conserveringsmethoden

Ten einde na te gaan met welke van de eerder genoemde methoden, – diepvriezen, drogen boven CaCl_2 en droogvriezen van Y^{N} -virusbevattend blad of sap – het virus gedurende een lange tijd het grootste besmettingsvermogen kon behouden, werd een proef genomen, die hierna zal worden beschreven.

Bij een vergelijken van de infectiositeit over een lange termijn is het noodzakelijk, dat over toetsblad van steeds gelijke vatbaarheid kan worden beschikt. Indien het opkweken van de toetsplanten niet uniform kan geschieden heeft men dus op verschillende tijdstippen niet de beschikking over gelijkwaardig toetsblad.

Omdat in het algemeen de virusconcentratie in de waardplant afhankelijk is van uitwendige factoren, zoals licht en temperatuur (POUND, 1952; POUND & CHEO, 1952; BODE, 1959a) konden de tabaksplanten, waarin het Y^{N} -virus werd vermeerderd, niet zonder meer in een kas worden geplaatst. Dit zou nl. hebben betekend dat met twee variabele grootheden, vatbaarheid van de toetsplant en virusconcentratie in de waardplant, in de proef rekening had moeten worden gehouden. Om in elk geval een variabele uit te schakelen, is getracht de waardplanten zo uniform mogelijk op te laten groeien. Redelijkerwijs mocht dan worden aangenomen, dat deze planten, onverschillig op welke datum zij waren gezaaid, op het moment van oogsten een gelijke virusconcentratie zouden bezitten.

De waardplanten, tabak var. 'White Burley', werden steeds zeven weken na het zaaien met Y^{N} -virusbevattend sap op het eerste volledig ontwikkelde blad geïnoculeerd; drie weken na de inoculatie werd het besmette tabaksblad geoogst.

De tabaksplanten werden opgekweekt in een klimaatkast (afmetingen 148x65x105 cm) bij een temperatuur van 20 tot 22°C en een dagelijkse belichting van 6 uur tot 19 uur. Als lichtbron fungeerden 16 TL-lampen, Philips 60 Watt, kleur 33, die zich aan weerszijden, acht aan elke kant, in de lengterichting van de klimaatruimte bevonden.

Het zaaien der tabak geschiedde om de twee weken, zodat ook om de twee weken een hoeveelheid met Y^{N} -virus besmet tabaksblad beschikbaar kwam. Op deze tijdstippen werd het blad ontdaan van de hoofdnerfen en verdeeld in vijf partijen. Deze partijen blad werden respectievelijk als volgt behandeld.

- I Blad onbehandeld bij -20°C geplaatst.
- II Blad uitgeperst, sap bij -20°C bewaard.
- III Blad fijn gesneden en drooggevroren.
- IV Blad uitgeperst, sap drooggevroren.
- V Blad fijn gesneden, gedroogd boven CaCl_2 bij 4°C .

Het droogvriezen had op de volgende wijze plaats. Het voorvriezen duurde vier uur. Het drogen werd uitgevoerd bij ongeveer -10°C , gedurende 48 uur. Het drooggevroren materiaal werd bij -20°C bewaard.

Het aldus behandelde tabaksblad werd steeds in drie gelijke monsters verdeeld, zodat na verloop van tijd de toetsing van dit materiaal op drie verschillende tijdstippen zou kunnen plaats vinden.

Ongeveer acht maanden nadat de proef was begonnen werd materiaal dat op zes data, met tussenpozen van een maand, was geoogst en behandeld, op aanwezigheid van Y^{N} -virus door middel van 'A6'-blad getoetst. Hiervoor waren 31 samengestelde 'A6'-bladeren met drie jukblaadjes nodig. Door de blaadjes over de hoofdnerf door midden te snijden konden binnen elk blad zes verschillende objecten worden getoetst. Het totaal der te toetsen objecten bedroeg 31, nl. zes data maal vijf behandelingen vermeerderd met het object „vers blad”.

Volgens de analyse voor „balanced incomplete blocks” (plan 11.40 COCHRAN &

COX, 1953) werden de totalen per object waarin nog een blokeffect aanwezig was, omgerekend tot zuivere object-totalen. Delen door het aantal herhalingen (6) leverde dan het zuivere objectgemiddelde („adjusted mean per unit”), in getransformeerde vorm. De resultaten van de toetsingen zijn samengevat in Tabel 6. Ze zijn na inverse transformatie weergegeven in aantallen lokale vlekken per toetsblad.

TABEL 6. Het effect van het bewaren van Y^N-virusbevattend materiaal op de infectiositeit bij verschillende conserveringsmethoden.
Effect of storage of virus Y^N containing material on infectivity with different methods of preservation.

Bewaarduur (dagen) Duration of storage (days)	Aantal lokale vlekken ¹ Number of local lesions ¹				
	Diepvroozen Deep freezing		Droogvroezen Freeze-drying		Drogen met CaCl ₂ Drying with CaCl ₂
	sap	blad/leaves	sap	blad/leaves	blad/leaves
42	36	4	2	41	3
70	24	1	1	8	1
126	15	5	1	— ²	1
154	15	1	6	— ²	2
182	8	0	1	15	1
210	8	1	2	12	1
239	1	0	0	4	1

Vers blad³ 87
 Fresh leaves³

¹ Gemiddelde van 6 blaadjes.

¹ Average of 6 leaflets.

² Niet getoetst.

² Not tested.

³ Bepaald aan begin van proef.

³ Determined at the beginning of the experiment.

Bij bestudering van Tabel 6 valt het op, dat de infectiositeit zich in diepgevroren blad, drooggevroren sap en in boven CaCl₂ gedroogd blad gedurende de gehele bewaarperiode op een betrekkelijk laag niveau bevindt. Dit betekent, dat deze methoden niet geschikt zijn tot het verkrijgen van een „standaard” virusbevattend inoculum.

Uit Tabel 6 blijkt verder, dat de infectiositeit van het drooggevroren blad vrijwel gelijk is aan dat van het diepgevroren sap. Hoogstwaarschijnlijk kan het langzaam bevriezen van het blad verantwoordelijk gesteld worden voor de achteruitgang van het besmettingsvermogen.

Samenvattend kan worden gezegd, dat door middel van diepvroezen, droogvroezen en drogen boven CaCl₂ van virusbevattend blad de infectiositeit van het virus tenminste 239 dagen kan worden behouden. Alleen Y^N-virus in diepgevroren ruw blad-sap of in drooggevroren blad behoudt een redelijk besmettingsvermogen. Dit is echter veel geringer dan dat van het virus in vers blad. De infectiositeit in diepgevroren blad-sap neemt af naarmate het langer wordt bewaard. Voor het Y^N-virus in drooggevroren blad bestaat de tendens, dat de infectiositeit minder snel afneemt dan in diepgevroren sap.

Uit de resultaten bleek verder, dat als het droogvroezen van het blad niet direct na het bevroren plaats had, maar pas nadat het enige maanden in de diepvrieskast had gestaan, de infectiositeit van dit drooggevroren materiaal vrijwel gelijk was aan dat van het diepgevroren blad. Hieruit blijkt, dat de sterke achteruitgang van de infectiosi-

teit van diepgevroren blad niet tijdens het ontdooien maar tijdens het bevroren heeft plaats gevonden.

2.7. Nabespreking

Het Y^N -virus verdraagt zeer lage temperaturen (-60°C). In gedroogd besmet blad, boven CaCl_2 bij 4°C bewaard, kon na 239 dagen nog Y^N -virus worden aangetoond. Het infectievermogen was dan echter gering.

Door langzaam bevroren gaat zowel in blad als bladsap de infectiositeit sterk achteruit. Ook tijdens de bewaring bij -20°C kan een vermindering in besmettingsvermogen in besmet bladsap worden vastgesteld (Tabel 6). Na ongeveer een jaar bewaren bij -20°C is in het ruwe sap van besmette tabaksbladeren het Y^N -virus vrijwel niet meer aan te tonen. In drooggevroren besmet tabaksblad is de achteruitgang in infectievermogen geringer. De besmettelijkheid van drooggevroren sap is vrijwel altijd gering. Hoogstwaarschijnlijk kan dit eveneens worden geweten aan het langzame bevroren bij het gevolgde procédé. Het bevroren van het virusbevattend sap in de diepvrieskast gaat sneller dan in het droogvriesapparaat, zodat in dat geval nog altijd een redelijke infectiositeit kan worden gemeten. Het is echter onverklaarbaar, dat in het Y^N -virusbevattend blad, dat op dezelfde wijze wordt bevroren, na het ontdooien het virus vrijwel niet meer kan worden aangetoond.

3. DE *SOLANUM DEMISSUM* HYBRIDE 'A6' EN *SOLANUM DEMISSUM* 'Y' ALS TOETSPLANTEN VOOR HET Y^N-VIRUS

3.1. Inleiding en literatuur

Voor het aantonen van plantevirussen die met sap overgebracht kunnen worden, staan in het algemeen twee methoden ter beschikking, nl. de serologie en het gebruik van toetsplanten. Omdat de betrouwbaarheid van de serologische toetsmethode meestal voldoende is, is het begrijpelijk, dat deze veel wordt toegepast. Het gebruik van toetsplanten is reeds langer in de plantevirologie bekend. Immers, de symptomen van een virusziekte waren de eerste zichtbare tekenen van de aanwezigheid van een virus. Waren de symptomen van een virusziekte op een bepaalde waardplant constant en karakteristiek, dan kon met behulp van die waardplant het virus min of meer worden gekenmerkt. De waardplant was dan de toets- of indicatorplant voor dat virus.

Tabak, *Nicotiana tabacum*, is de meest gebruikte toetsplant in de plantevirologie. De aardappelvirussen A, X en Y kunnen o.m. door middel hiervan worden onderscheiden. Deze onderscheiding, die meestal berust op een verschil in mozaïeksymptomen, is niet altijd even gemakkelijk. Gewoonlijk komen deze symptomen voor op de bladeren boven het geïnoculeerde blad. Dit betekent, dat het geruime tijd duurt, voordat een diagnose gesteld kan worden. Er zijn echter ook toetsplanten, waarvan het weefsel van het geïnoculeerde blad zodanig reageert dat symptomen hierop waarneembaar worden. Deze reactie kan zich manifesteren als chlorotische of necrotische vlekken. De door KÖHLER (1953) geïntroduceerde toetsplant 'A6' (= *Solanum demissum* x *S. tuberosum* 'Aquila') en de door COCKERHAM (1958) gebruikte toetsplant *Solanum demissum* 'Y' (Sdy) behoren tot de groep toetsplanten, die na de inoculatie met Y-virusbevattend sap op het geïnoculeerde blad necrotische vlekken gaan vertonen.

De toetsplant 'A6' vormt geen bessen, zodat vermeerdering moet plaatshebben door knollen, stekken of stolonen. Een nadeel van deze wijze van vermeerdering is, dat bij ongewenste besmetting met virussen (bijv. X-virus), deze via de knollen op de volgende generatie overgaan. De vermeerdering van Sdy-toetsplanten geschiedt door zaad, omdat de knolvorming van weinig betekenis is. De Sdy-planten, die rijkelijk bloeien en veel bessen vormen, sterven vrij snel af. In de tijd van het afrijpen der bessen, direct na de bloei, vertonen de blaadjes bruin-zwarte vlekken. Hierdoor worden zij ongeschikt als toetsblad. De 'A6'-planten daarentegen, hebben de neiging steeds door te groeien. Nadat de plant een bloem heeft gevormd, lopen de hoogst geplaatste okselknoppen uit en vormen weer stengels, die op hun beurt weer bloemen produceren. Hierdoor worden verschillende „etages” in de 'A6'-plant gevormd.

Onder omstandigheden van korte dag (wintermaanden) groeien Sdy-planten zeer slecht. Een bijbelichting heeft ook weinig effect. Hieruit blijkt, dat het niet eenvoudig is Sdy-planten met bruikbaar toetsblad op te kweken. Zoals uit de volgende paragrafen zal blijken, is daarom een groot gedeelte der proeven uitgevoerd met 'A6'.

Omtrent het verschil in betrouwbaarheid tussen de serologische methode en het werken met toetsplanten kan het volgende worden opgemerkt. Voor X-virus levert het gebruik van toetsplanten de betrouwbaarste resultaten op (BEEMSTER, 1958). HOLLINGS & STONE (1962) rapporteerden dat, indien geschikte toetsplanten voorhanden zijn, het aantonen van virussen met behulp hiervan betrouwbaarder gaat dan met de serologische methode. Dit geldt ook voor het toetsen op de aanwezigheid van Y^N-virus (ROZENDAAL, mondelinge mededeling). Uit de aard der zaak is de routine, die bij toepassing van een bepaalde toetsmethode is verkregen een belangrijke factor voor de betrouwbaarheid van de desbetreffende methode.

In het algemeen wordt de vatbaarheid van een waardplant voor een virus beïnvloed door factoren, zoals leeftijd van de plant, licht en temperatuur. In het hierna volgende zal worden besproken in hoeverre dit het geval is met 'A6'- en Sdy-planten ten aanzien van het Y^N-virus. De proeven hadden ten doel de mogelijkheden na te gaan om 'A6'- en Sdy-planten te kweken met een grote vatbaarheid voor het Y^N-virus.

3.2. Algemene begrippen

Enige virologische begrippen, die algemeen worden gebruikt en die hier zullen worden gebezigd, worden hieronder nader verklaard. *Toetsplanten* zijn planten, die na inoculatie met een virusbevattend plantensap karakteristieke symptomen vertonen. Zoals reeds in 3.1. gezegd, kan er een onderscheid gemaakt worden tussen toetsplanten waarop na inoculatie systemische of lokale symptomen ontstaan. Een toetsplant is *vatbaar* voor een virus, indien het desbetreffende virus in de cellen der plant tot vermeerdering kan komen. Indien het virus, nadat het in de plantecel is gebracht, niet „aanslaat”, niet tot vermeerdering komt, spreekt men van *onvatbaarheid* der plant. In dit geval is de infectie niet tot stand gekomen. De vatbaarheid van een toetsblad is groter, naarmate meer virusdeeltjes er in slagen een infectie te veroorzaken.

De voor virus vatbare cellen kunnen in verschillende mate reageren op de infectie met het virus. Als ze sterk reageren hebben ze een grote *gevoeligheid* voor dat virus. Men spreekt van *overgevoeligheid*, indien de plantecel na de virusinfectie snel afsterft. Meestal blijft dit niet beperkt tot een cel, maar sterven groepen van bij elkaar liggende cellen af. Dit afsterven manifesteert zich meestal in het ontstaan van donkerbruine vlekjes. Als deze na inoculatie op het geïnoculeerde blad ontstaan wordt van lokale vlekken gesproken. Aangezien het aantal lokale vlekken op een toetsblad een maat is voor het aantal geslaagde infecties, betekent dit, dat het aantal lokale vlekken een maatstaf is voor de vatbaarheid van het toetsblad.

Gaat om een of andere reden het vermogen van het blad om na een virusinfectie lokale vlekken te vormen achteruit, dan kan dit betekenen, dat het blad minder gevoelig is geworden. Maar ook is het mogelijk dat de vatbaarheid is verminderd. Hieruit blijkt dat het niet eenvoudig is, bij lokale vlekken vormende toetsplanten die veranderingen in aantal vlekken laten zien, aan te geven of dit een gevolg van een verandering in vatbaarheid dan wel van gevoeligheid is.

De uitbreiding van de infectie in de plant blijft vaak achterwege als necrotische vlekjes op het geïnoculeerde blad zijn ontstaan. Dit is echter niet het geval bij 'A6'-planten. Na inoculatie met het Y-virus worden wel necrotische vlekjes gevormd, maar toch vindt nog verbreiding van het virus in de plant plaats. Men zou hier kunnen spreken van een zekere mate van overgevoeligheid of per definitie stellen, dat hier alleen sprake is van een grote mate van gevoeligheid. De grootte van de lokale vlekken is afhankelijk van verschillende factoren zoals leeftijd van het blad, licht en temperatuur. Ten aanzien van Sdy kan worden opgemerkt, dat Y^O- en Y^N-virus zich na het ontstaan van lokale vlekken op het geïnoculeerde blad niet door de planten uitbreiden. Het Y^C-virus is hiertoe wel in staat.

3.3. De vatbaarheid van 'A6' voor het Y^N-virus

3.3.1. Transport van het Y^N-virus in de 'A6'-plant

De toetsplanten 'A6' en Sdy vertonen beide 6 tot 14 dagen na inoculatie met het Y^N-virus necrotische vlekken op het geïnoculeerde blad. Daarna kan het virus, zoals in

3.2. werd medegedeeld, in 'A6' systemisch worden. Er worden dan voornamelijk in de topbladeren mozaïeksymptomen zichtbaar. Soms verschijnen ook necrotische vlekken. Ten einde omtrent de verplaatsing van Y^N-virus in 'A6'-planten ingelicht te worden, werden hierover enige proeven uitgevoerd, die gelijke resultaten opleverden. Een der proeven wordt hier weergegeven.

Vijf weken na het poten werden tien planten door sapinoculatie van een blad dichtbij de grond en tien planten door inoculatie van een topblad met Y^N-virus besmet; twee, vier, zes, acht en tien dagen na inoculatie werd van elke groep het gehele geïnoculeerde blad van twee planten verwijderd. Van elke groep werd steeds een blad uitgerst en het sap werd getoetst op aanwezigheid van virus door middel van 'A6'-blad. Het resultaat was, dat zes dagen na de inoculatie lokale vlekken op de laaggeplaatste geïnoculeerde bladeren ontstonden. Op dit tijdstip kon in het sap van deze bladeren echter geen virus worden aangetoond. Dit was pas acht dagen na de inoculatie het geval. In de topbladeren van enige planten kon reeds zes dagen na de inoculatie virus worden vastgesteld; bij de overige planten was dit acht dagen na de inoculatie het geval. Dit betekent dat in dit geval het virus tussen zes en acht dagen na de inoculatie uit het blad in de stengel was getreden. De hooggeplaatste geïnoculeerde bladeren vertoonden geen of zeer weinig lokale vlekken.

Verder bleek, dat het virustransport eerder uit de oude dan uit de jonge bladeren plaats had. Dit is te verklaren uit het feit, dat de jonge bladeren van deze toetsplanten een grotere overgevoeligheid voor het virus bezaten dan de oude bladeren.

De ervaring werd opgedaan, dat topbladeren van planten die zes tot acht dagen tevoren met Y^N-virus waren geïnoculeerd, spontaan necrotische vlekjes gingen vertonen, als zij werden afgeplukt en daarna onder de in 2.2. genoemde omstandigheden bewaard.

3.3.2. *De invloed van het plukken en doorsnijden van toetsblad op het verschijnen van de lokale vlekken*

In twee proefjes werd nagegaan welke invloed het plukken van het toetsblad had op de symptomvorming van het blad, indien het na de inoculatie met Y^N-virus onder geconditioneerde omstandigheden bewaard werd. Alle eindblaadjes (dus zowel oude als jonge) van 20 cm hoge 'A6'-planten werden met verdund Y^N-virusbevattend sap geïnoculeerd. Een gedeelte der blaadjes werd afgeplukt en bij continue belichting van 1800 Lux en een temperatuur van 24°C bewaard. Vijf dagen na de inoculatie werden de aantallen lokale vlekken op beide groepen blaadjes geteld. Het bleek, dat de lokale vlekken op de afgeplukte 'A6'-blaadjes sneller verschenen dan op het niet afgeplukte toetsblad. Het aantal lokale vlekken op de eerste groep blaadjes bedroeg bovendien het dubbele van dat op de tweede groep.

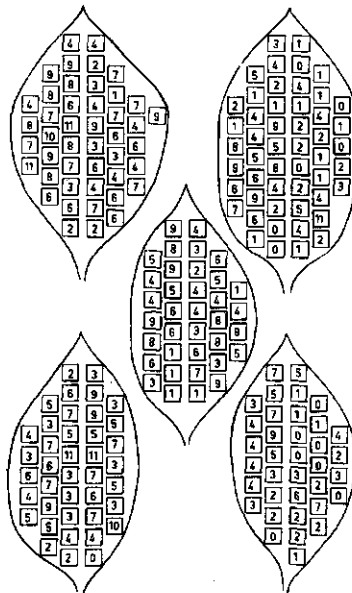
Volgens de onderzoeken van WILTSHIRE (1956) geldt dit fenomeen niet voor alle toetsplanten. De afgeplukte bladeren van boon (*Phaseolus vulgaris*) waren moeilijker met tabaksnecrosevirus te infecteren dan die, welke men aan de plant had gelaten. De blaadjes geplukt direct na de inoculatie en onder optimale omstandigheden bewaard vertoonden evenveel lesions als de blaadjes aan de plant.

Zoals later zal blijken is de variatie van de bladeren van 'A6' en Sdy voor wat betreft hun vatbaarheid voor het Y^N-virus zeer groot. Dit maakt het bepalen van kwantitatieve verschillen tussen virussuspensies onbetrouwbaar. Uitgaande van de gedachte, dat de variatie in één blad niet groot zal zijn (zie 3.3.3.), werd onderzocht of het verwonden, d.w.z. het in stukken snijden van het toetsblad, invloed had op de aantallen lokale vlekken.

Respectievelijk tien 'A6'-bladjes en tien Sdy-bladjes werden met Y^N-virus geïnoculeerd. Uit alle linker bladhelften werd met een kurkboor (ø 20 mm) een stukje geponst. De geïnoculeerde bladeren en de ponsstukjes werden onder geconditioneerde omstandigheden bewaard. Vijf dagen na de inoculatie werden de lokale vlekken geteld op de reeds uitgeponste stukjes en op gelijkwaardige ponsstukjes, die op dit tijdstip uit de rechter bladhelften werden gestoken. Het bleek, dat het verwonden (nl. het uitponsen) van het toetsblad geen aantoonbare invloed had op de aantallen lokale vlekken. Dit betekent, dat stukken toetsblad, uiteraard binnen bepaalde grenzen wat betreft de virusconcentratie in het inoculum, gebruikt kunnen worden om het effect van uitwendige omstandigheden op het toetsblad ten aanzien van Y^N-virusinfectie, kwantitatief te bepalen.

3.3.3. De verdeling van de lokale vlekken over het 'A6'-toetsblad

Uit het voorgaande bleek, dat het in stukken snijden van het geïnoculeerde toetsblad geen effect had op de aantallen lokale vlekken. Het was niet bekend, hoe het gesteld was met de vatbaarheid voor het Y^N-virus van de verschillende delen van het toetsblad. Om dit na te gaan werden tweemaal vijf volgroeide 'A6'-bladeren van ongeveer gelijke



Figuur 1.
Verdeling van de lokale vlekken over
het 'A6'-toetsblad.
*Distribution of local lesions over 'A6'
test leaves.*

leeftijd met Y^N-virus geïnoculeerd. Zes dagen na de inoculatie werd de telling der lokale vlekken op de volgende wijze uitgevoerd. In grafiekenpapier werden vierkantjes van 8 x 8 mm uitgesneden. De vierkantjes lagen zo dicht bij elkaar als mogelijk was om de samenhang in het grafiekenpapier te houden. Dit rooster werd op toetsbladeren gelegd; de aantallen lokale vlekken in elk vierkantje werden geteld. Op deze wijze was het mogelijk een indruk te krijgen van de verdeling van de lesies over het 'A6'-blad

(Fig. 1). De volgende vragen werden onderzocht *. 1. Komen aan de rand meer lesies voor dan in het midden van het 'A6'-blad? 2. Geldt de Poissonverdeling voor de lesies op het 'A6'-blad?

De conclusies waren: Er was geen systematisch optreden van hogere of lagere gemiddelde aantallen lokale vlekken aan de rand van het blad aantoonbaar. Voorts was er geen duidelijke afwijking van de Poissonverdeling. De veronderstelling, dat de lokale vlekken willekeurig over het toetsblad waren verdeeld, behoeft dus niet te worden verworpen.

3.4. De factoren, die het verschijnen van de lokale vlekken beïnvloeden

3.4.1. Materiaal en methoden

Het effect van een bepaalde factor, die het verschijnen van de lesies op het geïnoculeerde toetsblad beïnvloedt, werd uitgedrukt in het gemiddeld aantal lokale vlekken dat per oppervlakte eenheid toetsblad was verschenen. Dit effect werd vergeleken met de resultaten van een controle toetsing. Om het gemiddelde aantal lokale vlekken per oppervlakte eenheid blad te berekenen werd hiervoor aanvankelijk het totaal aantal vlekken per blad geteld. De oppervlakte van elk toetsblad werd bepaald door het produkt van lengte en breedte te vermenigvuldigen met 0,7. (De factor 0,7 was als volgt bepaald. Van een honderdtal volledig ontwikkelde 'A6'-blaadjes werd met behulp van een planimeter het oppervlak gemeten. Het produkt van lengte en breedte werd bepaald. Hierna werd nagegaan welk quotiënt, verkregen door delen van deze twee getallen, het frequentst voorkwam). Op deze wijze kon het gemiddelde aantal lokale vlekken per cm² worden berekend. Later werd deze werkwijze vervangen, gezien de regelmatige verdeling van het aantal lokale vlekken over het blad (zie 3.3.3.), door de methode, waarbij alleen de lokale vlekken werden geteld, die voorkwamen op twee ponsstukjes (ø 20 mm), afkomstig van de linker- en rechterhelft van het toetsblad. De gehele toetsblaadjes werden met de vinger met Y^N-virus geïnoculeerd, waarna uit het midden van elke bladhelft een stukje werd geponst. De geïnoculeerde blaadjes en ponsstukjes werden op de in 2.2. genoemde wijze bewaard. De tellingen der lokale vlekken werden steeds vijf dagen na de inoculatie verricht.

3.4.2. De invloed van de leeftijd van het toetsblad

In een aantal proeven werd onderzocht of op alle bladeren van een toetsplant na inoculatie met Y^N-virus in gelijke mate lokale vlekken verschenen. Hiertoe werd een groot aantal 'A6'- en Sdy-planten geïnoculeerd en onderzocht. Uit de resultaten der toetsingen bleek, dat op de hoogst en laagst aan de stengel geplaatste bladeren van oude planten het geringste aantal lokale vlekken ontstond. Bij jonge planten werd het geringste aantal lokale vlekken per bladoppervlak waargenomen op de hooggeplaatste bladeren. Dit bleek uit een proef, waarin tien planten, elk met ongeveer tien bladeren, werden geïnoculeerd met Y^N-virus. De gemiddelden der aantallen vlekken per bladoppervlakte eenheid, die na inoculatie op de boven-, midden- en ondergeplaatste bladeren verschenen, bedroegen respectievelijk 9, 22 en 24. Het verschil tussen de aantallen vlekken op boven- en middengeplaatste bladeren was statistisch significant.

Soms werden bladeren aangetroffen waarop na inoculatie weinig of geen lokale vlekken ontstonden. Bij de onderzochte planten was dit meestal het tiende of elfde blad. Uit enige waarnemingen is gebleken, dat dit bladeren onder een bloeiwijze waren.

* Statistische verwerking door de heer C. A. VAN DEN ANKER

Zoals reeds onder 3.1. is gezegd, groeien bij 'A6'-planten na de bloei de hoogst gelegen okselknoppen uit tot stengels, waarvan een de taak van de hoofdstengel overneemt. Uit een proef met tien 'A6'-planten (zeven weken na het poten), die reeds zijstengels hadden ontwikkeld, bleek dat het blad van de hoofdstengel minder vatbaar voor Y^N-virus was dan dat van de zijstengels. De gemiddelde waarden voor de vatbaarheid (uitgedrukt als het gemiddelde aantal lokale vlekken per 4 cm² 'A6'-blad) bedroegen voor het blad van de hoofdstengel, van de eerste en van de tweede zijstengel respectievelijk 20, 64,4 en 53,2.

De resultaten van een proefje, waarin de vatbaarheid voor het Y^N-virus van top- en jukblaadjes van tien 'A6'-bladeren werd onderzocht, zijn weergegeven in Tabel 7. Het bleek, dat de minste variatie in de bladhelften van een bladpaar werd waargenomen.

TABEL 7. De vatbaarheid van de blaadjes van een 'A6'-blad voor het Y^N-virus, uitgedrukt in aantal lokale vlekken per 2 cm².
Susceptibility to virus Y^N of 'A6' leaflets, expressed in number of local lesions per 2 cm².

Blad Leaf	Topblaadje Top leaflet		Eerste paar deelblaadjes First pair of leaflets				Tweede paar deelblaadjes Second pair of leaflets			
			blad 1 leaflet 1		blad 2 leaflet 2		blad 1 leaflet 1		blad 2 leaflet 2	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1	17	13	17	19	23	11	26	23	20	18
2	2	7	14	13	17	17	29	22	26	28
3	19	26	15	18	9	22	18	20	28	21
4	17	9	38	20	28	24	22	28	28	35
5	21	13	18	16	20	21	23	21	26	25
6	6	9	9	10	14	10	16	15	13	18
7	14	10	11	12	15	15	31	17	40	45
8	16	9	27	32	24	22	28	26	17	19
9	15	14	12	18	16	14	19	22	14	23
10	28	19	22	35	24	29	21	29	31	20
	155	129	183	193	190	185	233	223	253	252

L = linker bladhelft / left half-leaf.

R = rechter bladhelft / right half-leaf.

Uit het geheel der waarnemingen bleek, dat oud blad van oude 'A6'-planten het minst vatbaar is voor Y^N-virus. De gemiddelde diameter der lokale vlekken is echter groter op oud dan op jong 'A6'-blad. Evenals in de experimenten met Y-virus en *Physalis floridana* (ROSS, 1953) en de proeven met „brome-grass mosaic" virus en *Chenopodium hybridum* (CHIU & SILL, 1963), verschenen ook in onze proeven de lokale vlekken op oud toetsblad eerder dan op jonge bladeren.

De resultaten van de proeven met Sdy-planten (zes weken na het planten) waren gelijk aan die met de 'A6'-planten. In een proef werden zeven Sdy-planten, elk met tien bladeren, geïnoculeerd met Y^N-virus. De gemiddelde aantallen vlekken, die op de boven-, midden- en ondergeplaatste bladeren verschenen, waren respectievelijk 12, 34 en 30. Het verschil tussen de aantallen vlekken op de boven en midden aan de stengel geplaatste bladeren was statistisch significant.

Aangezien de jukblaadjes van het Sdy-blad zeer klein zijn, kon het verschil in vatbaarheid voor het Y^N-virus tussen top- en jukblaadjes niet worden bepaald.

3.4.3. De invloed van licht en temperatuur

In het algemeen kunnen uitwendige omstandigheden de plant zodanig beïnvloeden, dat de vatbaarheid voor pathogenen sterk verandert. Zo bleek de resistentie in enige spinazierassen tegen *Cucumis*-virus 1 verloren te gaan als de temperatuur boven 28°C kwam (POUND & CHEO, 1952). KASSANIS (1952) ging de invloed na van verschillende temperaturen bij verschillende plantesoorten, besmet met tabaksmozaïek- en tabaksnecrosevirus. Een korte inwerking van hoge temperatuur (36°C) voor de inoculatie verhoogde in alle gevallen de vatbaarheid der planten voor het virus. NIENHAUS (1957) vond, dat een kortstondige lage (4 en 10°C) en hoge temperatuur (36°C) in vergelijking met 21°C de vatbaarheid van *Physalis floridana* voor het aardappel-Y-virus verminderde.

Ook het licht kan de vatbaarheid der waardplanten voor virussen aanzienlijk beïnvloeden. Zo zijn bonen en tabak gedurende de wintermaanden vatbaarder voor tabaksnecrosevirus dan in andere jaargetijden (BAWDEN & PIRIE, 1945). Door beschaduwning of korte perioden van duisternis voor de inoculatie wordt de vatbaarheid van planten voor verschillende virussen verhoogd (BAWDEN & ROBERTS, 1947). MATTHEWS (1953) vond, dat een periode van duisternis voor de inoculatie van boneplanten met tabaksnecrosevirus het aantal lokale vlekken vermindert.

Afgezien van een proef, waarin de invloed van constante en wisselende temperatuur op de vatbaarheid van 'A6'-planten voor het Y^N-virus werd nagegaan, werd de factor temperatuur niet verder onderzocht. In deze proef kon geen invloed van de temperatuur vóór de inoculatie worden aangetoond.

De invloed van het licht op de vatbaarheid van 'A6'- en Sdy-planten voor het Y^N-virus werd door ons in een aantal proeven onderzocht. Begin juni 1962 ontvingen tien 'A6'- en tien Sdy-planten van 8.15 uur tot 17.30 uur daglicht („korte dag”). In dezelfde kas werden respectievelijk vijf 'A6'- en vijf Sdy-planten onder normale zomerse omstandigheden van licht („lange dag”) opgekweekt. De temperatuur werd constant op 21 tot 22°C gehouden. Op 27 juni, 5 en 11 juli werden van elke plant twee topblaadjes te halver hoogte van de stengel op vatbaarheid voor het Y^N-virus onderzocht.

TABEL 8. Invloed van de duur der belichting op het aantal vlekken per 4 cm² toetsblad na inoculatie met Y^N-virus.
Effect of duration of light on the number of lesions per 4 cm² of test leaf after inoculation with virus Y^N.

Datum Date	'A6'					Sdy				
	Lange dag Long-day		Korte dag Short-day		Verschil Difference	Lange dag Long-day		Korte dag Short-day		Verschil Difference
	x ⁻¹	z ⁻³	x ⁻²	z ⁻⁴		z ⁻⁵	x ⁻¹	z ⁻³	x ⁻²	
27-6	53	1,68	6	1,14	+ 0,54	30	1,59	32	1,64	— 0,05
5-7	28	1,55	12	1,26	+ 0,29	10	1,27	12	1,36	— 0,09
11-7	19	0,95	1	0,76	+ 0,19	18	1,18	17	1,25	— 0,07

¹ Gemiddelde van 10 blaadjes / Average of 10 leaflets.

² Gemiddelde van 20 blaadjes / Average of 20 leaflets.

³ Gemiddelde van 10 getransformeerde aantallen vlekjes.

Average of 10 transformed numbers of lesions.

⁴ Gemiddelde van 20 getransformeerde aantallen vlekjes.

Average of 20 transformed numbers of lesions.

⁵ Verschil tussen bladeren van lange en van korte dag zeer significant.

Difference between leaves of long and short-day highly significant.

⁶ Verschil tussen bladeren van korte en lange dag significant.

Difference between leaves of short and long-day significant.

Op dit tijdstip waren de planten die onder „korte dag” hadden verkeerd, geel van kleur en bloeiden niet. In Tabel 8 is het gemiddelde aantal lokale vlekken per oppervlakte eenheid blad (als maat voor de vatbaarheid voor het Y^N-virus) per object weergegeven. Verder zijn de gemiddelden van de getransformeerde aantallen lokale vlekken per oppervlakte eenheid blad vermeld. Voor de transformatie zie 2.2. pag. 21.

Hieruit blijkt, dat het blad van de ‘A6’-toetsplanten opgegroeid onder omstandigheden van „lange dag” meer lokale vlekken produceert dan dat van de planten uit de „korte dag”. Het Sdy-blad werd op deze wijze niet door het licht beïnvloed. De necrotische kringen, die na inoculatie op ‘A6’-blad van planten uit de „korte dag” ontstonden, hadden gemiddeld een grotere diameter dan die van de planten uit de „lange dag”.

Ten einde omtrent het effect van de lichtintensiteit op de vatbaarheid van ‘A6’-blad voor het Y^N-virus geïnformeerd te worden, werd van 40 ‘A6’-planten (20 uit stolonen en 20 uit knollen opgegroeid) de helft sterk beschaduwd door middel van kalken der ruiten en door het aanbrengen van dubbel kaasdoek aan de binnenkant van de kas, terwijl de andere helft onbeschaduwd bleef. Zes, acht en tien weken na het poten, respectievelijk stekken werd het blad van deze planten op vatbaarheid voor het Y^N-virus onderzocht. De beschaduwde planten waren gemiddeld 5 cm langer en lichter van kleur dan de onbeschaduwde. De lengte van de onbeschaduwde bladeren bedroeg echter gemiddeld 4 cm meer dan van de beschaduwde. In Tabel 9 zijn de resultaten van de toetsingen van de proef vermeld.

TABEL 9. Het effect van beschaduwen der toetsplant ‘A6’ op het aantal vlekken per 4 cm² toetsblad na inoculatie met Y^N-virus.

Effect of shading the ‘A6’ test plant on the number of lesions per 4 cm² of test leaf after inoculation with virus Y^N.

Aantal weken na poten <i>Number of weeks after planting</i>	Beschaduwd <i>Shaded</i>		Onbeschaduwd <i>Unshaded</i>		Verschil <i>Difference</i>
	x-1	z-2	x-1	z-2	
6	9	1,28	7	1,26	+ 0,02 ³
8	20	1,50	13	1,25	+ 0,25 ³
10	63	1,89	11	1,25	+ 0,64 ⁴

¹ Gemiddelde van 40 blaadjes / *Average of 40 leaflets.*

² Gemiddelde van 40 getransformeerde aantallen vlekjes.
Average of 40 transformed numbers of lesions.

³ Verschil niet significant / *Difference not significant.*

⁴ Verschil zeer significant / *Difference highly significant.*

Hieruit kan geconcludeerd worden, dat ‘A6’-blad afkomstig van beschaduwde planten meer lesies vormt dan dat van onbeschaduwde. Hierbij moet echter opgemerkt worden, dat deze verschillen afhankelijk geacht moeten worden van de grootte der verschillen in lichtintensiteit. In een eerder uitgevoerde proef kon nl. het bovengenoemde verschil niet worden aangetoond. De verschillen in lichtintensiteit waren in dat geval geringer.

Zoals uit de gegevens van Tabel 8 al enigszins afgeleid kan worden, ligt het voor de hand te veronderstellen, dat het aantal lesies dat na inoculatie op het toetsblad verschijnt, in de wintermaanden geringer zal zijn dan in de zomer en dat dit door bijlichting in gunstige zin beïnvloed kan worden. Aangezien het ten tijde van het uitvoeren van deze proef nog niet mogelijk was een standaard Y^N-virussuspensie te bereiden, die gedurende b.v. een jaar dezelfde infectiositeit behield, kon het blad van toetsplanten in hetzelfde stadium van ontwikkeling in de verschillende jaargetijden niet vergelijken-

derwijs worden getoetst. Het blad van toetsplanten, die onder verschillende belichtingen waren opgegroeid, kon slechts op een tijdstip ten aanzien van de vatbaarheid voor het Y^N-virus met elkaar worden vergeleken.

In december 1961 - januari 1962 en september - oktober 1962 werden in een proef 'A6'- en Sdy-planten dagelijks van 6.00 tot 18.00 uur op verschillende wijze bijbelicht. Als lichtbronnen fungeerden in de eerste proef respectievelijk HPL- (400 watt Philips, type G 97) en TL-lampen (40 watt Philips, kleur 33). De HPL-lampen waren 100 cm boven, de twee TL-lampen, 20 cm van elkaar, 55 cm boven de planten bevestigd. Bij de tweede proef kwam de TL-belichting te vervallen. Planten die alleen daglicht ontvingen, dienden als controle. Respectievelijk vijf, zeven en acht weken na het planten werd het blad der 'A6'-planten getoetst. De Sdy-planten groeiden zo slecht, dat er onvoldoende blad werd gevormd om te onderzoeken.

Onder invloed van de HPL-bijbelichting werden door de 'A6'-planten donkergroene bladeren en bloeiwijzen gevormd, in tegenstelling tot de planten, die alleen daglicht ontvingen. Deze planten produceerden lichtgroen blad en er werden vrijwel geen bloeiwijzen gevormd. De planten die TL-licht ontvingen, vormden ook geen bloeiwijzen, maar zij hadden normaal groen blad.

Uit de resultaten van de eerste proef bleek, dat er tussen de bladeren van de planten der verschillende objecten vrijwel geen verschil in vatbaarheid voor het Y^N-virus bestond. De tweede proef, waarvan een deel der planten opgroeide en getoetst werd onder omstandigheden van „korte dag” in oktober, verschaftte aanvankelijk resultaten zoals genoemd in Tabel 8. Het blad van planten, die naast daglicht een aanvullende HPL-belichting kregen, vertoonde na inoculatie, die vijf weken na het planten werd uitgevoerd, 32 lesies per 4 cm² blad tegen 22 lesies per 4 cm² blad van planten, die geen bijbelichting hadden ontvangen. Op latere tijdstippen waren de verschillen in vatbaarheid voor Y^N-virus van geen betekenis meer. Zowel de blaadjes der planten, die alleen daglicht, als die welke daglicht en HPL-bijbelichting hadden gekregen, vertoonden na inoculatie met virusbevattend sap slechts weinig lesies. De gemiddelde diameter der lesies (1,2 mm) op het blad van de planten die alleen daglicht ontvingen, was echter zeer significant groter dan de gemiddelde diameter der lesies (0,9 mm) op de andere toetsblaadjes. In analogie met de resultaten der metingen van de lesies van oude en jonge toetsbladeren van dezelfde 'A6'-plant, wijst dit er op, dat de planten zonder bijbelichting fysiologisch ouder waren dan de planten met bijbelichting. Er kan geconcludeerd worden, dat het blad van 'A6'-planten, die onder winteromstandigheden (korte dag en geringe lichtintensiteit) zijn opgegroeid, de tendens vertoonde minder lesies te produceren na inoculatie met virusbevattend sap dan het blad van bijbelichte planten. Uit de proeven bleek, dat een bijbelichting in de wintermaanden altijd te gering was om een goede vegetatieve groei te stimuleren.

Het effect van een bijbelichting zal dus miniem zijn, als gedurende die tijd veel perioden met zonschijn voorkomen. Verder kan uit het voorgaande worden geconcludeerd, dat Sdy-planten wat betreft hun groei gevoeliger zijn voor verschillen in lichtintensiteit dan voor verschillen in daglengte. Voor 'A6'-planten is dit niet zo duidelijk.

3.4.4. De invloed van bemesting

De invloed van bemesting op de vatbaarheid voor virussen is voor verschillende waardplanten onderzocht. In 1950 vonden BAWDEN & KASSANIS, dat op *Nicotiana glutinosa* het aantal lokale vlekken toenam na inoculatie met respectievelijk „tomato aucuba mosaic”- en tabaksmozaïekvirus, als de tabaksplanten een overmaat aan stikstof en fosfaat kregen toegediend. In het algemeen ging een optimale groei samen

met een optimale vatbaarheid. ALLINGTON & LAIRD (1954) deelden mee, dat een laag kaliumgehalte in de plantvoeding tot gevolg had, dat na de inoculatie van tabak met tabaksmozaïekvirus een groot aantal lokale vlekken ontstonden. In proeven met bonen var. 'Pinto' vond PANZER (1957), dat na inoculatie met tabaksmozaïekvirus weinig lokale vlekken op het geïnoculeerde blad ontstonden, als de planten voedingsoplossingen hadden gehad, waarin een tekort aan stikstof, fosfaat of kali bestond.

Om de invloed van de bemesting op de vatbaarheid van 'A6'- en Sdy-planten voor het Y^N-virus na te gaan, werden in 1962 en 1963 proeven met Sdy- en 'A6'-planten gedaan, waarvan de in 1963 uitgevoerde hierna zal worden beschreven.

De 'A6'-knollen en Sdy-planten werden gepoot in grote potten (ø 24 cm), die 4,2 kg tuinaarde bevatten. De invloed van een meststof werd onderzocht door deze in een bepaalde hoeveelheid aan een aantal planten toe te dienen. De toegediende hoeveelheden meststof per plant waren respectievelijk 5 g kalkammonsalpeter (N), 5 g superfosfaat (P), 5 g patentkali (K) en 5 g ASF-korrels 12-10-20 (NPK). Een aantal onbemeste planten (O) fungeerde als controle. Elk object bevatte zeven 'A6'- of vijf Sdy-planten. Alle planten werden dagelijks begoten. De potten met planten waren in het tablet (zonder turfmo) in een kas geplaatst. De bovengenoemde hoeveelheden meststof werden vier en zes weken na het potten toegediend. Acht weken na het potten werden de planten bij de grond afgesneden en op vatbaarheid voor het Y^N-virus onderzocht. Alle topblaadjes werden geïnoculeerd en bewaard op de wijze, beschreven onder 3.4.1.

De invloed van de bemesting op de vatbaarheid van Sdy-planten voor het Y^N-virus bleek niettegenstaande de extreme bemesting vrij gering; ter illustratie zijn in Tabel 10 de resultaten van de proef met Sdy-blad samengevat. Het blad van planten, die zowel stikstof, fosfaat als kali hadden ontvangen, was vatbaarder dan het blad van planten, die geen of een ander bemesting hadden gekregen (statistisch significant). Op het blad van de hoofdstengel verschenen minder vlekjes dan op dat van de zijstengels.

Uit de resultaten van de proef met 'A6'-planten uitgevoerd in 1962 was reeds gebleken, dat negen weken na het potten (dus een week na het bemesten) de vatbaarheid

TABEL 10. De invloed van bemesting van Sdy-planten op het aantal vlekken op 4 cm² toetsblad na inoculatie met Y^N-virus.

Effect of fertilizer on Sdy plants on the number of lesions on 4 cm² of test leaf after inoculation with virus Y^N.

Meststof Fertilizer	Blad van hoofdstengel Leaves of main stem		Blad van zijstengel 1 Leaves of axillary stem 1		Blad van zijstengel 2 Leaves of axillary stem 2		Gemiddelde Average
	x ⁻¹	z ⁻²	x ⁻¹	z ⁻²	x ⁻¹	z ⁻²	
O	6,9	1,13	10,0	1,42	16,7	1,34	1,30
NPK	15,1	1,25	29,0	1,52	19,6	1,41	1,39
N	9,1	1,17	16,6	1,36	18,5	1,39	1,31
P	12,7	1,08	19,2	1,39	20,1	1,32	1,26
K	13,0	1,18	26,9	1,48	17,2	1,35	1,34

Gemiddelde z⁻⁴
Average z⁻⁴

1,16

1,43

1,36

- ¹ Gemiddelde van 40 blaadjes / Average of 40 leaflets.
- ² Gemiddelde van 40 getransformeerde aantallen vlekjes.
Average of 40 transformed numbers of lesions.
- ³ Verschil tussen NPK en O, P en N significant.
Difference between NPK and O, P and N significant.
- ⁴ Verschil tussen hoofd- en zijstengels significant.
Difference between main- and axillary stems significant.

van het blad (uitgedrukt in gemiddeld aantal lesies per 4 cm² toetsblad) uit het stikstof object aanzienlijk lager was dan van het blad uit andere objecten. Dit kwam vooral tot uitdrukking in de resultaten der toetsingen van het blad van de zijstengels. In dit geval werd verschillende malen bij de planten uit het stikstof object geen enkele lesie per 4 cm² blad waargenomen. Bij het blad uit de andere objecten was dit juist omgekeerd. Het blad van de zijstengels was vatbaarder (statistisch significant) dan dat van de hoofdstengel (zie ook 3.4.2). Drie en vier weken na de bemesting was het blad uit het stikstof object het vatbaarst. De planten uit de andere objecten hadden op dat moment reeds vergelend blad.

De resultaten van de proeven van 1963 wijzen eveneens in de richting, dat door bemesting de fysiologische toestand der plant wordt beïnvloed, waardoor een bepaald effect ontstaat op de vatbaarheid voor het Y^N-virus. In Tabel 11 zijn de resultaten van de in 1963 uitgevoerde proef met 'A6' weergegeven.

TABEL 11. De invloed van bemesting van 'A6'-planten op het aantal vlekken op 4 cm² toetsblad na inoculatie met Y^N-virus.
Effect of fertilizer on 'A6' plants on number of lesions on 4 cm² of test leaf after inoculation with virus Y^N.

Meststof Fertilizer	Blad van hoofdstengel Leaves of main stem		Blad van zijstengel 1 Leaves of axillary stem 1		Blad van zijstengel 2 Leaves of axillary stem 2		Gemiddelde Average	Blad van zijstengel 3 Leaves of axil- lary stem 3
	x ⁻¹	z ⁻²	x ⁻¹	z ⁻²	x ⁻¹	z ⁻²	z ⁻³	x ⁻¹
O	13,8	1,17	16,6	1,35	21,2	1,35	1,29	— ⁴
NPK	25,3	1,59	49,8	1,68	46,6	1,69	1,65	58,8
N	31,5	1,47	43,2	1,67	42,3	1,71	1,62	77,9
P	23,0	1,40	21,6	1,37	22,3	1,38	1,38	— ⁴
K	19,4	1,26	23,3	1,40	24,9	1,32	1,33	— ⁴
Gemiddelde z ⁻⁵ Average z ⁻⁵		1,38		1,49		1,49		

¹ Gemiddelde van 50 blaadjes / Average of 50 leaflets.

² Gemiddelde van 50 getransformeerde aantallen vlekjes.
Average of 50 transformed numbers of lesions.

³ NPK en N significant groter dan O, P en K. Geen significante verschillen tussen NPK en N en tussen O, P en K.

Difference between (NPK, N) and (O, P, K) significant.

Differences between NPK and N, and between O, P and K not significant.

⁴ Geen zijstengels gevormd / No axillary stems formed.

⁵ Verschil tussen hoofd- en zijstengels significant.

Differences between main and axillary stems significant.

Uit Tabel 11 blijkt, dat er twee weken na de mestgift vrijwel geen verschil in vatbaarheid voor het Y^N-virus bestond tussen het blad uit het met stikstof- en blad uit het met stikstof, kali en fosfaat bemeste object. Het blad uit deze twee objecten was vatbaarder dan dat uit de andere objecten. Dit is in overeenstemming met de algemene gedachtegang, dat jonge snelgroeiende planten vatbaarder voor virusinfectie zijn dan oude planten, die reeds in het afrijpingsstadium verkeren. De onbemeste en de met kali en fosfaat bemeste planten waren fysiologisch oud en dus minder vatbaar. Verder is uit het voorgaande (3.3.1.) reeds duidelijk geworden, dat op zeer jong 'A6'-blad na inoculatie met Y^N-virus slechts een gering aantal lokale vlekken verscheen, doordat het blad tijdelijk zeer weinig vatbaar of extreem overgevoelig is. Het is daarom aanmerkelijk, dat door een stikstofbemesting het blad van een 'A6'-plant, in het bijzonder jong blad (blad van zijstengels), tijdelijk minder vatbaar tot vrijwel onvatbaar voor Y^N-virus kan worden. Door het bufferend vermogen van de grond en door de uitspoeling

door het gieten zal het hoge gehalte aan stikstof in de potgrond achteruit gaan. Hierdoor zou de plant normaal vatbaar/gevoelig worden. De met stikstof bemeste 'A6'-planten komen hierna in een vatbare fase van hun ontwikkeling. Een stikstofbemesting heeft dus alleen een vertragende werking in de afrijping der 'A6'-planten. Dit effect is ook af te lezen uit Tabel 11. Alleen de planten die stikstof of een volledige bemesting hebben gekregen, hebben nl. nog een derde zijstengel ontwikkeld.

Als algemene conclusie kan gesteld worden, dat een volledige bemesting de voorkeur verdient boven een eenzijdige.

3.5. Nabespreking

De wijze, waarop lokale vlekken na een virusinfectie op het geïnoculeerde blad van hypersensitieve toetsplanten ontstaan, is niet duidelijk. SOLYMOSY *et al.* (1959), die werkten met *Nicotiana glutinosa* en tabaksmozaïekvirus, veronderstelden, dat onder invloed van de virusinfectie in de besmette cellen een verhoging van het gehalte aan giftige chinonen plaats had, waardoor het weefsel als het ware zichzelf doodde en het virus aldus verhinderde zich te verplaatsen. Hiermede zou dan de overgevoeligheidsreactie verklaard zijn.

Uit hier niet nader besproken proeven is gebleken, dat de overgevoeligheidsreactie niet altijd optreedt bij met Y^N -virus geïnoculeerde 'A6'-planten. Indien de geïnoculeerde planten bij temperaturen beneden 18°C worden bewaard, verschijnen vrijwel geen lokale vlekken. Het blad wordt dan echter wel met virus geïnfecteerd. Worden de planten bewaard bij een temperatuur tussen 20 en 30°C dan ontstaan wel necrotische vlekken op dit blad. Het aantal der lokale vlekken, dat dan verschijnt, wordt o.a. bepaald door de leeftijd van het toetsblad.

Hoewel in dit geval lokale vlekken op het geïnoculeerde blad ontstaan, vindt nog virustransport uit dit blad naar de stengel plaats (3.3.1). Dit kan zijn oorzaak vinden in het feit, dat er „ontsnapping” van het virus uit de necrotische kring plaats heeft of dat er naast overgevoelige voor Y^N -virus vatbare ook cellen op het 'A6'-blad voorkomen, die niet overgevoelig zijn. Er zijn enige argumenten, die de laatste veronderstelling minder aannemelijk maken. Na inoculatie met Y^N -virus verschijnen nl. regelmatig over het afgeplukte blad verspreid, een maximaal aantal duidelijke lokale kringen. Dit sluit het voorkomen van speciale plaatsen op het toetsblad, waar alleen voor Y^N -virus vatbare, niet overgevoelige cellen voorkomen, uit. Verder is gebleken, dat uit jong 'A6'-blad, waarop na de inoculatie zeer kleine lesies verschijnen, geen virus-transport plaats heeft. Dit betekent, dat op dit blad alleen voor het Y^N -virus vatbare, tevens overgevoelige cellen voorkomen. Het waarschijnlijkst is, dat voor oudere 'A6'-bladeren hetzelfde geldt, als deze na inoculatie worden bewaard bij temperaturen tussen 20 en 30°C .

De voor de hand liggende verklaring is daarom, dat het Y^N -virus ontsnapt is, voordat de necrose zichtbaar is geworden. Het duurt nl. minstens zes dagen voordat zich necrotische lesies op het geïnoculeerde blad aan de plant voordoen. Binnen deze tijd kan het virus zich reeds vermeerderd en verplaatst hebben.

Aangaande de in 3.3.1. vermelde waarneming dat op systemisch geïnfecteerde 'A6'-bladeren na afplukken en geconditioneerde bewaring spontaan necrotische vlekjes ontstaan, kan worden opgemerkt, dat deze reactie vermoedelijk in de hand wordt gewerkt door het verwijderen van de plant. Het is namelijk in overeenstemming met het feit, dat op afgeplukte bladeren na inoculatie met Y^N -virus eerder lokale vlekken tevoorschijn komen, dan wanneer men de bladeren aan de plant laat. Dit is voor de praktische toepassing van de bladtoets een belangrijk verschijnsel.

4. DE BLADTOETS

4.1. Inleiding en literatuur

Onder een bladtoets wordt hier verstaan een methode, waarbij afgeplukte blaadjes van een toetsplant na inoculatie met een ziekteverwekker, onder geconditioneerde omstandigheden bewaard, lokale vlekken vormen. De bladtoets is een vereenvoudigde vorm van de toepassing van toetsplanten.

Zoals uit het volgende zal blijken en ook reeds uit de literatuur bekend is (KÖHLER, 1953), kunnen vele van de aardappelvirussen met een bladtoets worden aangetoond. Hierbij wordt in hoofdzaak gebruik gemaakt van 'A6'. Het toepassen van een bladtoets is echter niet alleen beperkt tot het aantonen van aardappelvirussen. Zo is het gebruik van afgeplukte *Nicotiana glutinosa*-blaadjes bij onderzoek van tabaksmozaïekvirus sedert lang bij iedere planteviroloog bekend. Door QUANTZ (1957) is een methode beschreven om met behulp van afgesneden bladeren van een voor *Phaseolus*-virus 1 overgevoelig boneras dit virus aan te tonen. BAUMANN (1961) vermeldt, dat voor het aantonen van bepaalde virussen uit vruchtbomen van afgesneden cotylen van augurk gebruik kan worden gemaakt.

Het principe van de 'A6'- en Sdy-bladtoets is reeds genoemd door KÖHLER (1953). In het hier beschreven onderzoek is in het bijzonder gelet op de invloed van licht en temperatuur op de necrose-reactie, die zich na inoculatie van 'A6'- en Sdy-bladeren met Y-virus voordoet.

4.2. Materiaal en methoden

In de volgende te beschrijven proeven werden afgeplukte, geïnoculeerde toetsblaadjes onder constante licht- en temperaturomstandigheden bewaard. Inoculum werd verkregen door het uitpersen van besmet blad van 'White Burley'-tabak met een handpers of met mortier en stamper.

Als toetsblad werden volledig ontwikkelde top- en jukblaadjes van krachtig groeiende 'A6'- en Sdy-planten gebruikt. In gevallen, waar het ging om kwantitatieve bepalingen van de virusactiviteit werd de bladhelften-methode of het gebruik van bladstukken van gelijke oppervlakte toegepast. Voor de belichting van het geïnoculeerde toetsblad werden Philips TL-fluorescentielampen, 40 watt, kleur 33 gebruikt. De lichtintensiteit werd gemeten met een foto-elektrische cel, gekoppeld aan een milli-ampèremeter. Met een omrekeningsfactor kon de lichtintensiteit in Lux worden uitgedrukt. Door het grote aantal TL-fluorescentielampen, dat voor de belichting van het geïnoculeerde toetsblad noodzakelijk was, had de temperatuur in de bewaar ruimte de neiging op te lopen, soms tot ver boven 30°C. Daarom werd door middel van een thermostaat de temperatuur aldus gereguleerd, dat wanneer deze te hoog opliep er koude buitenlucht door een ventilator naar binnen werd gebracht en langs de TL-lampen geleid.

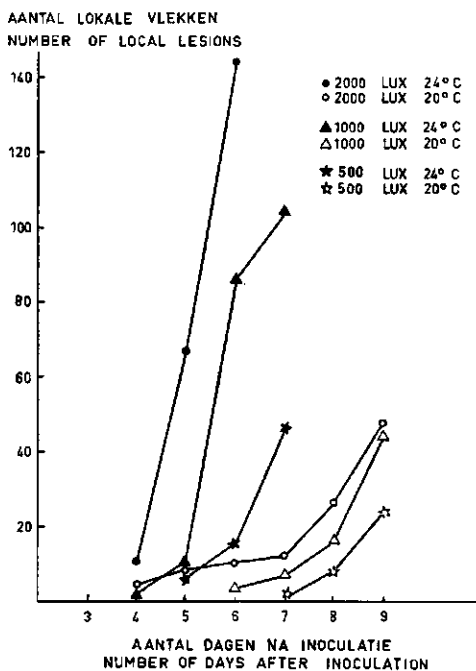
4.3. De invloed van licht en temperatuur op het verschijnen van lokale vlekken na inoculatie met Y^N- en Y^O-virus

Het is bekend, dat temperatuur, lichtintensiteit en duur van de belichting het verschijnen van de door virus teweeggebrachte symptomen op het geïnoculeerde toetsblad zeer sterk kunnen beïnvloeden. ROSS (1953) vermeldt, dat op de met Y-virus geïnoculeerde bladeren van *Physalis floridana* een groot aantal lokale vlekken verschenen, als de planten werden geplaatst in een ruimte waar een temperatuur heerste van 65 tot

75°F. Was de temperatuur hoger dan 80°F dan verschenen geen symptomen. CHIU & SILL (1963) vonden, dat het maximum aantal lokale vlekken na inoculatie van *Datura stramonium* met „brome-grass mosaic” virus werd verkregen, als de geïnoculeerde planten bij een temperatuur van 18 tot 20°C werden geplaatst.

4.3.1. De invloed van licht op 'A6'-blad

In een proef werden respectievelijk driemaal tien 'A6'-blaadjes van gelijke grootte met Y^N-virus geïnoculeerd. De drie groepen van tien blaadjes werden respectievelijk bij lichtintensiteiten van 500, 1000 en 2000 Lux en een constante temperatuur van 24°C bewaard. Tegelijkertijd werd een overeenkomstige proef uitgevoerd bij een constante temperatuur van 20°C. In beide proeven werden op de 'A6'-blaadjes, die bij 2000



Figuur 2.

De invloed van lichtintensiteit op het verschijnen van lokale vlekken op 'A6'-blad na inoculatie met Y^N-virus bij 20 en 24°C.

Effect of light intensity on appearance of local lesions on 'A6' leaves after inoculation with virus Y^N at 20 and 24°C.

Lux waren bewaard, de hoogste aantallen lokale vlekken waargenomen. De aantallen lokale vlekken, die op de 'A6'-blaadjes bij 20°C waren verschenen, waren echter kleiner dan die, welke op de 'A6'-blaadjes bij 24°C waren ontstaan. De resultaten waren in overeenstemming met die van proeven, waarbij lichtintensiteiten van 1000 en 1500 Lux werden gebruikt.

Het lag voor de hand na te gaan of ook lichtintensiteiten hoger dan 2000 Lux een gunstig effect hadden op het verschijnen van de vlekjes. Het was reeds gebleken, dat bij een lichtintensiteit van 8000 Lux de temperatuur met behulp van de beschikbare apparatuur niet constant kon worden gehouden en in de bewaarruimte opliep tot boven

30°C. Onder deze omstandigheden ontstonden geen vlekjes. De hoogste lichtintensiteit was daarom in deze proeven 4000 Lux. Met Y^N-virus werden 25 'A6'-blaadjes geïnoculeerd. Uit elk blaadje werden drie stukjes met een kurkboor (ø 23 mm) gepunst. De uit een blad afkomstige ponsstukjes werden ieder bij een bepaalde lichtintensiteit bewaard. De beproefde lichtintensiteiten, waarbij de bladstukjes werden bewaard, waren nu 1000, 2000 en 4000 Lux. De temperatuur in de bewaarruimte was 24°C. Vier en vijf dagen na de inoculatie werden de lokale vlekken geteld en hun diameters gemeten. Het bleek, dat bij een lichtintensiteit van 4000 Lux zeer weinig vlekken verschenen; deze intensiteit moet dus als ongunstig worden beschouwd. Vier dagen na de inoculatie hadden de lokale vlekken in alle objecten dezelfde diameter, nl. 1,2 mm. Vijf dagen na de inoculatie was deze 1,3 mm.

Uit deze proeven blijkt, dat een lichtintensiteit van 2000 Lux optimaal kan worden beschouwd voor de bewaring van met Y^N-virus geïnoculeerde 'A6'-blaadjes.

In Fig. 2 zijn de resultaten vermeld van de proef, waarbij lichtintensiteiten van 500, 1000 en 2000 Lux en bewaartemperaturen van 20 en 24°C werden onderzocht. De weergegeven waarden zijn uitgedrukt in gemiddeld aantal lokale vlekken pcr toetsblad.

Uit Fig. 2 kan worden geconcludeerd dat voor het verschijnen der lokale vlekjes op 'A6'-blad de temperatuur, waarbij de geïnoculeerde blaadjes worden bewaard, belangrijker is dan de lichtintensiteit. Zoals uit het volgende nog nader zal blijken, is weliswaar een minimale hoeveelheid licht noodzakelijk, maar een optimale temperatuur (circa 24°C) gecombineerd met een lage lichtintensiteit (500 Lux) leidt tot een gunstiger resultaat dan een optimale lichtintensiteit (ongeveer 2000 Lux) en een lage bewaartemperatuur (20°C).

In een aantal proeven werd onderzocht hoe de vlekjes op geïnoculeerd 'A6'-blad zich ontwikkelden als de blaadjes in plaats van continu slechts een gedeelte van de dag werden belicht. De drie objecten waren nu: 1. Continue belichting, 1875 Lux, temperatuur 24°C; 2. Belichting gedurende 16 uur, 1875 Lux, temperatuur minimaal 24°C; 3. Belichting gedurende 8 uur, 1875 Lux, temperatuur minimaal 24°C.

TABEL 12. De invloed van de dagelijkse belichtingsduur (1875 Lux) op het aantal vlekken, dat na inoculatie met Y^N-virus op 'A6'-toetsblad ontstaat.

Effect of daily duration of illumination (1875 Lux) on the number of lesions on 'A6' test leaves after inoculation with virus Y^N.

Aantal dagen na inoculatie <i>Number of days after inoculation</i>	Belichtingsduur (uren / dag) <i>Duration of illumination (hrs / day)</i>					
	24		16		8	
	x ⁻¹	z ⁻²	x ⁻¹	z ⁻²	x ⁻¹	z ⁻²
4	7(80%) ¹	1,03	6(80%)	0,97	0(0%)	0,77
5	18(100%)	1,22	17(100%)	1,21	3(50%)	0,87
6	20(100%)	1,25	23(100%)	1,29	8(80%)	1,04
Gemiddelde van z ⁻² <i>Average of z⁻²</i>		1,16		1,16		0,89

¹ Gemiddelde van 20 blaadjes (ø 20 mm) / *Average of 20 leaflets (ø 20 mm).*

² Gemiddelde van 20 getransformeerde aantallen vlekjes.

Average of 20 transformed numbers of lesions.

³ Verschil 1,16 - 0,89 zeer significant.

Difference 1,16 - 0,89 highly significant.

⁴ Tussen haakjes: Percentage toetsbladjes met lokale vlekken.

In parentheses: percentage of test leaves showing lesions.

In de objecten 2 en 3 liep de temperatuur tijdens de belichting op tot ongeveer 30°C, wegens onvoldoende koeling. Een minimum temperatuur van 24°C kon tijdens perioden van duisternis met een verwarmingselement met thermostaat nauwkeurig worden gehandhaafd. De resultaten van de proef zijn in Tabel 12 samengevat.

Uit deze tabel blijkt, dat bij het bewaren van geïnoculeerd 'A6'-blad bij een lichtintensiteit van 1875 Lux gedurende 24 of 16 uur per dag er enig verschil is in de aantallen lokale vlekjes, die onder deze omstandigheden ontstaan. Een belichtingstijd van acht uur per dag geeft echter een significant verschil in ongunstige zin, waarbij tevens een veel langzamer te voorschijn komen der vlekjes opvalt.

In enige proeven is verder nagegaan hoe bij een vermindering van de lichtintensiteit tot 1000 Lux en belichtingstijden van 24, 16 en 8 uur per dag de vlekjes zich op geïnoculeerde 'A6'-blaadjes ontwikkelden. In deze proeven werd bij een andere lichtintensiteit dezelfde werkwijze als in de voorgaande proeven gehandhaafd. Een belichting van 1000 Lux gedurende acht uur per dag gaf zeer slechte resultaten. Veel 'A6'-blaadjes vergeelden reeds voordat lokale vlekken verschenen. Alleen bij een continue belichting werden vijf dagen na de inoculatie op alle toetsblaadjes vlekjes waargenomen.

Het bleek, dat bij een verkorting van de belichtingstijd tot 16 uur per dag met een intensiteit van 1000 Lux er op de geïnoculeerde 'A6'-blaadjes weinig vlekjes verschenen. Uit deze gegevens kan worden geconcludeerd, dat er voor het ontstaan van lokale vlekken op geïnoculeerd 'A6'-blad een belichting van 1000 tot 2000 Lux gedurende 16 uur per dag vereist is.

Als geïnoculeerde 'A6'-blaadjes tijdens de incubatietijd bij 2000 Lux worden bewaard, kan zonder bezwaar de belichting gedurende tenminste acht uur daags worden uitgeschakeld. Dit kan vooral tijdens zeer warme dagen, wanneer men op buitenlucht-koeling is aangewezen, een voordeel zijn. Als de geïnoculeerde 'A6'-blaadjes tijdens de incubatietijd bij een lichtintensiteit van 1000 Lux of lager worden bewaard kan de belichting waarschijnlijk slechts enkele uren per dag worden uitgeschakeld. Langer uitschakelen van de belichting zal tot een langere incubatietijd leiden.

Uit proeven met het Y^O-virus, waarbij dezelfde behandelingen werden toegepast, kon worden geconcludeerd, dat bij een lichtintensiteit van 2000 Lux meer lesies op de toetsblaadjes verschenen, dan bij een intensiteit van 500 Lux. De verschillen waren echter niet groot. De belichtingsduur bleek weinig effect te hebben.

4.3.2. *De invloed van de temperatuur op 'A6'-blad*

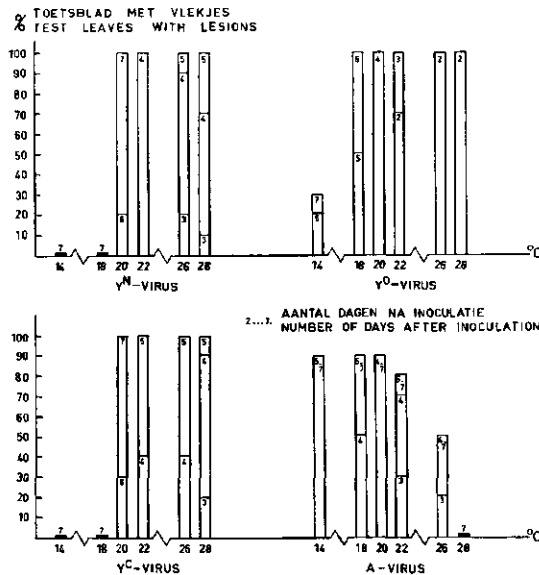
In een aantal proeven werd de invloed van de temperatuur op het aantal vlekjes op met Y^N-virus geïnoculeerd 'A6'-blad nagegaan. Daartoe werden zes groepen van tien 'A6'-blaadjes met Y^N-virus ingewreven. De blaadjes waren van ongeveer gelijke grootte en leeftijd. De zes groepen werden respectievelijk bij 14, 18, 20, 22, 26 en 28°C bewaard, terwijl de lichtintensiteit steeds 1250 Lux bedroeg. Van de tweede tot en met de zevende dag na de inoculatie werden dagelijks de op de 'A6'-blaadjes voorkomende lokale vlekken geteld. Op de 'A6'-blaadjes, die bij temperaturen lager dan 20°C waren bewaard, verschenen binnen de bovengenoemde termijn geen vlekjes. Bij temperaturen tussen 22 en 26°C, verschenen de vlekjes echter reeds vier dagen na de inoculatie. De resultaten van de proef zijn weergegeven in Fig. 3, waarin tevens de met andere virus-
sen verkregen resultaten zijn opgenomen (zie Hoofdstuk 5).

Bij bestudering van Fig. 3 blijkt, dat het voor de verschillende virussen een verschil maakte bij welke temperatuur de geïnoculeerde toetsblaadjes werden bewaard. Na ino-

culatie met Y^N - en Y^C -virus verschenen de vlekjes bij temperaturen tussen 18 en 28°C. Na inoculatie met Y^O -virus ontstonden de vlekjes op 'A6' bij alle onderzochte temperaturen, maar bij hoge temperaturen ging dit sneller.

In een tweede proef konden deze resultaten worden bevestigd. Er werden 25 'A6'-blaadjes met Y^N -virus geïnoculeerd. Uit elk blad werden drie stukjes geponst met een kurkboor (ø 20 mm). De uit een blad verkregen ponsstukjes werden respectievelijk bij 20, 24 en 28°C bewaard. De lichtintensiteit bedroeg in alle gevallen 1875 Lux. Uit deze proef bleek ook, dat naarmate de geïnoculeerde 'A6'-blaadjes bij een hogere temperatuur werden bewaard, de gemiddelde diameter der vlekken en ook de aantallen ervan toenamen.

Tabel 13 geeft weer welke invloed de temperatuur, waarbij geïnoculeerd 'A6'-blad



Figuur 3.

De invloed van de temperatuur op het verschijnen van lokale vlekken op 'A6'-blad na inoculatie met Y^N -, Y^O -, Y^C - en A-virus.

Effect of temperature on appearance of local lesions on 'A6' leaves after inoculation with viruses Y^N , Y^O , Y^C and A.

werd bewaard, op de gemiddelde diameter van de lokale vlekken op het geïnoculeerde blad had. Op elke waarnemingsdatum werden de lokale vlekken op de 'A6'-blaadjes gemeten en volgens grootte gegroepeerd. De gemiddelde diameter der vlekjes in elk object is in Tabel 13 vet gedrukt aangegeven.

Uit deze Tabel kan worden afgeleid, dat de grootte van de vlekken op het geïnoculeerde 'A6'-blad sterk afhankelijk is van de bewaartemperatuur. Bij 24°C neemt de gemiddelde diameter der vlekken op de geïnoculeerde 'A6'-blaadjes tussen vier en vijf dagen na de inoculatie toe van 0,8 tot 1,4 mm. Bij bewaren van de geïnoculeerde blaadjes bij 20°C daarentegen bedroeg de gemiddelde diameter na zeven dagen slechts 1,0 mm.

Uit het voorgaande (zie Fig. 3) kan geconcludeerd worden, dat de optimale bewaartemperatuur voor geïnoculeerd 'A6'-blad tussen 24 en 28°C is gelegen. Omdat bij

TABEL 13. Invloed van de temperatuur op de grootte van de lokale vlekken op 'A6'-blad na inoculatie met Y^N-virus.
Effect of temperature on size of local lesions on 'A6' leaves after inoculation with virus Y^N.

Grootte der lesies (mm) Size of lesions (mm)	Aantal lokale vlekken op 25 'A6'-blaadjes (ø 20 mm) Number of local lesions on 25 'A6' leaflets (ø 20 mm)				
	20°C		24°C		28°C
	7 d	4 d	5 d	4 d	5 d
0,4		3		4	
0,5		8	1	14	
0,6	6	22	3	18	
0,7	3	36	7	27	2
0,8	3	24	3	27	1
0,9	3	32	6	39	4
1,0	14	45	36	94	32
1,1	8	4	13	29	24
1,2	8	11	35	29	26
1,3			6	13	18
1,4		4	19	6	37
1,5	4	1	33	9	43
1,6		1	14	6	17
1,7		1	12	1	13
1,8			10	0	6
1,9			6	2	5
2,0			20	1	14
2,1			4		0
2,2			6		1
2,3			3		
2,4			2		

4 d, 5 d, 7 d = Aantal dagen na inoculatie.

Number of days after inoculation.

Vet gedrukt = Gemiddelde grootte per waarnemingsdatum.

In bold type = Average size per observation date.

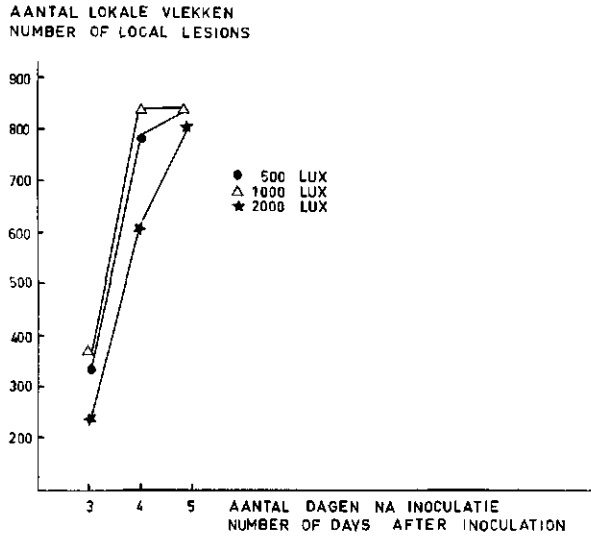
temperaturen tussen 26 en 28°C de geïnoculeerde blaadjes snel vergelen, wordt door BODE (1959 a) een bewaartemperatuur van 24°C het gunstigst geacht.

In een onderzoek met het Y^O-virus, waarbij dezelfde temperaturen werden beproefd, bleek dat ook bij een temperatuur van 14°C nog vlekjes op het toetsblad verschenen. De incubatietijd was echter veel langer en de gemiddelde diameter der vlekjes kleiner.

4.3.3. De invloed van licht op Sdy-blad

Twintig Sdy-blaadjes werden met Y^N-virus ingesmeerd. Met een kurkboor (ø 16 mm) werden uit elk blad vier stukjes geponst. De ponsstukjes uit elk blad werden bij verschillende lichtintensiteit bewaard, nl. 500, 1000, 2000 en 4000 Lux. De temperatuur bedroeg steeds 24°C. Drie, vier en vijf dagen na de inoculatie werden de lokale vlekken, die op de geïnoculeerde blaadjes verschenen, geteld. Vier dagen na de inoculatie werden ook de diameters van de vlekken bepaald. Deze bedroegen respectievelijk 0,5, 0,6 en 0,5 mm (gemiddelden van 10 waarnemingen) bij 500, 1000 en 2000 Lux. Op de geïnoculeerde blaadjes, die bij een lichtintensiteit van 4000 Lux waren bewaard, verschenen zo weinig vlekjes, dat een betrouwbaar gemiddelde niet kon worden bepaald. Drie dagen na de inoculatie werden de meeste vlekken waargenomen op de geïnoculeerde blaadjes, die bij een lichtintensiteit van 1000 Lux waren bewaard. Vijf dagen na de inoculatie waren er geen verschillen tussen de aantallen vlekken op de blaadjes, die aan 1000 Lux en de blaadjes, die aan 500 Lux waren onderworpen geweest. De

resultaten van deze proef zijn gegeven in Fig. 4. De aangegeven waarden zijn uitgedrukt in aantal lokale vlekken per 20 Sdy-bladstukjes.



Figuur 4.

De invloed van de lichtintensiteit op het verschijnen der lokale vlekken op Sdy-blad na inoculatie met Y^N-virus (temp. 24°C).
Effect of light intensity on appearance of local lesions on Sdy leaves after inoculation with virus Y^N (temperature 24°C).

Uit Fig. 4 kan worden geconcludeerd, dat in dit geval de invloed van de lichtintensiteit op het aantal vlekjes niet groot is en zeer waarschijnlijk voor een gedeelte teruggevoerd kan worden tot een warmte-effect. Bij hoge lichtintensiteiten wordt nl. veel stralingswarmte uitgezonden, die door middel van een eenvoudig koelsysteem niet kan worden weggenomen. Zoals in 4.3.4. zal blijken is een hoge bewaartemperatuur ongunstig voor het tot ontwikkeling komen van de vlekjes op geïnoculeerd Sdy-blad. Daarom werd onderzocht wat de invloed van een kortere dagelijkse belichtingsduur op het verschijnen van de vlekken op met Y^N-virus geïnoculeerde Sdy-blaadjes zou zijn. Tien

TABEL 14. De invloed van de dagelijkse belichtingsduur (1000 Lux) op het aantal lokale vlekken, dat na inoculatie met Y^N-virus op Sdy-toetsblad ontstaat (temperatuur 24°C).
Effect of daily duration of illumination (1000 Lux) on the number of local lesions on Sdy test leaves after inoculation with virus Y^N (temperature 24°C).

Belichtingsduur (uur/dag) Duration of illumination (hrs/day)	\bar{x}^{-1}	z^{-2}
24	1,0	0,88 (90%) ³
16	3,7	1,03 (90%)
8	4,1	1,04 (100%)

¹ Gemiddelde van 10 blaadjes (ø 20 mm).
Average of 10 leaflets (ø 20 mm).

² Gemiddelde van 10 getransformeerde aantallen vlekjes.
Average of 10 transformed numbers of lesions.

³ Tussen haakjes: percentage geïnoculeerde blaadjes met lesies.
In parentheses: percentage inoculated leaflets showing lesions.
Verskil 1,03 - 0,88 significant.
Difference 1,03 - 0,88 significant.

blaadjes werden met Y^N-virus geïnoculeerd. Uit elk blaadje werden drie stukjes geponst met een kurkboor (ø 20 mm), die respectievelijk 24, 16 en 8 uur per dag werden belicht. De lichtintensiteit bedroeg in alle gevallen 1000 Lux, de temperatuur 24°C. Drie dagen na de inoculatie verschenen vlekjes op alle Sdy-bladgedeelten. Het bleek, dat op de Sdy-blaadjes, die continu waren belicht minder vlekken verschenen, dan op de blaadjes die dagelijks 8 of 16 uur werden belicht. Het verschil was significant. De resultaten van deze proef zijn samengevat in Tabel 14.

In enkele proeven, die hier niet in detail zullen worden beschreven werd de invloed van de lichtintensiteit op de vorming van lokale vlekken op Sdy-blad na inoculatie met Y^O-virus nagegaan. Deze bleek evenals Y^N-virus gering te zijn.

4.3.4. De invloed van de temperatuur op Sdy-blad

Om gegevens te verkrijgen over de invloed van de temperatuur op het verschijnen van lokale vlekken op Sdy-blad na inoculatie met Y^N-virus werd een proef uitgevoerd met zes groepen van 25 Sdy-blaadjes. Deze groepen werden geplaatst in ruimten met temperaturen van 14, 18, 20, 22, 26 en 30°C. De lichtintensiteit bedroeg constant 500 Lux in alle ruimten. Drie dagen na de inoculatie werden de lokale vlekken geteld. In Tabel 15 zijn de totale aantallen vlekken, voorkomend op de blaadjes, die bij de verschillende temperaturen werden bewaard, weergegeven.

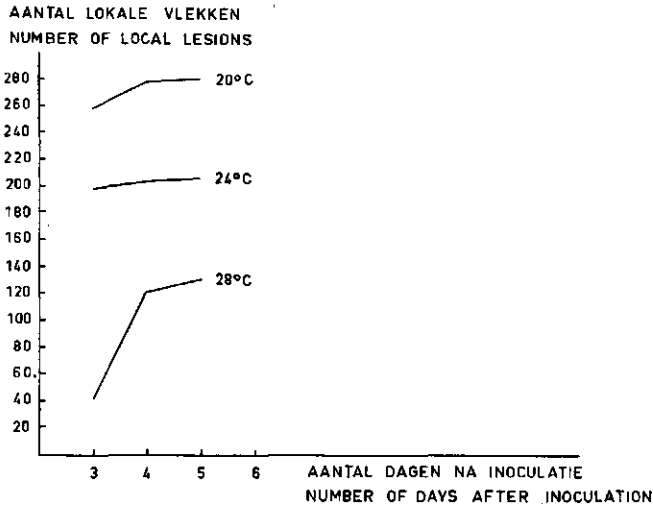
TABEL 15. De invloed van de temperatuur op het aantal vlekken, dat drie dagen na de inoculatie met Y^N-virus op Sdy-toetsblad ontstaat.

Effect of temperature on the number of lesions present three days after inoculation of Sdy test leaves with virus Y^N.

Temperatuur Temperature °C	Aantal lesies op 25 Sdy-blaadjes Number of lesions on 25 Sdy leaflets
14	1026
18	622
20	1414
22	420
26	676
30	0

Uit Tabel 15 blijkt, dat met Y^N-virus geïnoculeerde Sdy-blaadjes de grootste aantallen lokale vlekken vertonen, indien ze tijdens de incubatietijd bij temperaturen tussen 14 en 20°C worden bewaard. Dit kwam ook naar voren in een proef waarin ponsstukjes van met Y^N-virus geïnoculeerd Sdy-blad bij drie temperaturen, nl. 20, 24 en 28°C, werden bewaard (lichtintensiteit 1875 Lux). Drie, vier en vijf dagen na de inoculatie werden de lokale vlekken op de Sdy-blaadjes geteld (Fig. 5) en tevens de diameters der lokale vlekken bepaald. Uit de resultaten blijkt, dat vijf dagen na de inoculatie de lesies op de Sdy-blaadjes, die bij 28°C waren bewaard, gemiddeld een grotere diameter hadden (1,2 mm), dan de lesies der Sdy-blaadjes, die bij 24 (1 mm) en 20°C (0,8 mm) waren geplaatst. Wat dit betreft is de ontwikkeling der vlekjes op geïnoculeerd 'A6'-blad en Sdy-blad dus gelijk.

De in Fig. 5 genoemde aantallen lokale vlekken zijn de totale aantallen op 10 Sdy-bladstukjes. In dit geval verschenen dus de meeste vlekken op het geïnoculeerde toetsblad, dat tijdens de incubatieperiode bij 20°C was bewaard. Ten aanzien van het Y^O-virus konden geen verschillen in aantallen lokale vlekken worden vastgesteld, indien het geïnoculeerde Sdy-blad bij temperaturen tussen 14 en 26°C werd bewaard. Uit de



Figuur 5.

De invloed van de temperatuur op het aantal lokale vlekken op met YN-virus geïnoculeerd Sdy-blad (lichtintensiteit 1875 Lux).

Effect of temperature on number of local lesions on Sdy leaves inoculated with virus YN (light intensity 1875 Lux).

resultaten van twee proeven bleek, dat bij hoge temperatuur (28°C) op het geïnoculeerde toetsblad slechts weinig lokale vlekken verschenen.

4.4. De invloed van slijpmiddelen en de wijze van inoculatie op het aantal lokale vlekken op 'A6'-blad

Sinds FAJARDO (1930) het inoculum met zand vermengde alvorens het op toetsblad uit te smeren, is veel onderzoek verricht naar de invloed van slijpmiddelen op het inoculatiere resultaat. YARWOOD (1957) heeft hiervan een overzicht gegeven.

In een proefje werden enige van deze middelen op 'A6'-blad gebracht, waarna de inoculatie met YN-virus volgde. Van de onderzochte middelen, Carborundum grofte 500, zwavelpoeder, zinkpoeder, calcium-carbonaat, norit en Celite (diatomeeënaarde), bleken Carborundum en Celite de gunstigste resultaten op te leveren. Bij het bestuiven der toetsblaadjes met Carborundum voor het inoculeren, bleken 20 maal meer lokale vlekken op de geïnoculeerde blaadjes te verschijnen dan wanneer dit slijpmiddel niet werd gebruikt.

Het virusbevattende sap kan met verschillende hulpmiddelen op het toetsblad worden uitgesmeerd. De eenvoudigste wijze is het uitwrijven met de wijsvinger. Voor toetsingen op grote schaal is deze methode minder geschikt, daar na elke toetsing de vinger ontsmet moet worden. Om deze moeilijkheden te ontlopen kan het inoculum met hulpmiddelen, zoals propjes kaasdoek, stukjes spons of met een omgebogen glazen staafje op het toetsblad worden uitgesmeerd. Deze hulpmiddelen kunnen op een eenvoudige en snelle wijze worden verwisseld. Er werd nagegaan of zij invloed zouden hebben op het aantal vlekken dat op het geïnoculeerde 'A6'-blad verschijnt. Op vier data werden 20 'A6'-blaadjes in vier gelijkwaardige delen geknipt. Na met Carborundum bestoven te zijn, werd elk kwartgedeelte blad op een bepaalde manier met virusbevattend sap ingewreven, nl. met de vinger, met een propje kaasdoek, met een stukje plastic spons of met een omgebogen glazen staafje. Vijf dagen na de inoculatie werd uit het midden

van elk bladgedeelte een stukje met een kurkboor (\varnothing 16 mm) geponst, en de aantallen hierop voorkomende vlekken geteld. Uit de resultaten van deze proeven kon geconcludeerd worden, dat na inoculatie met de vinger of met een glazen staafje meer lokale vlekken op het geïnoculeerde blad ontstonden dan na het inoculeren met sponsjes of propjes kaasdoek.

4.5. Vergelijking van de vatbaarheid van 'A6'- en Sdy-blad voor Y^N -virus

Uit het voorgaande is gebleken, dat na inoculatie met Y^N -virus de lokale vlekken op Sdy-blad eerder verschijnen dan op 'A6'. De vraag dringt zich dus op, welke der beide toetsplanten nu het meest geschikt is om het Y^N -virus aan te tonen. Uit reeds eerder beschreven proeven is gebleken, dat de optimale omstandigheden voor het verschijnen der lokale vlekken op geïnoculeerde toetsblaadjes voor beide toetsplanten verschillend zijn. Voor een vergelijking van de vatbaarheid voor het Y^N -virus zullen daarom de geïnoculeerde toetsblaadjes onder voor elk der toetsplanten optimale omstandigheden moeten worden bewaard. Daartoe werden 20 'A6'- en 20 Sdy-blaadjes met Y^N -virus geïnoculeerd. Uit elk toetsblad werden met een kurkboor (\varnothing 16 mm) drie stukjes geponst. De drie ponsstukjes uit elk blad werden respectievelijk ieder een verschillend aantal uren per dag belicht, met een lichtintensiteit van 1000 Lux. De belichtingstijden waren respectievelijk 24, 16 en 8 uur per dag. De temperatuur bedroeg 24°C voor 'A6' en 22°C voor Sdy. Het bleek, dat bij een achturige belichting per dag drie dagen na de inoculatie gemiddeld 4 vlekjes per Sdy-bladstukje verschenen. Vijf dagen na de inoculatie waren eenzelfde aantal vlekjes op het 'A6'-bladstukje aanwezig als dit onder continu licht was bewaard. In beide gevallen vertoonden alle geïnoculeerde toetsblaadjes lokale vlekjes. De betrouwbaarheid van het 'A6'- en Sdy-toetsblad om het Y^N -virus aan te tonen, is dus vrijwel even groot, als voor 'A6' een continue belichting en voor Sdy een belichting van acht uur per dag wordt genomen.

4.6. Nabespreking

Het Y^N - en Y^O -virus kunnen op grond van de symptomen die na inoculatie op 'A6'- en Sdy-blaadjes verschijnen moeilijk van elkaar worden onderscheiden. Beide brengen op 'A6'-blad necrotische kringen teweeg, als de geïnoculeerde blaadjes onder optimale omstandigheden worden bewaard. De kringen ontstaan na inoculatie met Y^O -virus, gaan vrij snel over in necrotische vlekken, als de geïnoculeerde blaadjes worden bewaard bij een temperatuur van 24°C en een lichtintensiteit van ongeveer 1500 Lux. Worden de met Y^O -virus geïnoculeerde 'A6'-blaadjes bij hogere temperaturen (26 tot 28°C) bewaard, dan verschijnen de vlekken meestal twee dagen na de inoculatie.

In het algemeen kan worden gezegd, dat met Y^N -virus de Sdy-blaadjes bij lage temperatuur (18 tot 20°C) en de 'A6'-blaadjes bij hoge temperatuur (24 tot 28°C) moeten worden bewaard. De lichtbehoefte van de geïnoculeerde Sdy-blaadjes is gering, zodat de lichtintensiteit weinig invloed uitoefent op het tot ontwikkeling komen der vlekjes. Geïnoculeerde Sdy-blaadjes kunnen worden bewaard bij lichtintensiteiten tot 1000 Lux, zonder dat van een ongunstige invloed sprake is. Hogere lichtintensiteiten werken nadelig, waarschijnlijk door het oplopen van de temperatuur.

De lichtbehoefte van 'A6'-blad is groot; bewaard bij een lagere lichtintensiteit dan 500 Lux (en 24°C) vergeelt het zeer snel. De optimale lichtintensiteit ligt tussen 1500 en 2000 Lux. De optimale temperatuur voor de in dit onderzoek gebezigde stam van het Y^N -virus met 'A6' als toetsblad bevindt zich tussen 24 en 28°C .

Als algemene richtlijn zou men aan kunnen geven, dat voor het verschijnen der lo-

kale vlekjes op 'A6'-blaadjes, die zijn geïnoculeerd met een virus uit de Y-virusgroep (Y^O -, Y^N - of Y^C -virus), de toetsblaadjes bij hoge temperatuur (24 tot 28°C) dienen te worden bewaard.

De grootte der lokale vlekken op het toetsblad wordt beïnvloed door de temperatuur tijdens de incubatie. Bij hoge temperatuur ontstaan grotere lesies dan bij een lage temperatuur.

Er mag gesteld worden, dat de vatbaarheid van het Sdy- en 'A6'-toetsblad voor het Y^N -virus gelijk is, als het toetsblad onder de optimale omstandigheden wordt bewaard. Omdat van 'A6'-planten op eenvoudige wijze gedurende een groot deel van het jaar een grote hoeveelheid toetsblad kan worden verkregen, zal toetsen op aanwezigheid van Y-virus door middel van 'A6'-blad de voorkeur verdienen boven de toetsing door middel van Sdy-blad.

5. DE *SOLANUM DEMISSUM* HYBRIDE 'A6' EN *SOLANUM DEMISSUM* 'Y' ALS TOETSPLANTEN VOOR ANDERE VIRUSSEN

5.1. Inleiding

De onderzochte aardappelvirussen waren verschillende stammen van het A-, X- en aucubabontvirus, terwijl Y^O-, Y^N- en Y^C-(stippelstreep)virus mede werden vergeleken. Voorts werden ook het S- en M-virus van de aardappel bestudeerd. Al deze virussen werden welwillend door ir. A. ROZENDAAL ter beschikking gesteld. Ratelvirus en tabaksmozaïekvirus werden tot slot eveneens getoetst.

Het bleek, dat noch na inoculatie met S-, noch na inoculatie met M-virus symptomen op de bladeren der toetsplanten ontstonden; daarom blijven deze virussen buiten beschouwing.

Aangaande de reactie van 'A6' op andere virussen dan Y-virus is weinig gepubliceerd. KÖHLER (1953) vermeldde gegevens over aucubabont- en A-virus; HANSEN (1960) onderzocht tabaksmozaïekvirus en ARENZ & VULIČ (1961) A-virus.

5.2. De vatbaarheid der toetsplanten

In enige proeven werden steeds twee 'A6'- en twee Sdy-planten met een der bovengenoemde virussen geïnoculeerd. In een dezer proeven werd drie weken na de inoculatie het topblad en het geïnoculeerde blad der besmette planten door middel van geschikte toetsplanten of de serologische methode op aanwezigheid van virus onderzocht.

TABEL 16. De vatbaarheid van 'A6'- en Sdy-planten voor verschillende virussen.
Susceptibility of 'A6'- and Sdy plants to different viruses.

Virus Virus	'A6'		Sdy	
	Symptomen op <i>Symptoms on</i>		Symptomen op <i>Symptoms on</i>	
	Geïnoculeerd blad <i>Inoculated leaves</i>	Top blad <i>Top leaves</i>	Geïnoculeerd blad <i>Inoculated leaves</i>	Top blad <i>Top leaves</i>
YN	LL	Mo N	LL	NS NV
YO	LL	Mo N	LL	NS NV
YC	LL	Mo N	LL	N
A	LL	LMo	NS	NV
X	LL	LMo	NS VA	NS VA
Aucubabont	LL	Mo N	N	N
Ratel <i>Rattle</i>	N	NS NV	N	NV
Tabaksmozaïek <i>Tobacco mosaic</i>	LN	NS VA	NS VA	NS VA

Verklaring der afkortingen:
Explanation of abbreviations:

- LL = Lokale vlekken / *Local lesions.*
- Mo = Mozaïek / *Mosaic.*
- LMo = Licht mozaïek / *Light mosaic.*
- N = Necrose / *Necrosis.*
- LN = Lichte necrose / *Light necrosis.*
- NS = Geen symptomen / *No symptoms.*
- NV = Virus niet aangetoond / *Virus not detected.*
- VA = Virus aangetoond / *Virus detected.*

Dit werd gedaan om zekerheid te verkrijgen omtrent de aanwezigheid van een virus als na de inoculatie geen symptomen op de toetsplanten verschenen. De resultaten van de waarnemingen zijn samengevat in Tabel 16.

Bij beschouwing van deze tabel blijkt, dat de toetsplant 'A6' vatbaar is voor vrijwel alle aardappelvirussen. Deze toetsplant geeft niet alleen een lokale reactie op de onderzochte virussen, zoals na inoculatie met Y^O - en Y^N -virus (Fig. 8) maar wordt ook systemisch ziek. Van de Sdy-planten kan niet gezegd worden, dat ze overgevoelig zijn voor alle virussen uit de Y-virusgroep; het Y^O - en Y^N -virus blijven in de geïnoculeerde bladeren gelokaliseerd, maar het Y^C -virus wordt systemisch.

Onder de hier geldende omstandigheden vertoonden 'A6'-planten na inoculatie met een op het I.P.O. aanwezige stam van het tabaksmozaïekvirus geen of onduidelijke symptomen. HANSEN (1960) vond echter na inoculatie met een bepaalde stam van het tabaksmozaïekvirus duidelijke symptomen op het geïnoculeerde blad, terwijl de gehele plant kort na de inoculatie afstierf. Hieruit zou kunnen volgen, dat de gevoeligheid van 'A6'-planten voor de stammen van het tabaksmozaïekvirus verschillend is.

5.3. De invloed van licht en temperatuur op het verschijnen van lokale vlekken op 'A6'-blad

Proeven werden uitgevoerd waarin de invloed van de lichtintensiteit op het verschijnen van vlekken op afgeplukt 'A6'-blad werd nagegaan, dat respectievelijk met A-virus (isolatie uit 'Lichte Industrie'), Y^C -virus (isolatie uit 'Zeeuwse Blauwe') en X-virus (een virulente isolatie uit 'Bintje') was geïnoculeerd. De temperatuur, waarbij het geïnoculeerde blad werd bewaard, bedroeg 22 tot 24°C. De volgende lichtintensiteiten werden onderzocht: 500, 1000 en 2000 Lux.

De invloed van de lichtintensiteit op het optreden van de vlekjes op het 'A6'-blad bleek van weinig betekenis te zijn.

Voor het onderzoek naar de invloed van de temperatuur op het verschijnen van lokale vlekjes op 'A6'-blad werden proeven uitgevoerd, waarbij de volgende methode werd toegepast. Zes groepen van tien 'A6'-blaadjes werden geïnoculeerd met de respectieve virussen. De groepen werden bewaard bij 14, 18, 20, 22, 26 en 28°C (lichtintensiteit 1250 Lux). Voor enkele virussen werd deze proef onder enigszins andere omstandigheden op een later tijdstip herhaald. De lichtintensiteit was toen 1875 Lux, de bewaartemperatuur 20 en 24°C. De resultaten van de toetsingen zullen in het volgende worden weergegeven.

A-virus. De inoculaties werden achtereenvolgens uitgevoerd met de volgende isolaties uit 'Lichte Industrie', 'Böhm's Allerfrüheste Gelbe', 'Saucisse Rouge' en 'Julinier'. Drie tot vier dagen na de inoculatie verschenen lokale vlekken op het geïnoculeerde blad. Deze waren min of meer stervormig (zie Fig. 6A). De optimale temperatuur tijdens de incubatietijd bedroeg 20°C (zie Fig. 3). Na inoculatie met de isolaties uit 'Lichte Industrie' en 'Saucisse Rouge' verschenen er sneller en meer vlekken dan na inoculatie met de isolatie uit 'Julinier'. Op het geïnoculeerde blad dat bij 24°C was bewaard, verschenen in verschillende proeven geen vlekken. Hiermee werd het belang van de temperatuur tijdens de incubatietijd van het A-virus op 'A6'-blad aangetoond.

Y^C -virus (Stippelstreepvirus). De inoculatie werd uitgevoerd met isolaties uit 'Zeeuwse Blauwe', 'Gelderse Rode', 'Belle de Fontenay' en 'Gladblaadje'. Vier tot vijf dagen na de inoculatie konden lokale vlekken worden waargenomen op de met de isolaties uit 'Zeeuwse Blauwe' en 'Gelderse Rode' geïnoculeerde blaadjes, die waren geplaatst bij 20 tot 28°C. Het bleek, dat de optimale temperatuur voor het verschijnen van lokale vlekken op met Y^C -virus geïnoculeerd 'A6'-blad dezelfde is als

voor met Y^N -virus geïnoculeerd blad (Fig. 3). Na inoculatie met Y^C -virus (isolatie uit 'Gladblaadje') vertoonden alleen de geïnoculeerde toetsblaadjes, die bij 20°C waren bewaard, vlekjes. Op de 'A6'-blaadjes, die met de isolatie uit 'Belle de Fontenay' waren geïnoculeerd, verschenen geen vlekken.

Uit deze resultaten blijkt, dat het 'A6'-blad ook verschillend reageert op verschillende isolaties van het Y^C -virus.

Aucubabontvirus. Drie isolaties van het aucubabontvirus aangeduid als 'PSN 1', 'PSN 2' en 'PSN 3' werden bij dit onderzoek betrokken. Drie tot vier dagen na de inoculatie vertoonden de 'A6'-blaadjes, die waren besmet met 'PSN 1' lokale vlekken als ze tijdens de incubatietijd bij 20°C waren bewaard. Op de 'A6'-blaadjes, die met 'PSN 2' of met 'PSN 3' waren besmet verschenen de lokale vlekken, als ze bij temperaturen omstreeks 26°C waren bewaard. De symptomen waren necrotische kringen, zoals die verschijnen op 'A6'-blad na besmetting met Y^N -virus; binnen de kring was bovendien een necrotische stip aanwezig. Dit was vooral het geval bij bewaartemperaturen tussen 14 en 20°C (zie Fig. 6B). Ook voor aucubabontvirus werden dus verschillen gevonden na inoculatie met verschillende isolaties.

X-virus. De isolaties, die werden getoetst, worden respectievelijk aangeduid als 'Eersteling-X-necrose', 'Eersteling-X-bont', 'Arran Banner' en 'Bintje-X-sterk'.

De 'A6'-blaadjes, besmet met de isolatie 'Bintje-X-sterk' of 'Eersteling-X-bont', vertoonden vier dagen na de inoculatie symptomen, als ze tijdens de incubatietijd bij temperaturen tussen 18 en 20°C waren bewaard. Op de 'A6'-blaadjes, geïnoculeerd met de isolatie 'Arran Banner', verschenen geen symptomen. Op de 'A6'-blaadjes, die waren besmet met de isolatie 'Eersteling-X-necrose' verschenen vier tot vijf dagen na de inoculatie lokale vlekken. De bewaartemperatuur (14 tot 28°C) speelde hierbij geen rol. De grootte van de vlekken was afhankelijk van de temperatuur, waarbij de geïnoculeerde bladeren werden bewaard; bij lage temperatuur ontstonden nl. kleine necrotische vlekken (zie Fig. 6C).

Ratelvirus en tabaksmozaïekvirus. Vier tot vijf dagen na inoculatie van 'A6'-blad met respectievelijk ratel- en tabaksmozaïekvirus verschenen necrotische vlekken van onbepaalde vorm. Dit resultaat is in overeenstemming met de in de literatuur vermelde gegevens (HANSEN, 1960; KÖHLER, 1953).

5.4. De invloed van licht en temperatuur op het verschijnen van lokale vlekken op Sdy-blad

Van de inoculaties op afgeplukt Sdy-blad met Y^C -virus, X-virus, aucubabontvirus, A-virus, ratelvirus en tabaksmozaïekvirus leverde alleen de inoculatie met Y^C -virus positieve resultaten op; de andere virussen brachten geen of onduidelijke symptomen teweeg. Twee tot drie dagen na de inoculatie met Y^C -virus verschenen necrotische vlekjes op de geïnoculeerde bladeren (zie Fig. 7B). De lichtintensiteit bleek hierbij van weinig betekenis te zijn.

Om de invloed van de temperatuur op het verschijnen der lokale vlekken op Sdy-blad na inoculatie met Y^C -virus na te gaan, werden van dit virus de isolaties uit 'Zeeuwse Blauwe', 'Thorbecke', 'Gelderse Rode', 'Belle de Fontenay' en 'Gladblaadje' in het onderzoek betrokken. Bij het toetsen van deze isolaties op Sdy-blaadjes bleek, dat geen lokale vlekken verschenen na inoculatie met de Y^C -virusisolaties uit 'Thorbecke' en 'Belle de Fontenay'. Na inoculatie met isolaties uit 'Zeeuwse Blauwe' en 'Gelderse Rode' verschenen veel en duidelijke vlekken op het toetsblad ongeacht of het geïnoculeerde toetsblad bij 20 of 24°C was bewaard. Na inoculatie met de isolatie uit 'Gladblaadje', verschenen slechts vlekken, als de blaadjes bij 20°C werden bewaard.

Onder dezelfde omstandigheden kunnen dus niet altijd verschillende isolaties van het Y^C-virus op Sdy-toetsblad worden aangetoond.

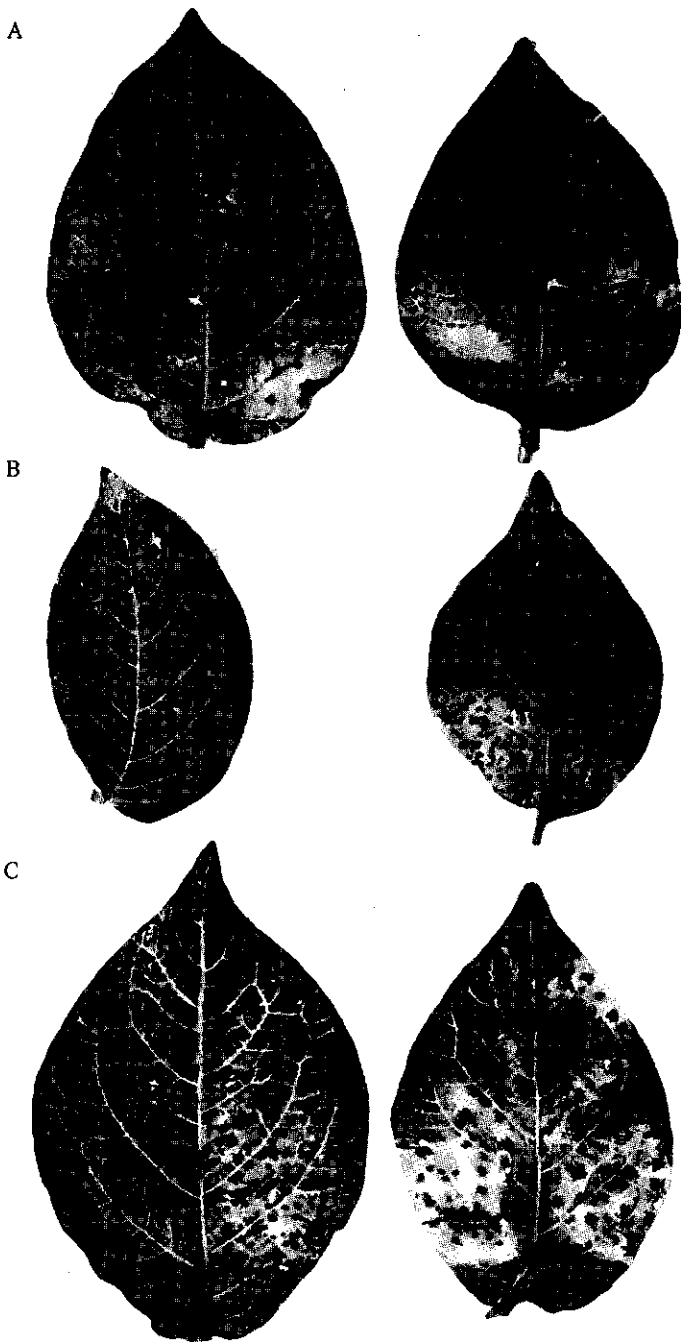
5.5. Nabespreking

Na inoculatie van 'A6'-blaadjes met A-virus verschijnen stervormige necrotische vlekken. Karakteristiek zijn de symptomen, die na inoculatie met aucubabontvirus op de 'A6'-blaadjes verschijnen, nl. necrotische kringen, waarbinnen zich een necrotisch stipje bevindt. Dit treedt vooral op als de geïnoculeerde blaadjes worden bewaard bij temperaturen tussen 14 en 20°C.

Als de 'A6'-blaadjes met A- of X-virus zijn geïnoculeerd, levert bewaring der blaadjes bij een lage temperatuur (circa 20°C) de beste resultaten op. De virulente stammen van deze virussen zijn minder afhankelijk van de temperatuur; voor de zwakke virusstammen bestaat de tendens, dat lage temperaturen gunstig zijn voor een goede ontwikkeling der vlekken op het blad.

De na inoculatie op Sdy-blad verschijnende lokale vlekken zijn alle van dezelfde vorm, ongeacht het virus, waarmede het blad besmet werd. In dit geval is het geheel onmogelijk aan de hand van de symptomen tot een uitspraak over de aard van het betrokken virus te komen (zie Fig. 7).

Het onderscheiden van de virussen op grond van de symptomen is moeilijk, omdat het ontstaan der symptomen sterk afhankelijk is van de uitwendige omstandigheden. Een groot gedeelte van de onderzochte combinaties van virus en toetsplant heeft ieder zijn eigen optimale licht- en temperatuursomstandigheden.



Figuur 6.

Blaadjes van *Solanum demissum* hybride 'A6', 4-5 dagen na inoculatie. Natuurlijke grootte.

Leaflets of Solanum demissum hybrid 'A6', 4-5 days after inoculation. Natural size.

- A. Geïnoculeerd met A-virus / *Inoculated with virus A* (22-23°C).
- B. Geïnoculeerd met aucubabontvirus / *Inoculated with aucubabontvirus*. Links / *Left* : 15°C ; Rechts / *Right* : 23°C.
- C. Geïnoculeerd met X-virus / *Inoculated with virus X*. Links / *Left* : 15°C ; Rechts / *Right* : 22°C.

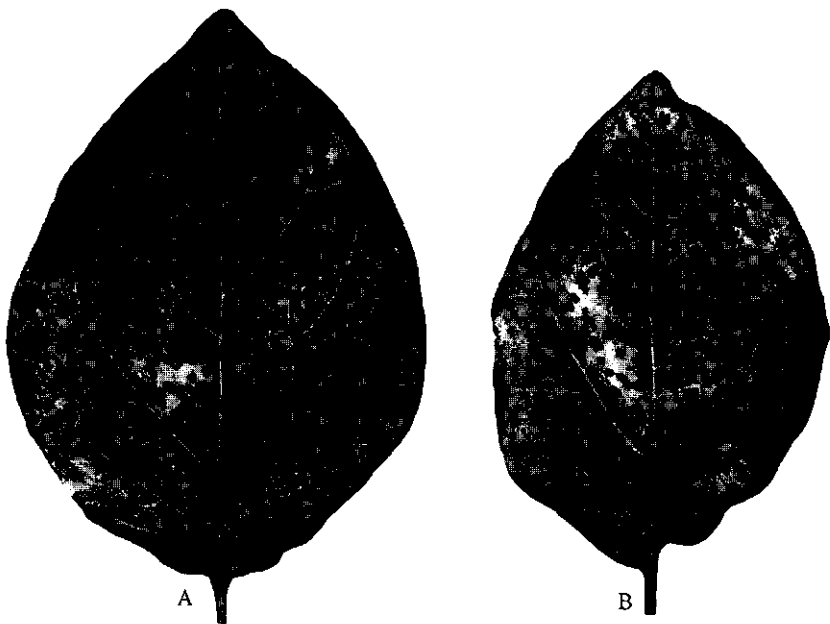


Figuur 7.

Blaadjes van *Solanum demissum* 'Y', 2-3 dagen na inoculatie.
Natuurlijke grootte.

Leaflets of Solanum demissum 'Y', 2-3 days after inoculation.
Natural size.

A. Geïnoculeerd met YN-virus / Inoculated with virus YN.
B. Geïnoculeerd met YC-virus / Inoculated with virus YC.



Figuur 8.

Blaadjes van *Solanum demissum* hybride 'A6', geïnoculeerd met YN-virus (A) en met
YO-virus (B), vijf dagen na inoculatie; natuurlijke grootte.

Leaflets of Solanum demissum hybrid 'A6' inoculated with virus YN (A) and with
virus YO (B), five days after inoculation; natural size.

6. HET AANTONEN VAN Y^N-VIRUS DOOR MIDDEL VAN 'A6'-TOETSBLAD

6.1. Inleiding

Ten einde een bepaalde toetsmethode met behulp van toetsplanten te kunnen ontwikkelen en inzicht te verkrijgen in de betrouwbaarheid daarvan is het raadzaam secundair besmet plantemateriaal als inoculum in de experimenten te betrekken. Men is er dan van verzekerd, dat het inoculum meestal een redelijke hoeveelheid virus bevat, zodat geconcludeerd kan worden, of in geval slechte resultaten worden verkregen deze uit de toetsmethode zelf voortkomen. In de volgende paragrafen zal daarom eerst worden nagegaan wat de ervaring was met secundair besmet plantemateriaal (blad, stengel en knol). Omdat men ook belangstelling heeft voor de gevoeligheid van een toetsmethode zullen daarna de resultaten van de proeven met primair besmet plantemateriaal worden weergegeven. Hierdoor wordt men ingelicht over de vraag welke de hoeveelheid virus is, die nog juist tot het ontstaan van enige lesies kan leiden. Uit deze proeven zal moeten blijken, hoeveel dagen na de inoculatie het virus hierin zodanig verbreid en vermeerderd is, dat het met de bladtoets kan worden aangetoond.

6.2. Materialen en methoden

Inoculum en inoculatiemethoden. De toetsblaadjes werden voor het inoculeren lichtelijk bestoven met Carborundum grofte 500. Het inoculum werd op verschillende wijzen verkregen en toegediend.

a. Blad van besmette aardappelplanten van verschillende rassen of van tabaksplanten 'White Burley'. De aardappelplanten werden gekweekt in potten (\varnothing 24 cm) in een luisvrije kas met wisselende temperatuur. De gezonde planten werden geïnoculeerd op een samengesteld blad te halver hoogte van de stengel. De primair besmette planten werden wel, de secundair besmette planten werden niet op één stengel gehouden. Tabaksplanten met twee goed ontwikkelde blaadjes werden in een luisvrije kas met een constante temperatuur van 20 tot 22°C geplaatst (zie 1.4.2). Het uitpersen van het blad geschiedde met een handpers of met mortier en stamper. Het sap werd met de wijsvinger of met plastic sponsje op het toetsblad uitgesmeerd.

b. Spruiten van besmette aardappelknollen. Deze werden met een handpers gekneusd en de verkregen massa werd met een ontsmet pincet onder lichte druk over het toetsblad gewreven.

c. Besmette aardappelknollen, die werden aangesneden. De wondvlakken werden over de toetsblaadjes gestreken. De knollen werden zodanig met een ontsmet mes aan het apicale of basale deel aangesneden, dat een aantal vaatbundels zichtbaar werd (DE BOKX, 1962).

Mes en pincet werden ontsmet door flamberen in een gasvlam en afspoelen met leidingwater.

Het verbreken van de kiemrust van de knollen. Voor het verkrijgen van spruiten op aardappelknollen, die vrij spoedig na het rooien in de proeven werden betrokken, werd gebruik gemaakt van „rindite” (DENNY, 1945). Rindite is een mengsel van 2-chloorethanol, 1,2 dichloorethaan en tetrachloorkoolstof in de verhouding van 7:3:1. De met rindite behandelde knollen werden drie tot vier weken zonder bevochtiging in dozen bij kamertemperatuur (circa 20°C) bewaard.

Het stekken van knollen. Onder de knolstekmethode wordt verstaan de methode, waarbij de controle op aanwezigheid van virus in de aardappelknollen aan

de daaruit verkregen jonge plantjes plaats heeft. Uit elke te onderzoeken knol laat men dan nl. een plantje opgroeien uit een oog met omringend knolvlees (= knolstek), hetgeen visueel op het voorkomen van virusziekten kan worden beoordeeld.

In de proeven, waarbij knollen van primair geïnfecteerde aardappelplanten door middel van aangesneden knollen of gekneusde spruiten werden getoetst, werd ter vergelijking het bladsap van de knolstekken door middel van toetsblad op aanwezigheid van virus onderzocht. Het resultaat van deze toetsing gaf een aanwijzing over het al of niet aanwezig zijn van het virus in de knol.

6.3. Het aantonen van Y^N-virus in secundair besmette planten

6.3.1. In blad en stengel

Van een reeks experimenten zullen slechts de waarnemingen van een proef worden medegedeeld. Het toetsen van het blad en de stengel had in het algemeen vier weken na opkomst van de planten plaats. Dit was zowel het geval bij de knolstekken als bij de normaal in het voorjaar gepote knollen.

In Tabel 17 zijn de resultaten der toetsingen van blad en stengel van zes groepen besmette planten van het ras 'Bintje' weergegeven.

TABEL 17. De waarde van het sap van stengels van secundair besmette planten 'Bintje' (leeftijd vier weken) als inoculum voor de bladtoets in vergelijking met sap van bladeren der planten.

The value of the sap of stems of secondarily infected 'Bintje' plants (age four weeks) as inoculum for the leaf test in comparison with leaf sap of the plants.

Groep Group	Aantal planten waarin Y ^N -virus werd aangetoond Number of infected plants detected by means of test			
	stengelsap sap of stems		bladsap sap of leaves	
1	12/16 ¹	(8) ²	11/16 ¹	(13) ²
2	35/39	(30)	36/39	(53)
3	29/33	(34)	31/33	(61)
4	21/40	(54)	22/40	(49)
5	17/39	(2)	21/39	(25)
6	20/29	(30)	26/29	(28)

¹ Teller = aantal planten waarin Y^N-virus werd aangetoond.

Noemer = totaal aantal getoetste planten.

¹ Numerator = number of infected plants detected by test.

Denominator = total number of plants tested.

² Tussen haakjes: gemiddeld aantal lokale vlekken per toetsblad.

In parentheses: average number of local lesions per test leaf.

Hieruit blijkt, dat de virusconcentratie in de stengel vrijwel gelijk is aan die in het blad. In bovengenoemde proef kon in alle getoetste planten het virus worden aangetoond. VULIČ & ARENZ (1963) vonden eveneens, dat door middel van stengelsap als inoculum voor de bladtoets de aanwezigheid van Y^N-virus voor vrijwel 100% in secundair besmette planten kon worden vastgesteld. Hun bewering, dat de virusactiviteit in secundair besmette zeven weken oude aardappelplanten, in vergelijking met de activiteit in twee weken oude planten aanzienlijk terugliep, kon niet worden bevestigd. Zij kweekten hun planten echter vrij abnormaal op. De knollen werden nl. gepoot in potjes van 8 cm diameter. Dit zal ongetwijfeld de planten voortijdig hebben doen verouderen, waardoor mogelijk de betrouwbaarheid van de toetsing minder is geworden.

6.3.2. In blad van verschillende aardappelrassen

Uit desbetreffende waarnemingen bleek, dat het aantal lokale vlekken, dat na het toetsen van bladsap van planten van verschillende rassen op 'A6'-blad verscheen sterk kon variëren.

Twee mogelijke verklaringen hiervoor zijn: 1. de aardappelrassen bezitten een verschillend gehalte aan remstoffen; 2. de aardappelrassen hebben verschillende virusconcentraties.

NIENHAUS (1961/1962 b) concludeerde uit de resultaten van zijn proeven, dat in de aardappel een remstof voorkomt. Het remstofgehalte zou in de verschillende aardappelrassen verschillend zijn. Om na te gaan of ook bij Nederlandse rassen verschillen in remstofgehalte in de bladeren voorkomen, werd een aantal proefjes uitgevoerd. Hierbij werd 1 ml virusbevattend sap gemengd met 3 ml sap van gezonde aardappelplanten. Dit mengsel werd getoetst op 'A6'-blad volgens de bladhelften-methode, waarbij een mengsel van virusbevattend sap en water in de verhouding 1:3 als controle diende. In latere proeven werd alleen nagegaan hoeveel vlekken er ontstonden op 'A6'-bladhelften na inoculatie met respectievelijk twee mengsels bladsap. Elk mengsel bestond uit sap van een besmette plant en sap van een gezonde plant van een bepaald aardappelras, uiteraard in dezelfde mengverhouding. Door gebruik te maken van de helften der blaadjes van twee bladstukken van een samengesteld 'A6'-blad kon het effect van de remstof worden nagegaan. Er werden aldus acht rassen onderzocht, maar het was niet mogelijk een duidelijk verschil in remstofgehalte in de verschillende rassen aan te tonen.

Hieruit vloeit voort, dat de waargenomen verschillen in virusactiviteit bij de verschillende rassen zijn terug te voeren tot verschillen in virusconcentratie.

Om een inzicht te krijgen in de vraag of er verschillende virusconcentraties in het blad van secundair besmette planten van verschillende rassen voorkomen, werden twee proeven uitgevoerd. Deze proeven omvatten de in Tabel 18 genoemde rassen.

Alleen 'A6'-bladeren met twee goed ontwikkelde bladstukken werden voor het toetsen gebruikt. De vier jukblaadjes werden over de hoofdnerf door midden gesneden. Op de acht bladhelften van een samengesteld blad werden respectievelijk de virusbevattende sappen van acht rassen geïnoculeerd. Doordat op elk blaadje, nl. op de linker- en de rechter helft, twee verschillende virusbevattende sappen waren geïnoculeerd, kwamen binnen een samengesteld blad vier combinaties van virussuspensies voor. Om tenminste de minimale aantallen combinaties van virussuspensies te krijgen, die een wiskundige verwerking van de uitkomsten mogelijk zou maken, waren zeven samengestelde toetsbladeren nodig. De transformatie der aantallen lokale vlekken geschiedde volgens de formule van KLECZKOWSKI (1955) (zie 2.2. pag. 21). Na wiskundige verwerking der gegevens bleek, dat de rassen door verschillen in Y^N -virusconcentratie in groepen konden worden onderscheiden. 'Furore', 'Bintje', 'Climax' en 'Sirtema' vormden een groep en 'Burmania', 'Surprise' en 'Sientje' een andere. 'Voran' nam een aparte plaats in. De geconstateerde verschillen in aantallen vlekken tussen de beide groepen waren significant. De verschillen in aantallen vlekken binnen iedere groep waren niet significant. De resultaten van beide proeven waren gelijklopend en zijn samengevat in Tabel 18.

Generaliserend kan gezegd worden, dat de concentratie van het Y^N -virus in de als zeer vatbaar bekend staande rassen het hoogst is. Het zou interessant zijn te weten of vroegrijpheid en vatbaarheid voor Y^N -virus samenhangt met de hierboven gevonden verschillen tussen de verschillende rassen. Daarom werd aan de hand van de hierover bekende gegevens nagegaan of er inderdaad bepaalde correlaties zijn aan te wijzen.

Uit de verwerking der gegevens in Tabel 18 bleek, dat er een verband bestond tussen de virusconcentratie in het bladsap en de vatbaarheid van het ras voor het Y^N-virus. Volgens de toets van SPEARMAN werd de rangcorrelatie coëfficiënt vastgesteld op - 0,61 (zie DE JONGE, 1958). De correlatie tussen vroegrijpheid en vatbaarheid voor het virus is niet duidelijk. Ter verduidelijking zijn in Tabel 18 de objecttotalen (totaal van de getransformeerde aantallen lokale vlekken per half toetsblad) van de experimenten 1 en 2 opgenomen.

TABEL 18. Vroegrijpheid en vatbaarheid voor het Y^N-virus van enige Nederlandse aardappelrassen. *Precocity and susceptibility to virus Y^N of some Dutch potato varieties.*

Ras Variety	Vroegrijpheid ¹ Precocity ¹	Vatbaarheid ² Susceptibility ²	Object totalen ³ Object totals ³	
			Proef 1 Experiment 1	Proef 2 Experiment 2
'Doré'	9,5	2		11,8
'Sirtema'	9	4	12,6	
'Bintje'	7,5	5	12,8	11,0
'Climax'	7,5	4	12,6	12,6
'Eigenheimer'	7	4		10,7
'Record'	6,5	3		12,2
'Sientje'	6,5	8	10,7	10,6
'Burmania'	5,5	9	9,9	
'Surprise'	5,5	9	10,2	
'Furore'	4	6	12,4	
'Pimpernel'	4	7,5		9,5
'Vorán'	4	7,5	8,8	10,5

1.2 Gegevens overgenomen uit de Rassenlijst voor Landbouwgewassen 1963. In deze lijst wordt alleen de vatbaarheid voor Y-virus aangegeven.

1.2 *Data taken from the Dutch List of Varieties 1963. In this list only susceptibility to virus Y is mentioned.*

¹ 1 - 10 = laat / late - vroeg / precocious.

² 1 - 10 = vatbaar / susceptible - resistent / resistant.

³ Totaal van getransformeerde aantallen vlekken / bladheft.

³ *Total of transformed numbers of lesions / half leaflet.*

Voor Duitse aardappelrassen kwamen ARENZ & HUNNIUS (1961) tot dezelfde conclusie. Zij meenden ook een verband te zien tussen virusconcentratie en de op de betrokken plant zichtbare symptomen. Deze bewering kon in zijn algemeenheid aan de hand van de resultaten van onze proeven niet worden bevestigd.

Een praktische consequentie van bovengenoemde verschillen is, dat bij bepaalde rassen een onjuiste diagnose kan worden gesteld indien het bladsap te sterk wordt verdund.

6.3.3. In knollen en spruiten

De met virus besmette aardappelknol is nog zeer weinig het object van onderzoek geweest. Toetsingen op aanwezigheid van virus in de knol leidden vrijwel altijd tot negatieve resultaten (JOHNSON, 1925; BURNETT & JONES, 1931; HOYMAN, 1951). De serologische methode kan in het algemeen niet worden toegepast om virus in besmette knollen aan te tonen. PROCHAL (1953) toonde het X-virus in besmette aardappelknollen aan door gebruik te maken van de complementbindingsreactie.

NIENHAUS (1960) vermeldt, dat kort na het rooien het virus in besmette knollen

niet kan worden aangetoond. Het was volgens hem noodzakelijk eerst de kiemrust van de knollen te verbreken. Zoals uit het volgende zal blijken, dient men duidelijk aan te geven op welk tijdstip de knollen besmet zijn geraakt en op welk tijdstip ze zijn geroid. Het blijkt, dat deze factoren grote invloed hebben op het virus in de knol.

Volgens NIENHAUS (1962) neemt de virusactiviteit met aflopende vegetatieperiode af. Dit zou dus zeggen, dat in afgerijpte aardappelknollen de virusactiviteit gering is. Ten einde dit voor Nederlandse rassen na te gaan werden 8, 10, 12, 14 en 16 weken na het poten secundair met Y^N-virus besmette planten van 'Bintje' en 'Sirtema' geroid. De helft van het aantal knollen werd kort na het rooien aan navel- en top-einde op aanwezigheid van virus onderzocht. Twee weken na elke rooidatum werden de resterende knollen getoetst. In Tabel 19 is het resultaat van de toetsingen van de knollen, die kort na het rooien werden onderzocht, samengevat.

TABEL 19. Afrijpende knollen van secundair besmette aardappelplanten als inoculum voor de bladtoets.
Ripening tubers of secondarily infected potato plants as inoculum for the leaf test.

Rooien aantal weken na poten <i>Harvesting number of weeks after planting</i>	Aantal knollen, waarin Y ^N -virus werd aangetoond <i>Number of infected tubers detected by test</i>	
	'Bintje'	'Sirtema'
8	8/8 ¹ = 100% (28,0) ²	12/14 ¹ = 85% (6,1) ²
10	17/17 = 100% (51,5)	14/14 = 100% (8,9)
12	15/16 = 93% (13,6)	9/18 = 50% (1,7)
14	18/18 = 100% (25,9)	17/17 = 100% (3,5)
16	15/16 = 93% (6,0)	5/15 = 30% (0,9)

¹ Teller = aantal knollen waarin virus werd aangetoond.

Noemer = totaal aantal getoetste knollen.

¹ *Numerator = number of infected tubers detected by test.*

Denominator = total number of tubers tested.

² Tussen haakjes: gemiddeld aantal lokale vlekken per 'A6'-blad.

In parentheses: average number of local lesions per 'A6' leaf.

De tendens is aanwezig, dat in afgerijpte knollen het Y^N-virus moeilijker aangetoond kan worden dan in vroegergeroide. De verschillen zijn sprekender voor de knollen van 'Sirtema' dan voor die van 'Bintje'. In de knollen van 'Bintje' kon echter in alle gevallen virus worden aangetoond, en wel zonder verbreking van de kiemrust.

In de inleiding van deze proef is reeds gezegd, dat op elke rooidatum de knollen in twee groepen werden verdeeld. Het toetsen van deze groepen geschiedde met een interval van twee weken. Dit betekende, dat de knollen van twee opeenvolgende rooidata op hetzelfde tijdstip op toetsblad van gelijke herkomst konden worden getoetst. Ook uit deze herhaling der toetsingen bleek, dat de activiteit van het virus in afgerijpte knollen lager was dan in nog groeiende knollen. Bij nog niet afgerijpte knollen werden twee weken na het rooien altijd dezelfde waarden voor de virusactiviteit waargenomen als direct na het rooien. Op de rooidata, waarop een scherpe daling in de virusactiviteit in de knollen werd vastgesteld (Tabel 19), nl. 12 weken na het poten voor 'Sirtema' en 16 weken na het poten voor 'Bintje', werd deze ook waargenomen bij de knollen van de tweede groep. Op deze tijdstippen kon het loof van de desbetreffende rassen als volkomen afgestorven worden beschouwd. De scherpe daling in de virusactiviteit in de knollen hangt dus nauw samen met het afsterven van het loof der planten.

Uit Tabel 19 blijkt ook, dat als jong geroidde knollen van secundair met Y^N-virus besmette planten kort na het rooien op aanwezigheid van virus worden getoetst, in de

meeste knollen het virus kan worden aangetoond. Dit kon worden bevestigd met een proef, waarin jong gerooide knollen van 'Climax', 'Furore', 'Sirtema' en 'Bintje' werden getoetst. De leeftijd der planten bij het rooien varieerde van 9 tot 11 weken.

Uit de resultaten van de proeven bleek, dat de activiteit van het virus in het top- en naveleinde der knollen meestal gelijk was. In die gevallen, waarin verschillen in virusactiviteit werden aangetoond, bleek het naveleinde der knol de hoogste activiteit te bezitten.

In de spruiten van knollen van secundair besmette planten kon het virus in alle gevallen aangetoond worden, zodra de spruit enige mm lang was.

6.3.4. De invloed van het verbreken van de kiemrust op de virusactiviteit in de knol

Het laat zich denken, dat door het verbreken van de kiemrust bepaalde processen in de knol worden geactiveerd, tengevolge waarvan de virusvermeerdering wordt gestimuleerd. Het is ook mogelijk, dat secundair met Y^N-virus besmette knollen reeds een maximale hoeveelheid virus bevatten. Zoals uit 6.3.3. nl. bleek, was de virusactiviteit in jong gerooide knollen van secundair besmette planten groot.

Om na te gaan of behandeling met rindite een virusvermeerdering tot gevolg had, werden secundair besmette planten van 'Bintje', 'Climax', 'Sirtema' en 'Record' circa 12 weken na het poten gerooid. De knollen werden in twee groepen verdeeld. Een week na het rooien werden de knollen van een groep met rindite behandeld, terwijl die van de andere onbehandeld werden gelaten. Hierna werden de behandelde en onbehandelde knollen gedurende vier weken bewaard. Vervolgens werden ze na aansnijden van navel- en topeinde op aanwezigheid van virus getoetst.

TABEL 20. De invloed van rindite op de virusactiviteit in knollen van vroegerooid secundair besmette aardappelplanten.
Effect of Rindite on virus activity in tubers of early harvested secondarily infected potato plants.

Rassen Varieties	Aantal knollen waarin virus werd vastgesteld <i>Number of infected tubers detected by means of test</i>	
	Behandeld met rindite <i>Treated with Rindite</i>	Onbehandeld <i>Not treated</i>
'Bintje'	5/8 ¹ = 62% (2,2) ²	6/8 ¹ = 75% (9,0) ²
'Sirtema'	4/4 = 100% (7,5)	5/5 = 100% (2,8)
'Climax'	6/6 = 100% (1,5)	7/7 = 100% (4,7)
'Record'	6/7 = 85% (4,4)	4/8 = 50% (0,7)

¹ Teller = aantal knollen waarin virus werd aangetoond.

Noemer = totaal aantal getoetste knollen.

¹ Numerator = number of infected tubers detected by test.

Denominator = total number of tubers tested.

² Tussen haakjes: gemiddeld aantal lokale vlekken per half 'A6'-blad.

In parentheses: average number of local lesions per 'A6' half leaf.

Uit Tabel 20, waarin de verkregen resultaten zijn weergegeven, blijkt, dat een behandeling met rindite de virusactiviteit in vroeg gerooide knollen van secundair besmette planten weinig veranderde. Verder valt uit deze tabel af te lezen, dat met aangesneden onbehandelde knollen als inoculum voor de bladtoets geen gunstige resultaten werden verkregen. Een behandeling van de knollen met rindite heeft daarop weinig invloed. De rindite had blijkbaar alleen grote invloed op de spruitontwikkeling. De aldus behandelde knollen vertoonden goed ontwikkelde spruiten. De virusactiviteit in de spruiten was hoog, zoals uit toetsingen bleek.

6.3.5. De invloed van het verwonden op de virusactiviteit in de knol

Het verwonden van knollen van primair met Y^N-virus besmette aardappelplanten heeft een zodanig effect, dat de activiteit van het virus (bepaald naar aantallen vlekjes op toetsbladeren) in de nabijheid van het wondvlak wordt verhoogd (DE BOKX, 1962). In enige proeven met knollen van secundair besmette planten is eveneens de invloed van het verwonden op de virusactiviteit in de knol onderzocht.

Dit werd op de volgende wijze uitgevoerd. Van een partij knollen werd de helft van het aantal aan navel- en topeinde aangesneden, zoals beschreven onder 6.2. Enige tijd later werd van deze knollen de nieuw gevormde kurklaag verwijderd. Op dit tijdstip werden de andere knollen voor de eerste maal aangesneden. Door de toetsing der knollen volgens de bladhelften-methode uit te voeren, kon het effect van het verwonden (i.c. tweemaal aansnijden) door het verschil in aantallen verschenen lokale vlekken op het toetsblad worden afgelezen.

De knollen van een reeds onder 6.3.3. genoemde proef werden zowel direct als een week na het rooien op aanwezigheid van Y^N-virus getoetst. Het bleek, dat in het algemeen bij het verwonden de virusactiviteit in de knollen werd verhoogd, indien de knollen jong waren gerooid. Bij afgerijpte knollen was het effect geringer of geheel afwezig. De resultaten van de proef zijn samengevat in Tabel 21.

TABEL 21. De invloed van het verwonden van knollen van secundair besmette planten op de activiteit van het Y^N-virus.
Effect of wounding tubers of secondarily infected plants on the activity of virus Y^N.

Leeftijd der planten in weken bij rooien Age of plants in weeks at harvesting	Aantal lokale vlekken per 'A6'-blad Number of local lesions per 'A6' leaf											
	'Climax'			'Furore'			'Sirtema'			'Bintje'		
	A	Niet verwond Not wounded	Verwond Wounded	A	Niet verwond Not wounded	Verwond Wounded	A	Niet verwond Not wounded	Verwond Wounded	A	Niet verwond Not wounded	Verwond Wounded
9	6	26	103	15	15	45	14	9	43	19	13	53
10	13	17	26	19	8	19	15	10	13	17	31	15
11	7	2	12	9	6	3	12	3	5	12	20	15

A = Aantal getoetste knollen / Number of tubers tested.

6.3.6. De invloed van licht en temperatuur op de virusactiviteit in knollen en spruiten

De invloed van licht en temperatuur op de virusactiviteit in besmette knollen en spruiten werd uitvoerig onderzocht voor vroeg gerooide knollen, waarvan de kiemrust was verbroken. De invloed van drie temperaturen werd onderzocht, nl. 20, 24 en 30°C. Tevens werd het effect nagegaan op de virusactiviteit in de knollen en spruiten, als ze in het donker of gedurende 16 uur per dag bij een lichtintensiteit van 1800 Lux waren bewaard. Van 'Record', 'Vorán', 'Bintje' en 'Eigenheimer' werden elf weken na het poten een aantal planten gerooid. De gerooide knollen werden in zes gelijkwaardige groepen verdeeld en elke groep onder de gewenste omstandigheden bewaard (zie Tabel 22). Vier weken na het verbreken van de kiemrust werden de knollen op aanwezigheid van Y^N-virus onderzocht. De resultaten van de proef zijn samengevat in Tabel 22. Het bleek, dat een belichting van 1800 Lux bij 20 en 24°C de virusactiviteit in de knol zeer weinig beïnvloedde.

De temperatuur, waarbij de spruitende knollen werden bewaard, bleek van grote invloed op de virusactiviteit in de knol te zijn. Een bewaar temperatuur van 30°C deed de virusactiviteit in de knollen van verschillende rassen aanzienlijk dalen.

Uit Tabel 22 kan verder worden afgelezen, dat bij knollen, waarvan de kiemrust

TABEL 22. De invloed van licht en temperatuur op de virusactiviteit in knollen en spruiten van secundair met YN-virus besmette planten.

Effect of light and temperature on virus activity of tubers and sprouts of plants secondarily infected with virus YN.

Ras Variety	Belicht/Illuminated			Onbelicht/Not illuminated			Tempera- tuur Tempera- ture
	knol/top tuber/top	spruit sprout	Aantal lesies Number of lesions	knol/top tuber/top	spruit sprout	Aantal lesies Number of lesions	
'Record'	8,6	78,3	15/15 ¹	14,2	135,7	14/14 ¹	20°C
'Voran'	12,3	246,9	10/10	6,2	257,7	9/9	
'Bintje'	4,8	227,1	8/8	5,8	278,3	9/9	
'Eigenheimer'	37,5	181,4	14/14	18,7	192,9	14/14	
'Record'	3,7	54,7	15/15	4,1	103,6	14/14	24°C
'Voran'	3,9	112,1	10/10	12,7	177,7	9/9	
'Bintje'	3,3	123,6	10/10	4,5	124,1	8/8	
'Eigenheimer'	4,9	101,7	15/15	15,2	155,6	14/14	
'Record'	2,0	1,2	8/15	3,6	2,4	8/14	30°C
'Voran'	0,4	2,3	4/10	4,6	4,4	7/9	
'Bintje'	0,5	1,6	8/10	1,4	19,3	8/8	
'Eigenheimer'	0,1	4,7	12/15	0,5	1,6	9/13	

¹ Teller = aantal knollen waarin virus werd aangetoond.
Noemer = totaal aantal getoetste knollen.

¹ Numerator = number of infected tubers detected by test.
Denominator = total number of tubers tested.

kunstmatig was verbroken, in het topeinde de grootste virusactiviteit werd waargenomen. De proefnemingen met besmette knollen die nog in rust verkeerden, worden hier niet uitvoerig vermeld. De resultaten waren vergelijkbaar met die, genoemd in Tabel 22, m.a.w. alleen de temperatuur had een aantoonbare invloed op de virusactiviteit in de knol.

Voorts blijkt nog uit deze tabel, dat de virusactiviteit in de spruiten aanzienlijk hoger is dan in de knollen. Het belichten van de knollen tijdens het spruiten heeft geen aantoonbare invloed gehad op de virusactiviteit in de spruiten. Evenals dit bij het rechtstreekse toetsen na aansnijden van knollen het geval was, is de temperatuur tijdens het spruiten van de knollen wel van belang voor de virusactiviteit. Een hoge bewaar temperatuur doet deze sterk verminderen.

Uit het onderzoek van NIENHAUS (1961/1962 b) bleek, dat de remmende werking van het sap van spruiten, die in het donker waren opgegroeid, op de virusactiviteit sterker was dan van het sap van spruiten uit het licht. Hieruit zou moeten volgen dat, als geen andere effecten eveneens een rol spelen, bij het toetsen van met Y-virus besmette spruiten uit het donker hierin een lagere virusactiviteit zou worden vastgesteld dan in de spruiten van knollen uit het licht van dezelfde partij. Doch in de proeven van NIENHAUS (1962) komt dit niet tot uiting.

De onder invloed van een hoge temperatuur ontstane vermindering in virusactiviteit

in de spruiten zou te verklaren zijn door een verhoogde activiteit van remstoffen in de spruit (NIENHAUS, 1957). Een rechtstreeks effect van de temperatuur op het virus zou eveneens mogelijk zijn (KASSANIS, 1954), hetgeen ook aannemelijk wordt door de bevindingen van THOMSON (1956). Door een warmtebehandeling (temperatuur 35 tot 38°C) van met Y-virus besmette knollen ('Aucklander Short Top') lukte het de laatstgenoemde auteur virusvrije spruiten te verkrijgen. De resultaten van onze proeven ondersteunen de veronderstelling van een directe invloed van de temperatuur op het virus.

De virusactiviteit in de spruiten blijkt volgens Tabel 22 gunstig beïnvloed te worden als de knollen bij 20°C worden bewaard. Bij lagere temperatuur groeiden de spruiten zo traag, dat zij niet op het gewenste tijdstip konden worden getoetst.

Of de virusactiviteit in de spruiten afhankelijk is van het betrokken aardappelras is niet duidelijk; de tendens is echter aanwezig, dat dit wel het geval is.

In onze proeven werden uit praktische overwegingen gekneusde spruiten als inoculum gebruikt. Er werden geen betrouwbare verschillen tussen de resultaten der proeven gevonden, als sap van spruiten en aangesneden spruiten naast elkaar werden vergeleken. Het op dit punt betrekking hebbende onderzoek van NIENHAUS (1961/1962 c) is te onvolledig om de door hem geformuleerde conclusie te rechtvaardigen.

6.4. Het aantonen van Y^N-virus in primair besmette planten

6.4.1. In blad en stengel

Een aantal aardappelplanten ('Bintje') werd 11 weken na het poten met Y^N-virus geïnoculeerd. Negen dagen na de inoculatie kon in 65% der aardappelplanten virus in het geïnoculeerde blad worden aangetoond; pas 14 dagen na de inoculatie was dit het geval bij alle geïnoculeerde bladeren en bij 25% der topbladeren.

Van 'Bintje', 'Doré', 'Eigenheimer' en 'Sirtema' werden enige planten 8, 10 en 12 weken na het poten met Y^N-virus geïnoculeerd. Van elk ras werden 5, 10 en 15 dagen na elke inoculatie datum 5 planten geroid. Vijf dagen na iedere inoculatie datum kon in geen enkel geval virus in het geïnoculeerde blad worden aangetoond. De nateelten van deze planten bleken later virusvrij te zijn. Vijftien dagen na de inoculatie kon in alle planten, die acht weken na het poten waren geïnoculeerd, de aanwezigheid van virus worden vastgesteld. Van de planten, die 10 en 12 weken na het poten waren geïnoculeerd, bleken 15 dagen na de inoculatie slechts 50% der geïnoculeerde bladeren virus te bevatten.

Uit proeven met tabaksmozaïek- en aardappel-X-virus is bekend, dat er in de stengels van primair geïnfecteerde planten gedeelten voor kunnen komen, die geen virus bevatten, terwijl toch virus door deze stengelstukken is getransporteerd (SAMUEL, 1934; BEEMSTER, 1958). Uit de resultaten van door ons uitgevoerde toetsingen van stengelstukken van primair met Y^N-virus geïnfecteerde aardappelplanten bleek, dat in zeer weinig gevallen virus in de stengel kon worden aangetoond. In het hierna volgende zullen enige desbetreffende proeven worden besproken.

Elf weken na het poten werden 27 planten ('Bintje') met Y^N-virus geïnoculeerd. Veertien dagen later kon in 50% van de stengels virus worden aangetoond.

In een tweede proef werden 30 planten zowel van 'Bintje' als 'Eigenheimer' negen en tien weken na het poten met Y^N-virus geïnoculeerd. In de planten van 'Bintje', die tien weken na het poten waren geïnoculeerd, kon 15 dagen na de inoculatie in 100% der stengels virus worden aangetoond. Bij 'Eigenheimer' kon toen slechts in 20% der

stengels virus worden vastgesteld. De resultaten van de stengeltoetsingen van andere proeven waren alle negatief.

In deze proeven kon dus in planten die op het moment van inoculatie 9 tot 12 weken oud waren, het virus in het geïnoculeerde blad later worden aangetoond dan in planten, die op dat tijdstip jonger waren. Ook in planten die op het tijdstip van inoculatie zes weken oud waren, kon pas na een vrij lange periode het virus worden aangetoond. VULIČ (1963) kwam tot vrijwel dezelfde conclusies. Hij voerde zijn proeven uit met planten, die twee, vier en zeven weken oud waren. NIENHAUS (1961/1962 a), die vijf weken oude aardappelplanten met „Tabakrippenbräune-Virus” inoculeerde, toonde reeds twee dagen na de inoculatie door middel van 'A6'-blad virus in het geïnoculeerde blad aan.

Uit het verrichte onderzoek kan worden geconcludeerd, dat het toetsen van blad en stengel van primair besmette aardappelplanten om de gezondheidstoestand van de knollen vast te stellen dikwijls tot onjuiste uitspraken kan leiden.

6.4.2. In knollen

De resultaten van enige proeven omtrent het gebruik van aangesneden knollen als inoculum voor de bladtoets werden reeds eerder gepubliceerd (DE BOKX, 1961 b). Een bevestiging hiervan werd verkregen in een proef met planten van 'Bintje'. Zes weken na het poten werden de planten met Y^N-virus geïnoculeerd. Dertig dagen hierna kon bij het rooien direct in alle knollen virus worden vastgesteld. Er mag worden aangenomen, dat naarmate de tijd tussen de inoculatie en het rooien der planten langer wordt, de virusconcentratie in de knollen zal stijgen.

Had echter de inoculatie op een laat tijdstip in het groeiseizoen plaats, dan kon het virus niet direct na het rooien aangetoond worden, al bedroeg het tijdsinterval tussen inoculatie en rooien enige weken. Dit komt dus overeen met hetgeen beschreven is voor afrijpende knollen van secundair besmette aardappelplanten (zie Tabel 19, pag. 59).

In een proefje werden knollen ('Bintje') aan het naveleinde aangesneden en de wondvlakken werden met Carborundum bestrooid en met Y^N-virus ingewreven. Drie tot twaalf weken na de inoculatie werden deze knollen wekelijks op aanwezigheid van virus onderzocht. Het bleek, dat in vrijwel geen enkele knol virus kon worden aangetoond. In ongeveer 50% van de spruiten van dezelfde knollen was dit echter wel mogelijk. Hieruit blijkt, dat het virus zich na de inoculatie in de knol had verplaatst.

Uit dit resultaat zou kunnen worden afgeleid, dat er virusvermeerdering in de knol, mogelijk in de vaatbundels, had plaats gevonden. De bereikte concentratie was echter zo gering, dat het virus niet direct met behulp van 'A6'-blad in de knollen kon worden vastgesteld, maar wel in de spruiten daarvan.

6.4.3. De invloed van het verbreken van de kiemrust op de virusactiviteit in de knol

Reeds eerder was gevonden, dat het verbreken van de kiemrust van primair met Y^N-virus besmette knollen van het ras 'Bintje' met behulp van rindite, de virusactiviteit hierin verhoogde (DE BOKX, 1961 b). Het virus kon echter niet in alle knollen worden aangetoond; het percentage van de knollen waarin dit wel lukte, schommelde tussen 50 en 90%.

Ten einde na te gaan of het ras invloed zou hebben op de virusactiviteit die na het verbreken van de kiemrust der knollen hierin kan worden aangetoond, werd een proef uitgevoerd.

Van de rassen 'Bintje', 'Sirtema', 'Pimpernel' en 'Climax' werden gezonde knollen

in de kas uitgepoot. Tien weken daarna werden alle planten met Y^N-virus geïnoculeerd. Tien dagen na de inoculatie werden alle planten gerooid. De geogste planten werden per ras in drie gelijkwaardige partijen verdeeld. De kiemrust der knollen van de eerste partij werd zes weken na het rooien door middel van rindite verbroken. De knollen waren voordien bij kamertemperatuur bewaard. Drie weken na het verbreken van de kiemrust werden de knollen op aanwezigheid van virus getoetst. De knollen der tweede partij werden 16 weken bij 4°C bewaard. Vier weken na de behandeling met rindite werden de knollen op aanwezigheid van virus onderzocht. De knollen van de derde partij tenslotte werden niet behandeld en tot 16 weken na het rooien in een met lucht gekoelde poterbewaarplaats opgeslagen. Deze knollen werden 16 weken na het rooien eveneens getoetst. De kiemrust van deze knollen was reeds op natuurlijke wijze beëin-

TABEL 23. Aantal knollen van primair besmette planten waarin Y^N-virus werd aangetoond bij gebruik van knol-inoculum. Het verbreken der kiemrust had zes weken na het rooien plaats.
Number of tubers of primarily infected plants detected by using cut tubers as inoculum. Breaking dormancy six weeks after harvesting.

Ras Variety	Aantal besmette knollen <i>Number of infected tubers</i>				Aantal besmette knolstekken <i>Tuber indexing</i>
	naveleind	topeind	navel- en top- eind	totaal	
	<i>heel end</i>	<i>rose end</i>	<i>heel and rose end</i>	<i>total</i>	
'Climax'	1/30 ¹ (3,2) ²	7/30 ¹ (6,5) ²	13/30 ¹	21/30 ¹	27/29 ¹
'Pimpernel'	0/29 (0,0)	1/29 (0,3)	0/29	1/29	3/29
'Sirtema'	2/27 (1,0)	6/27 (3,3)	8/27	16/27	16/18
'Bintje'	3/31 (4,3)	1/31 (5,6)	16/31	20/31	24/27

¹ Teller = aantal knollen waarin virus werd aangetoond.

Noemer = totaal aantal getoetste knollen.

¹ Numerator = number of infected tubers detected by means of test.

Denominator = total number of tubers tested.

² Tussen haakjes: gemiddelde aantal lokale vlekken per half 'A6'-blad.

In parentheses: average number of local lesions per 'A6' half leaf

TABEL 24. Aantal knollen van primair besmette planten waarin Y^N-virus werd aangetoond bij gebruik van knol-inoculum. De knollen werden 16 weken bij 4°C bewaard, daarna verbroken van de kiemrust.
Number of tubers of primarily infected plants detected by test using cut tubers as inoculum. Tubers stored 16 weeks at 4°C after which dormancy was broken.

Ras Variety	Aantal besmette knollen <i>Number of infected tubers</i>				Aantal besmette knolstekken <i>Tuber indexing</i>
	naveleind	topeind	navel- en top- eind	totaal	
	<i>heel end</i>	<i>rose end</i>	<i>heel and rose end</i>	<i>total</i>	
'Climax'	1/29 ¹ (10,2) ²	3/29 ¹ (11,0) ²	20/29 ¹	24/29 ¹	24/24 ¹
'Pimpernel'	1/29 (0,5)	3/29 (2,6)	2/29	6/29	5/29
'Sirtema'	1/26 (26,3)	0/26 (29,0)	23/26	24/26	24/24
'Bintje'	5/30 (7,4)	4/30 (15,8)	14/30	23/30	21/24

¹ Teller = aantal knollen waarin virus werd aangetoond.

Noemer = totaal aantal getoetste knollen.

¹ Numerator = number of infected tubers detected by means of test.

Denominator = total number of tubers tested.

² Tussen haakjes: gemiddeld aantal lokale vlekken per half 'A6'-blad.

In parentheses: average number of local lesions per 'A6' half leaf.

TABEL 25. Aantal knollen van primair besmette planten waarin Y^N-virus werd aangetoond bij gebruik van knol-inoculum. De knollen waren 16 weken luchtgekoeld bewaard, zonder behandeling met rindite.

Number of tubers of primarily infected plants detected by test using cut tubers as inoculum. Tubers stored 16 weeks in an air cooled room, without Rindite treatment.

Ras Variety	Aantal besmette knollen <i>Number of infected tubers</i>				Aantal besmette knolstekken <i>Tuber indexing</i>
	naveleind <i>heel end</i>	topeind <i>rose end</i>	navel- en top- eind <i>heel and rose end</i>	totaal <i>total</i>	
'Climax'	2/14 ¹ (1,1) ²	2/14 ¹ (0,9) ²	0/14 ¹	4/14 ¹	19/28 ¹
'Pimpernel'	0/28 (0,0)	0/28 (0,0)	0/28	0/28	0/28
'Sirtema'	1/25 (0,3)	5/25 (0,8)	2/25	8/25	18/20
'Bintje'	1/30 (0,0)	4/30 (1,7)	0/30	5/30	20/29

¹ Teller = aantal knollen waarin virus werd aangetoond.

Noemer = totaal aantal getoetste knollen.

¹ *Numerator* = number of infected tubers detected by means of test.

Denominator = total number of tubers tested.

² Tussen haakjes: gemiddeld aantal lokale vlekken per half 'A6'-blad.

In parentheses: average number of local lesions per 'A6' half leaf.

digd. De resultaten van de proef zijn samengevat in de Tabellen 23, 24 en 25, die corresponderen met de drie genoemde groepen.

Bij de bestudering van deze tabellen blijkt, dat het kunstmatig verbreken van de kiemrust de virusactiviteit sterk beïnvloedde. Zowel aan het navel- als topeinde der knollen werd de activiteit verhoogd, zodat in een groot gedeelte der knollen het virus in beide einden aangetoond kon worden. De virusactiviteit bleek in het topeinde meestal iets hoger dan in het navelende. De verschillen waren echter niet groot. Hieruit mag geconcludeerd worden, dat in de knollen van aardappelplanten, die tien weken na het poten geïnoculeerd werden, het virus vrij snel door de gehele knol was getransporteerd. Onder invloed van de kieming zal in de directe omgeving van de spruiten waarschijnlijk de virusactiviteit zijn toegenomen. Uit de tabellen zou kunnen worden afgeleid, dat de virusactiviteit in de knollen van het ras 'Pimpernel' zeer laag was. Omdat echter veel knollen niet besmet waren geraakt, werd een laag gemiddeld aantal lokale vlekken verkregen. Wordt het gemiddelde echter berekend over het aantal knollen, dat virus bevatte, dan ligt de virusactiviteit in de knollen van het ras 'Pimpernel' gelijk aan dat in de knollen van het ras 'Bintje'. Het effect van het verbreken van de kiemrust der knollen op de virusactiviteit was in dit geval voor de rassen 'Climax', 'Pimpernel', 'Sirtema' en 'Bintje' gelijk. Een behandeling met rindite van knollen die gedurende 16 weken bij 4°C waren bewaard, bleek een gunstig effect te hebben op de virusactiviteit. Een mogelijke verklaring hiervoor is, dat het overbrengen der knollen van 4°C naar kamertemperatuur een extra stimulans aan de fysiologische activiteit der knol heeft gegeven, als gevolg waarvan de virusvermeerdering is gestimuleerd.

6.4.4. De invloed van het verwonden op de virusactiviteit in de knol

Het effect van het verwonden van aardappelknollen van primair besmette planten op de aantoonbaarheid van het Y^N-virus is reeds eerder beschreven (DE BOKX, 1962). In een volgende proef werd de periode tussen de eerste en tweede maal aansnijden bekort tot zeven dagen, om na te gaan of dan reeds dit effect zou kunnen worden aangetoond. Met een tussenpoos van een week werden knollen van de rassen 'Bintje' en

'Eigenheimer' in de kas gepoot. Negen weken na de laatste pootdatum werden alle planten met Y^N-virus geïnoculeerd. Acht, twaalf en vijftien dagen na de inoculatie werden van elk ras tien planten geroid. De gerooide knollen werden in twee gelijkwaardige partijen verdeeld. De knollen van de eerste partij werden direct en een week na het rooien op aanwezigheid van virus onderzocht. Hierbij werd dezelfde werkwijze toegepast, als beschreven in 6.3.5. De knollen van de tweede partij werden een week bij kamertemperatuur bewaard, waarna de kiemrust der knollen werd verbroken. Drie weken hierna werden ze op aanwezigheid van virus getoetst. In Tabel 26 zijn de resultaten van de proef met het ras 'Bintje' weergegeven. De resultaten van de toetsingen van de knollen van het ras 'Eigenheimer' waren hiermee vergelijkbaar.

TABEL 26. De invloed van het verwonden van knollen van primair besmette planten van het ras 'Bintje' op de aantoonbaarheid van Y^N-virus.

The effect of tuber wounding on the detectability of virus Y^N in tubers of primarily infected 'Bintje' plants.

Leeftijd der planten in weken op tijdstip van inoculatie <i>Age of plant at time of inoculation (in weeks)</i>	Aantal dagen tussen inoculatie en rooien <i>Number of days between inoculation and harvesting</i>	Percentage besmet bevonden knollen <i>Percentage of tubers found infected</i>				
		Verwonde knollen <i>Tubers wounded</i>			Met rindite behandelde knollen <i>Tubers treated with Rindite</i>	
		Eenmaal aansnijden <i>Cutting once</i>	Tweemaal aansnijden <i>Cutting twice</i>	Knolstektoetsing <i>Tuber indexing</i>	Vier weken na rooien <i>Four weeks after harvesting</i>	Knolstektoetsing <i>Tuber indexing</i>
9	8	0/10 ¹ = 0%	3/10 ¹ = 30%	80%	4/10 ¹ = 40%	90%
	12	0/10 = 0%	5/11 = 45%	66%	6/10 = 60%	80%
	15	3/10 = 30%	9/10 = 90%	100%	9/9 = 100%	100%
10	8	0/12 = 0%	1/12 = 8%	75%	3/11 = 27%	90%
	12	0/12 = 0%	8/12 = 64%	80%	5/12 = 40%	100%
	15	0/12 = 0%	5/11 = 45%	100%	10/11 = 90%	100%

¹ Teller = aantal knollen waarin Y^N-virus werd aangetoond.

Noemer = totaal aantal getoetste knollen.

¹ Numerator = number of infected tubers detected by means of test.

Denominator = total number of tubers tested.

Zoals in 6.4.2. reeds werd gezegd, kan door het toetsen op 'A6'-blad het Y^N-virus in de knol direct na het rooien worden aangetoond, als de virusconcentratie hierin een bepaalde drempelwaarde heeft bereikt. Dit blijkt eveneens uit Tabel 26, want in de knollen van de planten, die negen weken na het poten werden geïnoculeerd en 15 dagen na de inoculatie werden geroid, kon direct na het rooien reeds in 30% der knollen virus worden aangetoond. Naarmate de periode tussen inoculatie en rooien langer is, zal de virusconcentratie in de knollen tot een maximale waarde stijgen. De tijd, waarin dit maximum in knollen van primair besmette planten zal zijn bereikt is onder meer afhankelijk van de leeftijd van de geïnfecteerde planten. Knollen van secundair besmette planten zullen de maximale virusconcentratie bezitten.

Zoals Tabel 26 laat zien, hebben het verbreken der kiemrust en het verwonden der knollen de virusactiviteit sterk doen toenemen. Het verbreken van de kiemrust door middel van rindite heeft een iets gunstiger effect dan het verwonden der knollen. Voor beide behandelingen geldt echter, dat het gunstigste effect wordt verkregen met de knollen, die reeds de hoogste virusconcentratie bezitten.

Om snel een indruk te krijgen omtrent de besmetting in de knol, zou het belangrijk

zijn te weten in welk gedeelte der knol het Y^N-virus gelokaliseerd is. Volgens de onderzoeken van BEEMSTER (1958) wordt bij primaire partiële infectie het X-virus het frequentste aangetroffen in de ogen op het topeinde der knol. ARENZ & VULIČ (1961) zijn eveneens van mening, dat het „Tabakrippenbräune-Virus” hoofdzakelijk in het topeinde der knollen is gelokaliseerd.

De resultaten van de proef, waarop Tabel 26 betrekking heeft, verschaften ook inlichtingen omtrent de lokalisatie van het virus in de knol. Bij de tweede maal aansnijden werden het navel- en het topeinde der knollen op 'A6'-bladhelften getoetst (Tabel 27).

TABEL 27. De plaats van het Y^N-virus in de knol.
Localization of virus Y^N in the tuber.

Ras <i>Variety</i>	Leeftijd der planten bij inoculatie in weken <i>Age of plants in weeks at time of inoculation</i>	Aantal dagen tussen inoculatie en rooien <i>Number of days between inoculation and harvesting</i>	Aantal getoetste knollen <i>Number of tubers tested</i>	Gemiddeld aantal lokale vlekken per half 'A6'-blad <i>Average number of local lesions per 'A6' half leaf</i>	
				naveleinde <i>heel end</i>	topeinde <i>rose end</i>
'Bintje'	9	8	10	0,4	5,5
		12	11	0,6	3
		15	10	14	14,4
	10	8	12	0	0,3
		12	12	1,3	2,2
		15	11	8	2
'Eigenheimer'	9	8	9	0	0
		12	6	0,6	4
		15	9	55	36
	10	8	12	0	0
		12	12	0,2	3
		15	12	18	15

Hierin komt weer tot uiting wat reeds in 6.4.3. werd vermeld. Al vrij snel is het Y^N-virus door de gehele knol verplaatst, zodat aan navel- en topeinde der knol ongeveer gelijke virusactiviteit kan worden vastgesteld. In de onderhavige proef had dit binnen 15 dagen na de inoculatie van de plant plaats. Bij toetsing van knollen van het ras 'Bintje', acht dagen na inoculatie, en toetsing der knollen van het ras 'Eigenheimer', 12 dagen na inoculatie, wordt echter de grootste virusactiviteit in het topeinde waargenomen. Dit wijst erop, dat het virus hoofdzakelijk naar het topeinde der knol wordt vervoerd.

Het verwonden van de knollen had eveneens een verhoging van de virusactiviteit tot gevolg in besmette knollen van het ras 'Bintje', die buiten waren geteeld. Uit de resultaten van een desbetreffende proef bleek verder, dat de besmetting van de knollen hier in een veel langzamer tempo plaats vond dan bij knollen afkomstig van kasplanten.

6.4.5. Het aantonen van Y^N-virus in spruiten

In 6.4.2. is melding gemaakt van het feit, dat bij knollen met een lage virusconcentratie het toetsen op aanwezigheid van virus direct na het rooien veelal geen betrouwbare resultaten opleverde. Verder is duidelijk geworden, dat het verbreken van de kiemrust en het verwonden der knollen de virusactiviteit verhoogde. Door het verbreken van de kiemrust der knollen werd de ontwikkeling der spruiten sterk gestimu-

leerd. In het volgende zal worden nagegaan welke waarde gekneusde spruiten hebben als inoculum voor de bladtoets. Aangezien het toetsen van spruiten op aanwezigheid van virus (korthedshalve aangeduid als spruittoetsingen) nauw verband houdt met het toetsen van aangesneden knollen (= knoltoetsingen) zullen verschillende reeds genoemde proeven weer worden besproken, waarbij nu vooral de nadruk zal vallen op een vergelijking tussen de resultaten van spruit- en knoltoetsingen.

Het toetsen van aardappelspruiten op aanwezigheid van X-virus met behulp van een antiserum werd beschreven door STAPP & BARTELS (1950). Aldus konden zij in aardappelspruiten, die in het donker waren gegroeid, het X-virus betrouwbaar aantonen. De proeven om het Y-virus op gelijke wijze aan te tonen leidden niet tot de gewenste resultaten. Uit ons onderzoek met primair besmette knollen van het ras 'Bintje' bleek, dat door middel van gekneusde spruiten met behulp van de bladtoets het Y^N-virus betrouwbaar in de knollen kon worden aangetoond (DE BOKX, 1961 b).

Ten einde na te gaan of er bij verschillende rassen verschillen bestaan bij het toetsen der spruiten op de aanwezigheid van Y^N-virus werden enige proeven uitgevoerd. Eén hiervan zal hier worden beschreven. Van de rassen 'Bintje', 'Climax', 'Doré', 'Eigenheimer', 'Furore', 'Pimpernel', 'Record', 'Sientje', 'Sirtema', 'Vorán', 'Burmania', 'Alpha' en 'Eersteling' (X-virus vrij) werden tien weken na het poten enige planten met Y^N-virus geïnoculeerd. Tien dagen na de inoculatie werden de planten gerooid en enige dagen later werden de knollen met rindite behandeld. Vijf weken na het verbreken van de kiemrust werden zowel de spruiten als de knollen op aanwezigheid van Y^N-virus getoetst (Tabel 28).

Uit deze tabel blijkt, dat de nateelten van de onderzochte rassen niet alle in gelijke

TABEL 28. Aantal knollen van verschillende rassen, waarin Y^N-virus werd aangetoond, als aangesneden knollen en gekneusde spruiten als inoculum werden gebruikt.
Number of infected tubers of different varieties detected by means of test using cut tubers and crushed sprouts as inoculum.

Ras Variety	Aantal knollen / Number of tubers						Knoltektoetsing Tuber indexing	
	knol/tuber		spruit/sprout		spruit-lengte (mm) length of sprout (mm)			
	naveleinde heel end	topeinde rose end						
'Bintje'	12/12 ¹	(7) ²	12/12 ¹	(3) ²	12/12 ¹	(144) ²	10	12/12 ¹ = 100%
'Climax'	8/13	(5)	8/13	(11)	12/13	(129)	20	12/13 = 92%
'Doré'	3/4	(14)	3/4	(11)	4/4	(61)	5	4/4 = 100%
'Eigenheimer'	11/12	(12)	11/12	(40)	10/12	(120)	30	10/12 = 83%
'Furore'	2/10	(2)	3/10	(18)	5/10	(151)	25	5/10 = 50%
'Pimpernel'	4/12	(2)	2/12	(1)	6/12	(69)	5	6/12 = 50%
'Record'	6/10	(9)	4/10	(4)	—	—	5	10/10 = 100%
'Sientje'	3/6	(5)	6/6	(13)	6/6	(150)	10	6/6 = 100%
'Sirtema'	6/10	(6)	7/10	(4)	9/10	(110)	20	9/10 = 90%
'Vorán'	2/6	(2)	5/6	(5)	6/6	(180)	15	6/6 = 100%
'Burmania'	2/10	(6)	0/10	(0)	6/10	(67)	5	6/10 = 60%
'Alpha'	0/3		0/3		0/3		—	0/3 = 0%
'Eersteling'	2/2	(35)	2/2	(18)	—	—	—	

¹ Teller = aantal knollen/spruiten waarin Y^N-virus werd aangetoond.

Noemer = totaal aantal getoetste knollen/spruiten.

¹ Numerator = number of infected tubers/sprouts detected by means of test.

Denominator = total number of tubers/sprouts tested.

² Tussen haakjes: gemiddeld aantal lokale vlekken per 'A6'-blad.

In parentheses: average number of local lesions per 'A6' leaf.

mate werden besmet. In de Tabellen 23, 24 en 25 kon men reeds hetzelfde aflezen. Het is opmerkelijk, dat steeds de nateelten van de rassen 'Furore' en 'Eigenheimer' in verhouding tot de nateelten van de andere rassen zo weinig besmet waren geraakt. De cijfers voor de vatbaarheid voor het Y-virus volgens de Rassenlijst (Tabel 18) zijn niet met deze gegevens in overeenstemming.

De resultaten van de spruittoetsingen zijn beter dan die van de knoltoetsingen. De virusactiviteit in de spruiten van knollen van primair besmette planten is enige tientallen malen groter dan in de knollen zelf. Dit is te verklaren door het groeien der spruiten, dat de virusvermeerdering stimuleert. De spruiten van de verschillende rassen groeien na de behandeling met rindite niet even snel uit. Knollen van het ras 'Doré' geven uitgesproken korte spruiten, die van het ras 'Sirtema' lange. Hoewel uit Tabel 28 geconcludeerd zou kunnen worden dat in de kortste spruiten de geringste virusactiviteit wordt gemeten, is er gezien de resultaten van andere proefnemingen geen duidelijk verband tussen de lengte van de spruit en de activiteit van het virus daarin. De activiteit van het virus in de spruiten op knollen van de rassen 'Pimpernel' en 'Burmania' was altijd lager dan die in de spruiten op knollen van de andere getoetste rassen. De overeenstemming tussen de resultaten van de toetsingen van spruiten en blad van de knolstekken is vrijwel altijd beter dan tussen resultaten van toetsing van knollen en blad van knolstekken.

6.4.6. *De invloed van licht en temperatuur op de virusactiviteit in knol en spruit*

Knollen van primair met Y^N-virus besmette planten van de rassen 'Bintje', 'Sirtema', 'Eigenheimer' en 'Furore' werden dagelijks belicht van 4 tot 20 uur met een lichtintensiteit van 1900 Lux, en bewaard bij temperaturen van 20, 24 en 30°C.

Uit de resultaten van deze proef bleek, dat belichting der knollen geen invloed had op de virusactiviteit. De temperatuur, waarbij de knollen waren bewaard beïnvloedde de virusactiviteit, zoals beschreven voor knollen van secundair besmette aardappelplanten (zie 6.3.6. pag. 61).

Van de rassen 'Bintje', 'Eigenheimer', 'Sirtema' en 'Furore' werden negen weken na het poten enige planten met Y^N-virus geïnoculeerd. Tien dagen hierna werd een aantal planten geroid. Twee weken na het rooien werd de kiemrust der knollen kunstmatig verbroken; zij werden hierna in zes gelijkwaardige partijen opgesplitst. Gedurende vier weken na het verbreken van de kiemrust werden drie partijen in het donker en drie partijen in het licht (16 uur per dag) geplaatst. De lichtintensiteit bedroeg in dit geval 1900 Lux. Voor beide partijen waren de temperaturen respectievelijk 20, 24 en 30°C. De resultaten van de toetsingen der spruiten op aanwezigheid van virus zijn in Tabel 29 vermeld. Het toetsen van belichte en onbelichte spruiten had plaats op 'A6'-bladhelften.

Bij de bestudering van Tabel 29 blijkt, dat de spruiten op knollen, die bij 20°C waren bewaard een grotere virusactiviteit bezaten dan de spruiten der knollen bewaard respectievelijk bij 24 en 30°C. Aanvankelijk was gedacht, dat het virus door bewaring bij 30°C geheel geïnactiveerd zou zijn. Uit de resultaten der toetsingen van knolstekken van knollen van secundair besmette planten bleek echter, dat dit niet het geval kon zijn. De invloed van het licht op de virusactiviteit in de spruiten was niet groot bij de knollen, die bij 20°C waren geplaatst. 'Eigenheimer' en 'Furore' vormden hierop een uitzondering. Dit is waarschijnlijk een gevolg van een lagere virusconcentratie in de knollen van deze rassen.

Ten einde de invloed van het licht op de virusactiviteit in de spruit nogmaals na te gaan werd de volgende proef uitgevoerd. Een aantal met Y^N-virus besmette knollen

TABEL 29. Invloed van temperatuur en licht op de aantoonbaarheid van YN-virus in spruiten uit knollen van primair besmette planten.
Effect of temperature and light on the detectability of virus YN in sprouts from tubers of primarily infected plants.

Ras Variety	Temperatuur Temperature °C	Belicht / Illuminated		Onbelicht / Not illuminated	
		spruitinoculum sprout inoculum	knolstektoetsing tuber indexing	spruitinoculum sprout inoculum	knolstektoetsing tuber indexing
'Furore' 'Eigenheimer' 'Sirtema' 'Bintje'	20	8/21 ¹ (12) ²	7/21 ¹	4/23 ¹ (8) ²	4/23 ¹
		6/11 (21)	6/11	3/8 (4)	3/8
		16/16 (33)	16/16	16/17 (31)	16/17
		20/20 (51)	20/20	16/16 (47)	16/16
'Furore' 'Eigenheimer' 'Sirtema' 'Bintje'	24	2/22 (0,3)	5/22	3/23 (0,7)	5/23
		6/8 (3)	7/8	1/7 (0,4)	4/7
		12/15 (9)	15/15	3/15 (1)	14/15
		2/10 (14)	10/10	1/9 (7)	9/9
'Furore' 'Eigenheimer' 'Sirtema' 'Bintje'	30	0/21 (0)	4/21	0/21 (0)	5/21
		0/11 (0)	2/11	0/10 (0)	4/10
		0/16 (0)	10/16	0/17 (0)	17/17
		0/9 (0)	5/9	0/17 (0)	14/17

¹ Teller = aantal spruiten waarin YN-virus werd aangetoond.

Noemer = totaal aantal getoetste spruiten.

² Numerator = number of infected sprouts detected by means of test.

Denominator = total number of sprouts tested.

² Tussen haakjes: gemiddelde aantal lokale vlekken per half 'A6'-blad.

In parentheses: average number of local lesions per 'A6' half leaf.

van de rassen 'Sirtema', 'Bintje', 'Doré' en 'Eigenheimer' werden in de lengterichting der knol met een ontsmet mes doorgesneden. De linker helften werden in het donker, de rechter helften in het licht (1800 Lux) bewaard, bij een constante temperatuur van 20°C. Op het tijdstip, waarop de proef werd ingezet, werden alle spruiten van de knollen verwijderd. Achttien dagen na de aanvang der proef werden de nieuw gevormde spruiten op aanwezigheid van virus onderzocht. Dit geschiedde door middel van bladhelften-methode op 'A6'-toetsblad.

Na wiskundige verwerking der gegevens bleek, dat alleen het verschil tussen de resultaten van de toetsingen van de onder verschillende omstandigheden opgegroeide spruiten van knollen van het ras 'Bintje' significant was. De spruiten, die in het licht waren gegroeid, hadden een grotere virusactiviteit dan die uit het donker. Hoewel de resultaten van de toetsingen der spruiten op de knollen van de rassen 'Eigenheimer' en 'Sirtema' hetzelfde leken te zijn, bleken na wiskundige verwerking de verschillen niet significant. De spruiten van knollen van het ras 'Doré' uit het donker hadden daarentegen een grotere virusactiviteit dan die uit het licht, maar het verschil was niet significant.

Uit onze proeven kwam enigszins naar voren, dat door belichting de virusactiviteit het sterkste toenam in de spruiten der knollen van planten, die laat in het groeiseizoen waren geïnoculeerd. Dit gold echter niet voor de spruiten der knollen van de rassen 'Doré' en 'Climax'. Hierbij was het effect der belichting op de virusactiviteit in de spruiten altijd zeer gering.

De belichting van de spruiten heeft blijkbaar alleen effect als deze bij de aanvang der belichting een geringe virusconcentratie bezitten. Hiermede is duidelijk geworden waarom NIENHAUS (1962) concludeerde, dat belichting van besmette spruiten geen invloed had op de virusactiviteit. Hij werkte waarschijnlijk met knollen die sterk met Y-virus waren besmet.

6.5. Nabespreking

Zoals uit de beschreven proeven blijkt, wordt de grootste virusactiviteit vastgesteld in groeiende besmette weefsels, zoals het blad en de stengel van secundair met Y^N -virus besmette aardappelplanten. In jonge knollen van secundair besmette planten kan direct na het rooien het virus door middel van de bladtoets worden aangetoond. Dit geldt ook voor jonge knollen van primair besmette planten, indien de tijd tussen inoculatie en rooien afhankelijk van de leeftijd van de planten, voldoende lang is. De mogelijkheid om het virus in vroeg gerooide knollen direct na het rooien aan te tonen is blijkaar alleen een kwestie van virusconcentratie. In dit opzicht zullen de knollen van vroeg in het groeiseizoen besmette aardappelplanten te vergelijken zijn met knollen van secundair zieke planten.

Bij primaire besmetting van de plant wordt het Y^N -virus eerst naar het topeinde en daarna naar het naveleinde der knol getransporteerd (Tabel 27). Dit kan betekenen, dat bij primaire besmetting het virus niet in alle delen van de knol in gelijke concentratie voorkomt (BEEMSTER, 1958).

Nadat de toevoer van het virus uit het loof, hetzij door vroegrooien of door afsterven van het loof is gestaakt, wordt de aantoonbaarheid van het virus door middel van toetsblad tot nul gereduceerd. Op dat ogenblik wordt als het ware een virus-inactiverende werking in de knol merkbaar. Een virusvermeerdering is op dit moment niet aantoonbaar. Dat deze wel aanwezig kan zijn, blijkt uit de proef, genoemd in 6.4.2. In deze proef werden knollen met Y^N -virus geïnoculeerd door virusbevattend sap op het aangesneden naveleind van de knol in te smeren. De nateelt van deze knollen leverde 50% besmette planten op. Voor het planten kon het virus in de knol niet worden aangetoond, maar het verkregen resultaat wijst erop, dat er in de knol virusvermeerdering heeft plaats kunnen hebben.

Na een rigoureuze behandeling met rindite of een verwonding, die leidt tot stimulering van de fysiologische activiteiten van de knol, kon wel virus in de knol worden aangetoond (Tabellen 23, 24, 25, 26). De vraag is nu op welke wijze de verhoogde virusactiviteit tot stand is gekomen. Hiervoor kunnen twee mogelijkheden nader worden bekeken. 1. Het virus wordt na het rooien der knollen blijvend geïnactiveerd. Slechts enkele virusdeeltjes blijven over, die na het verbreken van de kiemrust worden vermeerderd. 2. De virusdeeltjes in de knol worden na het rooien tijdelijk geïnactiveerd, bij het toenemen van de fysiologische activiteit der knol worden ze weer infectieus.

De resultaten van Tabel 26 pleiten voor de eerste mogelijkheid. Direct na het rooien kon in knollen geen virus worden aangetoond. Na behandeling met rindite was dit wel mogelijk. Dit wijst op virusvermeerdering. Deze is echter niet zo sterk, dat vier weken na het verbreken van de kiemrust in alle knollen uit de proef het virus kon worden aangetoond, hoewel alle knollen besmet waren. Op dat moment was dit slechts mogelijk in die knollen die een daartoe voldoende tijd na de inoculatie waren gerooid. Na het verwonden der knollen kan eveneens een verhoogde activiteit van het virus in het wondvlak worden aangetoond. Het ligt voor de hand te veronderstellen, dat in de nabijheid van het wondvlak virusvermeerdering plaats heeft. Na het verwonden wordt nl. een nieuwe kurklaag gevormd, gepaard gaand met celdelingen. Het wondvlak heeft een verhoogde ademhaling, die de geprovoceerde versnelling van de fysiologische processen verraadt.

Bovendien kan nog gedacht worden aan de mogelijkheid, dat virus via het aangrenzende weefsel naar het wondvlak wordt vervoerd. Dit in analogie met resultaten die BRANTS (1961) in proeven met tabaksmozaïekvirus en verwonde tabaksplanten verkreeg.

Dit zou dan echter over betrekkelijk korte afstand moeten plaats hebben, gezien de resultaten in Tabel 27. Immers zeven dagen na het verwonden werden aan navel- en topeinde van dezelfde knol nog verschillende virusconcentraties aangetoond. Dit wijst erop, dat de door de verwonding gestimuleerde vermeerdering althans niet tot een regelmatige verspreiding van het virus door de knol heeft geleid. Wellicht dient men dan ook nog aan te nemen dat er een zekere gerichtheid van het virus, bijv. naar de dichtstbij gelegen ogen bestaat.

Door de onder 2 genoemde veronderstelling zouden de verschillen in virusconcentratie, die aan navel- en topeinde aangetoond werden, ook verklaard kunnen worden. Het virus, dat tijdens de vegetatieperiode in verschillende hoeveelheden over de delen van de knol werd gedistribueerd, zou dan later weer in de oorspronkelijke hoeveelheid aangetoond kunnen worden. De eerst genoemde veronderstelling komt ons echter aannemelijker voor.

Samenvattend kan worden gezegd, dat het Y^N-virus in knollen die in kiemrust verkeren, niet en in knollen die op natuurlijke wijze spruiten slechts in een gering aantal gevallen kan worden aangetoond. Bij bepaalde ingrepen, zoals een behandeling met rindite of verwonding, wordt waarschijnlijk de virusvermeerdering gestimuleerd door een verhoging van de fysiologische activiteit. Als de knol partiëel besmet is, m.a.w. als het virus slechts zeer plaatselijk aanwezig is, zal de kans klein zijn dat het virus met de aangesneden knol op het toetsblad wordt geïntroduceerd. In welke vorm het virus in niet-infectieuze toestand in de knol voorkomt is niet bekend. ARENZ & VULIČ (1961) hebben verondersteld dat van het Y-virus in de knol alleen het ribonucleïnezuurdeel voor zou komen.

In de spruiten van besmette knollen kan meestal een hoge virusactiviteit worden vastgesteld. Dit zou in verband kunnen staan met de groei van de spruit.

SAMENVATTING

1. Onderzoekingen werden verricht om na te gaan in hoeverre het „nieuwe” Y-virus (aangeduid als het Y^N-virus) in besmette aardappelplanten in verschillende stadia van ontwikkeling door middel van toetsplanten 'A6' en Sdy kan worden aangetoond.
2. Het Y^N-virus wordt als een stam beschouwd van het reeds bekende Y-virus (aangeduid als Y^O-virus) en van het aardappelstippelstreepvirus (aangeduid als Y^C-virus).
3. De verdunningsgrens van het Y^N-virus blijkt te liggen bij 10⁻³ tot 10⁻⁴. De inactiveringstemperatuur blijkt voor het virus in sap van tabaksbladeren 60°C, in sap van aardappelbladeren 57°C te bedragen. Bij kamertemperatuur kan het Y^N-virus 22 tot 28 dagen in sap worden bewaard.
4. De lengte der deeltjes van het Y^N-virus is gelijk aan die van het Y^O-virus. Evenals BRANDES (1964) voor het „Tabakrippenbräune-Virus” vonden wij voor het Y^N-virus een gemiddelde lengte van circa 730 mμ.
5. Het infectievermogen van Y^N-virus loopt sterk terug als het in blad of bladsap bij temperaturen beneden 0°C wordt bewaard. In sap van besmette tabaksbladeren bewaard bij - 20°C kan na 12 maanden nog virus worden aangetoond. De infectiositeit is dan echter zeer gering.
6. Het droogvriezen van Y^N-virusbevattend blad heeft een gunstiger effect op het infectievermogen dan het drogen door middel van calciumchloride. Door de eerstgenoemde methode kan de infectiositeit van het virus gedurende tenminste 230 dagen op een vrij constant, zij het laag, niveau gehandhaafd blijven.
7. De vatbaarheid van het blad van 'A6' voor Y^N-virus wordt verminderd als de planten onder korte dag omstandigheden worden gekweekt. Voor blad van Sdy-planten is dit niet het geval. Sdy-planten groeien niet bij een lage lichtintensiteit.
8. De vatbaarheid van 'A6'- en Sdy-blad voor Y^N-virus wordt verhoogd als de planten een volledige minerale bemesting met N, P en K toegediend krijgen. Voor 'A6'-planten geldt, dat ook enige weken na een N-bemesting de vatbaarheid van het blad voor Y^N-virus wordt verhoogd.
9. Het verschijnen der lokale vlekken op afgeplukte 'A6'-blaadjes na inoculatie met Y^N-virus vindt optimaal plaats bij een continue belichting van ongeveer 1500 Lux of een dagelijkse belichting van 16 uur met een lichtintensiteit van ongeveer 2000 Lux; de bewaartemperatuur dient in beide gevallen 24 tot 25°C te zijn. Voor afgeplukte Sdy-blaadjes zijn deze omstandigheden: een continue belichting van ongeveer 500 Lux of een dagelijkse belichting van 8 uur met een intensiteit van 1000 Lux en een bewaartemperatuur van 18 tot 20°C.
10. Op grond van de aard van de lokale vlekken, die na inoculatie met verschillende virussen op 'A6'- en Sdy-blad ontstaan, kan men de identiteit van het virus niet met zekerheid vaststellen.

11. Het toetsen op aanwezigheid van Y^N-virus in primair besmette aardappelplanten leidt tengevolge van een te lage virusconcentratie dikwijls tot negatieve resultaten.

12. In tegenstelling tot de resultaten van NIENHAUS (1962) wordt in de spruiten van besmette knollen een grotere virusactiviteit waargenomen dan in de knollen zelf.

13. Belichting van de spruiten, groeiend uit knollen van primair besmette planten, leidt tot een verhoging van de virusconcentratie in de spruiten.

14. Het is waarschijnlijk, dat na het verbreken van de kiemrust van besmette knollen in bepaalde delen van de knol (bijv. het floëem) virusvermeerdering plaats heeft.

SUMMARY¹

DETECTION OF POTATO VIRUS Y^N BY MEANS OF TEST PLANTS

Introduction

Investigations were conducted to determine some of the physical and biological properties of a new strain of virus Y, which is called virus Y^N.

Different methods of preservation of the virus in vitro and conditions affecting local lesion formation on detached leaves of test plants *Solanum demissum* hybrid (*S. demissum* x *S. tuberosum* var. 'Aquila') called 'A6' (KÖHLER, 1953) and *Solanum demissum* 'Y' called Sdy (COCKERHAM, 1958) were studied.

The susceptibility of these plants to other viruses was also tested. In addition, potato plants at different stages of development were diagnosed for the presence of virus Y^N using the host 'A6'.

1. Some properties of potato virus Y^N

The nomenclature of potato virus Y is confused. Different names have been used for viruses belonging to the groups of virus Y. BARTELS (1964) divided the strains of virus Y into three groups viz. common, necrotic and anomal strains. The groups were made on the basis of serological relationships and symptoms on host plants. In his classification BARTELS does not mention the strains of potato stipple streak virus although this virus belongs to the potato virus Y group (ROZENDAAL, 1954). Therefore the suggestion is made to divide strains of potato virus Y into three groups viz. Y^O (common strains), Y^N (tobacco veinal necrosis strains) and Y^C (potato stipple streak strains) respectively.

We found the normal length of particles of the viruses Y^O and Y^N to be equal to that of particles of „Tabakrippenbräune-Virus“ viz. about 730 m μ (BRANDES, 1964). Potato virus Y^N was still infective in expressed tobacco sap and in sap of leaves of potato plants kept at room temperature (20°C) after 22 days, but not after 28 days (Table 1).

2. Preservation of virus Y^N in vitro

Detached leaves of 'A6' and Sdy were inoculated and incubated on moist filter paper in glass plate covered trays. Leaves to be inoculated were dusted with silicon carbide (Carborundum) grid number 500, using a powder insufflator. The virus containing sap was applied to the leaf surface of test plants with the forefinger or with plastic sponges.

As pointed out by KLECZKOWSKI (1955) lesion counts obtained with plant viruses may not be normally distributed and the standard errors usually depend on the magnitude of the lesion counts. A suitable transformation of the observed lesion counts is necessary for statistical analysis. In some experiments the results were calculated using the transformation formula of KLECZKOWSKI (1955) i.e. $Z = {}^{10}\log \frac{1}{2} [x + c + \sqrt{(x^2 + 2cx)}]$ in which x is the number of lesions and c a constant; c was taken as 10.

Virus could be detected in sap of infected tobacco leaves up to 12 months after sto-

¹ The author is greatly indebted to Dr R. H. LAWSON, Oregon State University, Corvallis, U.S.A., for correcting the English text.

rage at -20°C . The addition of sodium sulphite (0.2%) to virus-containing diluted sap kept the infectivity in frozen extracts constant for a period of about 65 days (Table 4).

Although the infectivity of the virus was low in potato leaves desiccated over calcium chloride at 4°C , infectious virus could be detected after 22 weeks of storage.

Infected tobacco leaves were freeze-dried by prefreezing the virus containing material for four hours at -30°C and evacuating at $30\ \mu$ of mercury for 48 hours at -10°C . Freeze-dried material stored at -20°C possessed a lower infectivity than fresh material (Table 6).

3. *Solanum demissum* hybrid 'A6' and *Solanum demissum* 'Y' as test plants for virus Y^{N}

'A6' test plants showed necrotic local lesions, 6-14 days after inoculation with virus Y^{N} . Although there was a severe necrotic reaction virus is translocated from the inoculated leaf to the stem. In this case the plant showed a high sensitivity but not a hypersensitivity. The virus was translocated more readily from old leaves than from young ones. This may be explained by the fact that in many cases young leaves of such test plants are immune to virus infection (CHIU & SILL, 1963).

The number of local lesions on leaf discs was not significantly different from local lesion counts on the same area of surface of intact leaves. On fully expanded 'A6' test leaves distribution of local lesions after inoculation was at random (Fig. 1).

Susceptibility of 'A6' and Sdy leaves to virus Y^{N} was correlated with the position of the leaf on the plant. In fully expanded leaves the susceptibility increased to a maximum, then decreased with leaf age. When young plants were used however the lower leaves remained highly susceptible. The incubation period also differed with leaf position and lesions appeared earlier on lower leaves than on upper leaves. In general, the variation in local lesion counts on leaves of 'A6' test plants was considerable. Only a small variation was found between the half leaves of leaflets of a compound leaf (Table 7).

The effect of light on susceptibility of test plants to virus Y^{N} infections was investigated. Under "short day" conditions during the summer months, (high light intensity), the susceptibility of 'A6' leaves decreased. This was not the case for Sdy leaves (Table 8).

Leaves of shaded 'A6' plants were more susceptible to virus Y^{N} than those of unshaded plants (Table 9).

The application of fertilizer to Sdy plants had little effect on susceptibility of the leaves to virus Y^{N} infection (Table 10). Susceptibility of 'A6' leaves was increased if plants were given N alone or NPK together (Table 11). However, leaves of 'A6' plants do not produce many local lesions if inoculated one week after the application of N fertilizer. Apparently such leaves react to inoculation as newly unfolded top leaves normally do. Data presented in table 11 indicate that leaves of young shoots are more susceptible to virus infection than leaves of the main stem.

In general leaves from plants which were fertilized with a complete NPK fertilizer were highly susceptible.

4. The "leaf test"

In most trials inoculated parts of one test leaf were used in order to reduce variation in leaf susceptibility. No local lesions were produced if storage temperature of

inoculated 'A6' leaves was higher than 30°C. A light intensity of 4000 Lux (provided by fluorescent tubes Philips/33) decreased the number of local lesions in comparison with lower light intensities.

Fig. 2 shows that local lesions on inoculated 'A6' leaves kept under a light intensity of 2000 Lux appeared earlier and in greater abundance than on leaves stored under lower light intensities.

No important differences in local lesion formation were observed between a daily illumination of 24 and 16 hours when the light intensity was 1875 Lux. An illumination of only 8 hours a day was unfavourable (Table 12).

The effect of temperature on lesion formation was more obvious than the effect of light. Inoculated leaves were stored at 14, 18, 20, 22, 26 and 28°C, respectively and at a constant light intensity of 1250 Lux. Fig. 3 shows that the optimal incubation temperature for virus Y^N infection was 24-25°C. Temperature also affected the size of local lesions. After storage at a temperature of 24°C the average diameter of lesions was larger than those on leaves stored at 20°C.

Lesions appeared on 'A6' leaves inoculated with Y^O at temperatures between 14 and 28°C. On leaves stored at 26-28°C lesions appeared two days after inoculation (Fig. 3).

Inoculated Sdy leaves were kept at a constant temperature ($\pm 24^\circ\text{C}$) and light intensities of 500, 1000, 2000 and 4000 Lux, respectively. Local lesion counts were high on leaves stored at a low light intensity (500 Lux). The difference between local lesion formation at a light intensity of 500 and 1000 Lux was small (Fig. 4). This conclusion also could be drawn from the results of experiments with an illumination of 8 to 16 hours a day on inoculated Sdy leaves (Table 14). On leaves stored at constant temperatures between 14 and 30°C and a constant light intensity of 500 Lux, the highest numbers of lesions appeared at temperatures below 20°C (Table 15).

5. *Solanum demissum* hybrid 'A6' and *Solanum demissum* 'Y' as test plants for other viruses

Leaves of 'A6' produced local lesions after inoculation with several viruses (Table 16, Fig. 6 and 8). 'A6' leaves showed no lesions after inoculation with potato viruses M and S. Sdy leaves showed lesions after inoculation with potato viruses Y^O, Y^N and Y^C (Fig. 7). 'A6' leaves inoculated with strains of potato virus A produced lesions after 3-4 days if stored at a temperature of 20°C (Fig. 3). For the strains of virus Y^C optimal temperature for local lesion formation was 24-26°C (Fig. 3).

Of the four mentioned strains of virus Y^C only the strains denoted as 'Zeeuwse Blauwe' and 'Gelderse Rode' could be easily detected by means of detached Sdy leaves. There was no difference in lesion formation on leaves stored between 20 and 24°C.

6. Testing for the presence of virus Y^N by means of detached 'A6' leaves

In leaves and parts of stems of secondarily infected plants of different potato varieties virus Y^N was detected with a very high reliability (Table 17). Contrary to NIENHAUS's results (1961/1962 b) no differences in inhibitor concentration were found in the leaves of different potato varieties. Therefore it was concluded that the concentration of virus Y^N is related to the potato variety: or in other words related to virus resistance of the variety (Table 18).

In tubers of secondarily infected plants virus Y^N can be reliably detected directly after early harvesting using cut tubers as inoculum (Table 19). Later in the season the reliability of virus detection in the tubers decreased (Table 19). As the leaves begin to

yellow and die the virus activity in the tubers rapidly decreases. In dormant tubers it is not possible to detect virus Y^N by inoculation of test leaves. Breaking dormancy by means of Rindite (DENNY, 1945) or wounding the tubers (Tables 20 and 21) enhanced virus activity in the tubers. No effect of light intensity upon virus activity in the tubers could be measured. In the range 20-24-30°C, tubers kept at 20°C showed the highest virus activity.

The crushed sprouts from tubers in which the dormancy was artificially broken were tested for the presence of virus Y^N (Table 22). Virus activity in the sprouts was higher than that in the tubers.

In leaves and parts of stems of primarily infected potato plants detection of virus Y^N is not possible shortly after infection. In an experiment with variety 'Bintje', inoculated 11 weeks after planting virus could be detected in inoculated leaves of all plants tested and in the top leaves of 25% of the plants tested 14 days after inoculation. VULIČ (1963) found the same results in experiments with younger plants. NIENHAUS (1961/1962a) obtained exceptional data, for he was able to detect virus Y^N by means of 'A6' in leaves of five weeks old potato plants tested two days after inoculation.

In young tubers of primarily infected plants virus Y^N can be detected shortly after harvesting if the period between inoculation and lifting was sufficiently long. This means the diagnosis of the virus depends on the virus concentration in the tuber (DE BOKX, 1961b). In tubers from old plants or in tubers stored a long period after harvesting the virus can not reliably be detected. In this case better results can be obtained by breaking dormancy (Table 24) or wounding the tubers (Table 26). In all cases the virus activity was higher in the sprouts of tubers than in the tubers themselves when dormancy was artificially broken. In tubers and sprouts the virus activity was increased by a storage temperature of 20°C (Table 29).

Sometimes illumination of sprouts of infected tubers enhanced the virus activity. Sprouts of tubers of two varieties ('Climax' and 'Doré'), which are very susceptible to virus Y^N did not show a higher virus activity as a result of supplemental illumination. This can mean that the effect of illumination is detectable only if virus concentration in the tubers is initially low.

By means of wounding tubers, viz. cutting twice rose and heel end of the tuber, information was obtained on the localization of virus Y^N in the tuber (Table 27). From the data in this table it is clear that at first the virus is translocated to the top end of the tuber. But virus concentration is equal at the heel and rose end 15 days after inoculation.

In a very small percentage of sprouted tubers which were cut at the heel end and inoculated with virus Y^N , virus could be detected after some weeks. However, the virus was detected in a higher percentage of plants grown from these tubers. Consequently, it was concluded that the virus was translocated in the tuber. But during the period of storage, virus activity did not measurably increase in the tubers. Also an increase of virus activity could not be noted during storage in infected tubers from plants inoculated with virus Y^N .

The increase of virus activity in early harvested infected tubers where dormancy is broken, indicates a virus multiplication in the tuber. It is hypothesized that this virus multiplication occurs in a special tissue of the tuber (phloem) only. In tubers of primarily infected plants the virus is not distributed equally through the tuber. Translocation of virus is not measurable during dormancy (BEEMSTER, 1958). Thus in cases where only a few virus particles have invaded the tuber it is not possible to detect virus using the test method described.

LITERATUUR

- ALLINGTON, W. B. & E. F. LAIRD, - 1954. The infection of *Nicotiana glutinosa* with tobacco mosaic virus as affected by potassium nutrition.
Phytopathology 44: 297-299.
- ARENZ, B. & W. HUNNIUS, - 1959. Der Einfusz verschiedener Virusarten auf die Ertragsbildung bei der Kartoffel.
Bayer. landw. Jb. 36: 163-173.
- ARENZ, B. & W. HUNNIUS, - 1961. Weitere Untersuchungen über die Sortenresistenz gegen verschiedene Y-Virus-Stammgruppen.
Züchter 31: 281-287.
- ARENZ, B. & M. VULIČ, - 1961. Ueber die Erfassung von Y- und A-Virus durch direkte Knollenabreibung auf 'A6'.
Bayer. landw. Jb. 38: 444-467.
- AUBERT, O., - 1959. Note préliminaire sur deux souches peu virulentes du virus de la nécrose des nervures du tabac.
Phytopath. Z. 35: 429-432.
- BARTELS, R., - 1958. Serologische Differenzierungsversuche mit Stämmen des Kartoffel-Y-Virus.
Proc. third Conf. Potato Virus Dis., Lisse-Wageningen, 1957: 13-19.
- BARTELS, R., - 1964. Untersuchungen über serologische Beziehungen zwischen Viren der 'tobacco-etch-Virus Gruppe'.
Phytopath. Z. 49: 257-265.
- BAUMANN, G., - 1961. Ein Schalentest für den Nachweis von Steinnobstvirosen auf krautigen Pflanzen.
Mitt. biol. Bundesanst. Berlin-Dahlem. Heft 104: 21-24.
- BAWDEN, F. C., - 1936. The viruses causing top-necrosis (acronecrosis) of the potato.
Ann. appl. Biol. 23: 487-497.
- BAWDEN, F. C. & B. KASSANIS, - 1950. Some effects of host nutrition on the susceptibility of plants to infection by certain viruses.
Ann. appl. Biol. 37: 46-57.
- BAWDEN, F. C. & B. KASSANIS, - 1951. Serologically related strains of potato virus Y that are not mutually antagonistic in plants.
Ann. appl. Biol. 38: 402-410.
- BAWDEN, F. C. & N. W. PIRIE, - 1945. Further studies on the purification and properties of a virus causing tobacco necrosis.
Brit. J. exp. Path. 26: 277-285.
- BAWDEN, F. C. & F. M. ROBERTS, - 1947. The influence of light intensity on the susceptibility of plants to certain viruses.
Ann. appl. Biol. 34: 286-296.
- BEEMSTER, A. B. R., - 1958. Transport van X-virus in de aardappel (*Solanum tuberosum* L.) bij primaire infectie.
T.Pl.-ziekten 64: 165-262.
- BEST, R. J. & H. P. C. GALLUS, - 1953. Preservation of the virus of tomato spotted wilt in dried plant material.
Nature 172: 315.
- BODE, O., - 1959 a. Untersuchungen über das Y-Virus der Kartoffel (Tabak-Rippenbräune-Stämme).
Mitt. biol. Bundesanst. Berlin-Dahlem, Heft 97: 52-60.
- BODE, O., - 1959 b. Recherches sur le virus de la maladie des cotes brunes du tabac.
Actes du 2e Congr. Sci. Internat. du Tabac, Bruxelles 1958, 93-96.
- BODE, O. & H. L. PAUL, - 1956. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffelviren. III Vermessungen an Teilchen des Kartoffel-Y-Virus.
Phytopath. Z. 27: 107-112.
- BODE, O. & J. VÖLK, - 1957. Beobachtungen über einen neuen Stamm des Kartoffel-Y-Virus.
Kartoffelbau 8: 140-141.
- BOKX, J. A. DE, - 1961 a. Waardplanten van het aardappel-YN-virus.
T. Pl.-ziekten 67: 273-277.
- BOKX, J. A. DE, - 1961 b. Het toetsen van aardappelknollen op de aanwezigheid van YN-virus.
T. Pl.-ziekten 67: 333-342.
- BOKX, J. A. DE & J. HIDDEMA, - 1961. De bladtoets ter onderkenning van het „nieuwe" Y-virus.
Meded. N. A. K. 18: 152-155.

- BOKX, J. A. DE, - 1962. Het effect van verwonding van aardappelknollen op de activiteit van YN-virus.
T. Pl.-ziekten 68: 136-142.
- BORGES, M. DE L. V., - 1963. Potato virus Y in Portugal.
Conf. Europ. Assoc. Potato Res., Pisa 1963 (stencil).
- BOS, L., D. J. HAGEDORN & L. QUANTZ, - 1960. Suggested procedures for international identification of legume viruses.
T. Pl.-ziekten 66: 328-343.
- BOVEY, R., - 1955. Note sur un virus nécrotique du tabac, observé en Suisse en 1954 et 1955.
Compt. Rend. 1er Congr. Sci. Internat. Tabac, Paris: 602.
- BRANDES, J., - 1957. Eine elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis faden- und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen.
Nachr. Bl. dtsh. Pfl. Sch. Dienst (Braunschweig) 9: 151-152.
- BRANDES, J., - 1964. Identifizierung von gestreckten pflanzenpathogenen Viren auf morphologischer Grundlage. Zugleich eine Zusammenstellung von grundlegenden Daten für die Klassifizierung dieser Viren.
Mitt. biol. Bundesanst. Berlin-Dahlem. Heft 110: 5-130.
- BRANDES, J. & H. L. PAUL, - 1957. Das Elektronenmikroskop als Hilfsmittel bei der Diagnose pflanzlicher Virosen.
Betrachtungen zur Vermessung faden- und stäbchenförmiger Virusteilchen.
Arch. Mikrobiol. 26: 358-368.
- BRANTS, D. H., - 1961. The influence of meristematic tissue and injuries on the transport of tobacco mosaic virus in *Nicotiana tabacum* L. cultivar. Samsun.
Acta Botan. Neerl. 10: 113-163.
- BURNETT, G. & L. K. JONES, - 1931. The effect of certain potato and tobacco viruses on tomato plants.
Wash. Exp. Sta. Bull. 259.
- CHIU, R. J. & W. H. SILL, - 1963. Factors affecting assay of bromegrass mosaic virus on *Datura stramonium* and *Chenopodium hybridum*.
Phytopathology 53: 69-78.
- COCHRAN, W. G. & G. M. COX, - 1953. Experimental designs.
- COCKERHAM, G., - 1958. Experimental breeding in relation to virus resistance.
Proc. third Conf. Potato Virus Dis., Wageningen - Lisse, 1957: 199-203.
- DARBY, J. F., R. H. LARSON & J. C. WALKER, - 1951. Variation in virulence & properties of potato virus Y strains.
Res. Bull. Univ. Wisc. 177.
- DENNY, F. E., - 1945. Synergistic effects of three chemicals in the treatment of dormant potato tubers to hasten germination.
Contrib. Boyce Thompson Inst. 14: 1-14.
- DYKSTRA, T. P., - 1939. A study of viruses infecting European and American varieties of the potato, *Solanum tuberosum*.
Phytopathology 29: 40-67.
- DYKSTRA, T. P. & H. G. DU BUY, - 1942. Preserving plant viruses in vitro by means of a simplified lyophile apparatus.
Science 96: 189-190.
- ENDEMANN, W., - 1955. Probleme der Resistenz - Züchtung bei Tabak.
Ber. Inst. Tabakforsch. Dresden 57-76.
- FAJARDO, T. G., - 1930. Studies on the mosaic disease of the bean (*Phaseolus vulgaris* L.)
Phytopathology 20: 469-494.
- FINLAY, K. W. & C. A. PARKER, - 1954. The preservation of tomato spotted wilt virus by vacuum drying.
J. Austr. Inst. agr. Sci. 20: 112-114.
- FOLSOM, D. & R. BONDE, - 1937. Some properties of potato rugose mosaic and its components.
J. agr. Res. 55: 765-783.
- HANSEN, H. P., - 1960. Tobacco mosaic virus carried in potato tubers.
Amer. Potato J. 37: 95-101.
- HIDAKA, Z. & K. TOMARU, - 1960. Vacuum freeze-drying of tobacco leaf tissues infected with cucumber mosaic virus.
Virology 12: 8-13.
- HILLE RIS LAMBERS, D., - 1960. Bladluizen en Y-virus.
Meded. N.A.K. 16: 105-107.

- HOLLINGS, M. & R. A. LELLIOT, - 1960. Preservation of some viruses by freeze-drying.
Pl. Path. 9: 63-66.
- HOLLINGS, M. & O. M. STONE, - 1962. The relative sensitivity of different methods of detecting viruses.
Ann. Rep. 1961, Glasshouse Crops Res. Inst. Littlehampton, p. 76.
- HOYMAN, W. G., - 1951. A method of indexing potatoes for virus X by use of petiole or tuber juice.
Amer. Potato J. 28: 713-721.
- JOHNSON, J., - 1925. Transmission of viruses from apparently healthy potatoes.
Wisc. agric. Exp. Sta. Res. Bull. 63.
- JONGE, H. DE, - 1958. Inleiding tot de medische statistiek, dl. I. Leiden 1958, 249-254.
- KASSANIS, B., - 1952. Some effects of high temperature on the susceptibility of plants to infection with viruses.
Ann. appl. Biol. 39: 358-369.
- KASSANIS, B., - 1954. Heat therapy of virus-infected plants.
Ann. appl. Biol. 41: 470-474.
- KLECZKOWSKI, A., - 1955. The statistical analysis of plant virus assays: a transformation to include lesion numbers with small means.
J. gen. Microbiol. 13: 91-98.
- KLINKOWSKI, M. & K. SCHMELZER, - 1957. Beiträge zur Kenntnis des Virus der Tabak-Rippenbräune.
Phytopath. Z. 28: 285-306.
- KLINKOWSKI, M. & K. SCHMELZER, - 1960. A necrotic type of potato virus Y.
Amer. Potato J. 37: 221-229.
- KOCH, K. L. & J. JOHNSON, - 1935. A comparison of certain foreign and American potato viruses.
Ann. appl. Biol. 22: 37-54.
- KÖHLER, E., - 1940. Weitere Studien über die Vira der Y-Gruppe.
Phytopath. Z. 12: 480-489.
- KÖHLER, E., - 1953. Der Solanum demissum — Bastard 'A6' als Testpflanze verschiedener Mosaikviren.
Züchter 23: 173-176.
- KÖHLER, E., - 1955. Weitere Beiträge zur Kenntnis des Y-virus der Kartoffel.
Phytopath. Z. 23: 328-334.
- LAL, S. B. & W. H. SILL, - 1958. Stability of wheat streak mosaic virus in desiccated tissue.
Plant Dis. Repr. 42: 226-229.
- MANZER, F. E. & D. MERRIAM, - 1961. Field transmission of the potato spindle tuber virus and virus X by cultivating and hilling equipment.
Amer. Potato J. 38: 346-352.
- MATTHEWS, R. E. F., - 1953. Factors affecting the production of local lesions by plant viruses. II Some effects of light, darkness and temperature.
Ann. appl. Biol. 40: 556-565.
- McKINNEY, H. H., - 1947. Stability of labile viruses in desiccated tissue.
Phytopathology 37: 139-142.
- NIENHAUS, F., - 1957. Untersuchungen über den Einfluss von Temperatur und Licht auf die Empfänglichkeit der Pflanzen für das Kartoffel-Y-Virus.
Phytopath. Z. 30: 189-224.
- NIENHAUS, F., - 1960. Test der Mosaikviren Y, X und A unmittelbar von der Kartoffelknolle.
Naturwissenschaften 47: 164.
- NIENHAUS, F., - 1961/1962 a. Beobachtungen über das Kartoffel-Y-Virus in der Kartoffelpflanze unter besonderer Berücksichtigung der Knolle.
I. Die Ansiedlung, Aktivität und Ausbreitung des Y-Virus.
Phytopath. Z. 43: 1-36.
- NIENHAUS, F., - 1961/1962 b. Beobachtungen über das Kartoffel-Y-Virus in der Kartoffelpflanze unter besonderer Berücksichtigung der Knolle.
II. Virushemstoffe in der Kartoffelpflanze.
Phytopath. Z. 43: 183-204.
- NIENHAUS, F., - 1961/1962 c. Beobachtungen über das Kartoffel-Y-Virus in der Kartoffelpflanze unter besonderer Berücksichtigung der Knolle.
III. Ein Nachweisverfahren des Y-Virus in der Kartoffelknolle für Serienuntersuchungen in der Praxis.
Phytopath. Z. 43: 248-256.

- NIENHAUS, F., - 1962. Ergänzungen zum Nachweisverfahren des Y-Virus in der Kartoffelknolle.
Europ. Potato J. 5: 280-289.
- PANZER, J. D., - 1957. The effect of mineral salts on local lesion formation by *Phaseolus vulgaris* inoculated with tobacco mosaic virus.
Phytopathology 47: 748-751.
- POUND, G. S., - 1952. Relation of air temperature and virus concentration to mosaic resistance in cabbage.
Phytopathology 42: 83-88.
- POUND, G. S. & P. C. CHEO, - 1952. Studies on resistance to cucumber virus 1 in spinach.
Phytopathology 42: 301-306.
- PROCHAL, P., - 1953. The distribution of virus X in potato tubers.
Polskie Towarz. Bot. Acta Agrobot. 1: 33-77.
- QUANTZ, L., - 1957. Ein Schalentest zum Schnellnachweis des gewöhnlichen Bohnenmosaikvirus (*Phaseolus Virus 1*).
Nachr. Bl. dtsh. Pfl.Sch.Dienst (Braunschweig) 9: 71-74.
- ROSS, A. F., - 1953. *Physalis floridana* as a local lesion test plant for potato virus Y.
Phytopathology 43: 1-8.
- ROZENDAAL, A., - 1954. De betekenis van verschillende virusgroepen voor de teelt van pootgoed.
Landbouvoorlichting 11: 299-308.
- ROZENDAAL, A., - 1963. Virusziekten bij pootaardappelen en de op grond hiervan te nemen keuringsmaatregelen II.
Meded. N.A.K. 20: 22-28.
- SAMUEL, G., - 1934. The movement of tobacco mosaic virus within the plant.
Ann. appl. Biol. 21: 90-111.
- SCHEPERS, A., - 1964. Contact-infectie bij YN-virus.
Meded. N.A.K. 20: 87.
- SCHMELZER, K., R. BARTELS & M. KLINKOWSKI, - 1960. Interferenzen zwischen der Viren der Tabakätzmosaik-Gruppe.
Phytopath. Z. 40: 52-74.
- SMITH, K. M. & R. W. G. DENNIS, - 1940. Some notes on a suspected variant of *Solanum virus 2* (potato virus Y).
Ann. appl. Biol. 27: 65-70.
- SMITH, K. M., - 1957. A textbook of plant virus diseases.
p. 392.
- SOLYMOSSY, F., G. L. FARKAS & Z. KIRALY, - 1959. Biochemical mechanism of lesion formation in virus-infected plant tissues.
Nature 184: 706-707.
- STAPP, C. & R. BARTELS, - 1950. Der serologische Nachweis des X-Virus in Dunkelkeimen der Kartoffelknolle.
Züchter 20: 42-47.
- THOMSON, A. D., - 1956. Heat treatment and tissue culture as a means of freeing potatoes from virus Y.
Nature 177: 709.
- TIMIAN, R. G. & H. J. KLOSTERMAN, - 1962. Retention of viability in lyophilized barley stripe mosaic virus.
Phytopathology 52: 554-556.
- TODD, J. M., - 1958. Spread of potato virus X over a distance.
Proc. third Conf. Potato Virus Dis., Lisse-Wageningen 1957, 132-143.
- TODD, J. M., - 1961. Tobacco veinal necrosis on potato in Scotland: Control of the outbreak and some characters of the virus.
Proc. fourth Conf. Potato Virus Dis., Braunschweig 1960, 82-93.
- VEKEN, J. A. VAN DER, - 1960. Some applications of freeze-drying in virological research.
T.Pl.-ziekten 66: 1-10.
- VÖLK, J., - 1959. Zur Ueberragung von Tabak-Rippenbräune-Stämmen des Y-Virus auf Tabak und Kartoffel.
Mitt. Biol. Bundesanst. Berlin-Dahlem, Heft 97: 69-71.
- VULIČ, M., - 1963. Konzentrations und Infektionsverhältnisse des Y-Virus in Kartoffelpflanzen bei primärer und sekundärer Infektion und Arbeitstechnik zur serologischen Diagnostizierung in der Beschaffenheitsprüfung an Kartoffelpflanzgut und Zuchtmaterial.
Z. Acker- und Pflanz. bau 117: 155-169.

- VULIĆ, M. & B. ARENZ, - 1963. Die Nachweisbarkeit des Y-Virus in den verschiedenen Pflanzenteilen sekundär infizierter Kartoffelpflanzen (Methodischer Vergleich von Serologie und A6-Test).
Bayer. landw. Jb. 40: 151-159.
- WILTSHIRE, G. H., - 1956. The effect of darkening on the susceptibility of plants to infection of viruses. I Relation to changes in some organic acids in the French bean.
Ann. appl. Biol. 44: 233-248.
- YARWOOD, C. E., - 1957. Mechanical transmission of plant viruses.
Advanc. Virus Res. 4: 243-278.