31-3

LABORATORIUM VOOR PHYTOPATHOLOGIE
WAGENINGEN, NEDERLAND
DIRECTEUR Prof. Dr. A. J. P. OORT

MEDEDELING No. 182

LABORATORIUM VOOR BLOEMBOLLENONDERZOEK
LISSE, NEDERLAND
DIRECTEUR Prof. Dr. Ir. J. P. H. van der Want

MEDEDELING No. 138

SEROLOGISCH ONDERZOEK BIJ FUSARIUM OXYSPORUM

(WITH A SUMMARY)

SEROLOGICAL INVESTIGATIONS IN FUSARIUM OXYSPORUM

door/by

A. TEMPEL

Overdruk uit: Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen 59 (7), 1-60 (1959)

H. VEENMAN & ZONEN N.V. – WAGENINGEN

Overdruk

632.4 : 576.88.097 : 582.288.4

MEDEDELINGEN VAN DE LANDBOUWHOGESCHOOL TE WAGENINGEN, NEDERLAND **59** (7), 1–60 (1959)

SEROLOGISCH ONDERZOEK BIJ FUSARIUM OXYSPORUM

(With a summary)

SEROLOGICAL INVESTIGATIONS IN FUSARIUM OXYSPORUM

door/*by*

A. TEMPEL

Laboratorium voor Phytopathologie te Wageningen, Mededeling No. 182

en

Laboratorium voor Bloembollenonderzoek te Lisse, Publicatie No. 138

(Ontvangen/Received 24.3.'59)

INHOUD

HOOFDSTUK I. Inleiding 2

HOOFDSTUK II. Serologie 4
1. Algemene serologische begrippen 4
2. Serologische verwantschap 5
3. Serologisch onderzoek bij schimmels 6
a. Betekenis 6
b. Serologie bij zoöpathogene schimmels 7
c. Serologie bij fytopathogene schimmels 9
d. Serologische methoden voor het bepalen van resistentie tegen ziekten 10

HOOFDSTUK III. Materiaal 11
1. Schimmels. Verkorte aanduiding 11
2. Konijnen. Aanduiding van de serums 11

HOOFDSTUK IV. Methoden 12
1. Immunisering van de konijnen 12
2. Winnen en bewaren van de antiserums 13
3. Serologische reacties 13
a. De agglutinatie-reactie 13
b. De precipitatie-reactie 14
c. De geldiffusie-methode 14
d. Immuno-elektroforetische onderzoekingen 15
4. Het kweken van de schimmel 17
a. Vliesculturen op Richard-oplossing 17
b. Schudculturen in Czapek-voedingsbodem 18

HOOFDSTUK V. Resultaten van het onderzoek 18
1. Inleidende proef met een fijngemalen vliescultuur 18
2. Immunisatie-methoden 19
a. Verschillende injectie-routes 20
b. Eén of meer injecties per week 20
c. Hoeveelheden cultuurfiltraat per injectie 21
d. Sporensuspensies van verschillende dichtheid 21
e. Toevoeging van hulpstoffen 22

3. Immunisatie met verschillende bestanddelen van de schimmel 23
a. Immunisatie met fijngemalen culturen 23
b. Immunisatie met cultuurfiltraten 23
c. Immunisatie met geconcentreerde cultuurfiltraten 25
d. Immunisatie met sporensuspensies 25
e. Immunisatie met suspensies van fijngemalen mycelium 26
f. Immunisatie met mycelium-extracten 26
g. Vergelijking van de titers van een aantal serums 26
h. Geldiffusie van filtraten en extracten 27
4. Serologische verschillen tussen de *formae speciales* 28
a. Agglutinatie-reacties 28
b. Precipitatie-reacties 28
c. Geldiffusie-reacties 30
5. Aard van de antigenen 34
a. Warmtebehandeling van de antigenen 35
b. Kleurreacties en concentratie van de antigeenoplossingen 38
c. Precipitatie en extractie van de antigenen 38
d. Immuno-elektroforetische onderzoekingen 41
α Cultuurfiltraten 42
β Mycelium-extracten 46
γ Verschillen tussen de antiserums 49
e. Papierchromatografisch onderzoek van polysacchariden uit cultuurfiltraten . . 52

HOOFDSTUK VI. Conclusies en samenvatting 52

Summary 54

Literatuur 58

HOOFDSTUK I

INLEIDING

De ons omringende natuur vertoont een verbijsterende veelheid aan vormen, die de mens sinds de oudste tijden heeft trachten te klassificeren en van namen te voorzien. Naarmate de wetenschap vordert, is het mogelijk kleinere verschillen te ontdekken, subtielere begrippen te definiëren en daarmee de bestaande klassificaties uit te breiden of te doorbreken.

In de botanie, en dus in de mycologie, is het geven van namen aan bepaalde regels onderworpen, die op internationale botanische congressen worden vastgesteld. De criteria voor het bepalen van klasse, orde, familie, geslacht en soort berusten gewoonlijk op de morfologie (BISBY, 1945). Bij het vaststellen van de soort moet men soms daarnaast ook andere criteria laten gelden. Bisby zegt: „A species of fungi is therefore a concept based primarily on morphology, but frequently on the host as well. Sometimes it is possible to apply tests which, so to speak let Nature help to decide; for example, tests of the ability of two fungi to cross, and the use of serological methods.'

Geldt dit al voor de soort, belangrijker wordt dit nog bij de onderverdeling van de soort. De „International code of Botanical nomenclature" van 1956, laat daartoe de mogelijkheid open. In artikel 4 wordt gezegd, dat behalve de gebruikelijke indeling in familie, geslacht, soort, „further supplementary ranks may be intercalated or added, provided that confusion or error is not thereby introduced", en „recommendation 4A" luidt: „In classifying parasites, especially parasitic fungi, authors who do not give specific value to taxa characterized from a physiological standpoint should distinguish within the species

special forms (*formae speciales*) characterized by their adaptation to different hosts".

Binnen parasitaire schimmelsoorten, die in staat zijn een groot aantal plantegeslachten aan te tasten, komen dikwijls verschillen voor tussen stammen wat betreft hun pathogeniteit ten opzichte van verschillende plantegeslachten: dergelijke stammen noemt men dan *formae speciales*; ze worden veelal aangeduid door achter de naam van de soort, waartoe ze behoren een afleiding van de naam van hun waardplant te laten volgen, bijv. *Fusarium oxysporum* f. *lupini*.

Daarnaast kunnen zich binnen eenheden (*species* of *formae speciales*), die een bepaalde plantesoort aantasten, verschillen voordoen wat betreft pathogeniteit ten opzichte van rassen van dezelfde waardplant; het ene individu tast bijv. de rassen *a* en *b* van de waardplant aan, terwijl het andere *b*, *c* en *d* aantast en *a* ongemoeid laat. Men spreekt dan van fysiologische rassen, kortweg fysio's; ze worden aangeduid met een rangnummer, bijv. *F. oxysporum* f. *pisi* ras 1. Voor het onderkennen van dergelijke fysio's is het nodig infectieproeven op een waardplantenreeks uit te voeren. Dergelijke proeven zijn dikwijls vrij bewerkelijk en bovendien is het in stand houden van een genetisch zuivere waardplantenreeks geen eenvoudige zaak. Men kan zich afvragen of in sommige gevallen niet een eenvoudiger, en vooral zekerder, *in vitro* toets mogelijk is om fysio's te onderscheiden. In het hier volgend onderzoek is getracht dit probleem van serologische kant te benaderen. De serologie biedt ons de mogelijkheid om met een betrekkelijk eenvoudige techniek uiterst fijne chemische verschillen aan te tonen, vooropgesteld dat deze fijne verschillen gelegen zijn in serologisch actieve, dus tamelijk grote, moleculen.

Men kan bij een dergelijk onderzoek een groot aantal fysio's, zo mogelijk van verschillende schimmelsoorten, volgens één of enkele eenvoudige serologische methoden onderzoeken; men kan ook, uitgaande van een geringer aantal individuen, een groter aantal methoden toepassen en dieper in de aard van de reacties trachten door te dringen. Aangezien over de antigene structuur van schimmels nog zeer weinig bekend is, werd bij dit onderzoek de laatste werkwijze gevolgd.

Dit onderzoek werd uitgevoerd met een aantal *formae speciales* van *Fusarium oxysporum*. Deze schimmel werd gekozen, omdat hiervan een groot aantal *formae speciales*, en ook fysiologische rassen bekend zijn, terwijl hij bovendien gemakkelijk op een synthetische voedingsbodem te kweken is, wat het serologisch onderzoek vereenvoudigt.

Serologische methoden vereisen een speciale techniek en dit onderzoek, dat op instigatie en onder leiding van Prof. Dr. A. J. P. OORT werd uitgevoerd, vond dan ook plaats op een voor dit doel gespecialiseerd laboratorium, nl. de serologische afdeling van het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek (onder de toenmalige leiding van Prof. Dr. E. VAN SLOGTEREN). Een aantal serologische begrippen en methoden worden, voorzover ze betrekking hebben op dit onderzoek, in de Hoofdstukken II en IV in het kort behandeld.

Immunisatie van konijnen met diverse preparaten van de schimmel leidde spoedig tot het inzicht, dat de antigene structuur van de schimmel tamelijk complex is. Om hierin enig inzicht te krijgen werd overgegaan tot toepassing van de geldiffusiemethode en de methode der immuno-elektroforese. Een beurs van de Franse Regering maakte het mogelijk de laatste methode op het Laboratorium van zijn ontwerper, Prof. Dr. P. GRABAR, van het Institut Pasteur, te bestuderen.

HOOFDSTUK II

SEROLOGIE

1. Algemene serologische begrippen

Serologie is afgeleid van *serum*, dat is de gelige vloeistof, die overblijft nadat uit gestold bloed de bloedlichaampjes en de fibrine zijn verwijderd. In dit serum bevinden zich gewoonlijk *antistoffen* of *antilichamen*, die door een dierlijk organisme gevormd kunnen worden als „vreemde" stoffen, d.w.z. stoffen, die niet afkomstig zijn uit eigen weefsels in de bloedbaan terecht komen. Dit kan dus gebeuren als reactie op een infectie, maar het mechanisme van de reactie treedt ook in werking tegen op zichzelf onschadelijke, hoogmoleculaire stoffen; in beide gevallen spreekt men van een geïmmuniseerd dier.

Alle stoffen, die de vorming van antistoffen kunnen veroorzaken heten *antigenen*. Ze hebben in het algemeen een moleculair gewicht van 10.000 of hoger. Eiwitten zijn goede antigenen. Ook tegen polysacchariden kunnen antistoffen gevormd worden, vooral als deze aan eiwitten zijn gebonden. Konijnen produceren tegen zuivere polysacchariden geen antistoffen, de mens daarentegen wel (Heidelberger, 1956). Lipoiden in zuivere vorm zijn, voorzover bekend, niet antigeen, in combinatie met polysacchariden of proteïnen kunnen ze goede antigene eigenschappen hebben, zoals de zogenaamde Boivin-antigenen: de endotoxinen van gramnegatieve bacteriën, die lipo-polysacchariden zijn.

Met het begrip antigeen worden ook alle stoffen aangeduid, die *in vitro* een zichtbare reactie geven met antistoffen, ook al kunnen ze de antistofproductie zelf niet op gang brengen. In dit geval gebruikt men ook wel het begrip *hapteen*. Het begrip *antigeniteit* (Engels: *antigenicity*) en het bijvoegelijk naamwoord *antigeen* (Engels: *antigenic*) worden alleen gebruikt in verband met stoffen, die de antistofproductie wel op gang kunnen brengen. Antigenen, die gebruikt worden voor de reacties *in vitro* noemt men *toetsantigenen*, onafhankelijk van hun verdere eigenschappen.

Een serum, dat antistoffen tegen een bepaald antigeen bevat wordt een *antiserum* of *immuunserum* genoemd. *Normaal serum* met betrekking tot een bepaald antigeen, is serum, dat geen antistoffen tegen dat antigeen bevat.

Antistoffen bezitten per definitie de eigenschap, dat ze zich met de antigenen, waartegen ze gevormd zijn, kunnen verbinden. Deze reactie is *specifiek*, d.w.z. antistoffen tegen een stof *a* reageren alleen met dit antigeen en niet met een stof *b*. De reactie kan ook buiten het dierlijk organisme plaats vinden en zich *in vitro* op een of andere waarneembare wijze manifesteren (agglutinatie, precipitatie, lysis). Dit feit, gecombineerd met genoemde specificiteit maakt het mogelijk om hoogmoleculaire stoffen op betrekkelijk eenvoudige wijze, zonder ingewikkelde chemische analyses, te herkennen. Dit heeft ertoe geleid serologische methoden ook buiten de medische wetenschap toe te passen, namelijk in de eiwitchemie en de virologie (van Slogteren & van Slogteren, 1957). In de bacteriologie en de mycologie kan de serologie hulp bieden bij het herkennen van bepaalde soorten (diagnostiek) en bij het onderverdelen van morfologische eenheden in een aantal serologische typen (systematiek).

Reacties tussen antistoffen en de antigenen waartegen deze antistoffen gevormd zijn, heten *homologe reacties*. Reacties tussen antistoffen en antigenen of mengsels antigenen, van een andere herkomst dan de antigenen waartegen

ze gevormd zijn, bijv. van nauwverwante organismen, noemt men *heterologe reacties.*

Bij kunstmatige immunisatie van proefdieren worden meestal met kortere of langere tussenperioden injecties gegeven, zodat over een zekere periode voortdurend antigeen materiaal aanwezig is. Na een eerste injectie duurt het enkele dagen voor er antistoffen in het bloed aangetoond kunnen worden. De hoeveelheid neemt snel toe tot een maximum, waarna hij weer daalt als er geen tweede injectie op volgt. Worden de injecties herhaald, dan wordt dit maximum hoger, tot ook hier weer een grens bereikt is, waarna volgende injecties geen effect meer hebben. (BOYD, 1956). De hoogste verdunning van het antiserum (of het antigeen) waarmee nog een waarneembare reactie verkregen wordt, noemt men de *titer* van het antiserum (het antigeen). Na een rustperiode van enkele maanden kan een nieuwe injectie aanleiding geven tot een plotselinge stijging van de titer tot een maximum, dat hoger ligt, dan bij de eerste serie injecties werd bereikt. Men spreekt dan van een „booster" injectie en van een „secondary response" of stooteffect. Niet alle antigenen geven aanleiding tot zo'n stooteffect. De antistofproductie kan in sommige gevallen in gunstige zin worden beïnvloed, door bepaalde stoffen gelijktijdig met de antigenen in te spuiten, die dan *hulpstoffen* of *„adjuvants"* worden genoemd.

2. SEROLOGISCHE VERWANTSCHAP

In de systematiek en de fylogenie worden wel serologische methoden toegepast voor het vaststellen van de graad van verwantschap tussen hogere dieren of tussen hogere planten. Hierbij gaat men uit van het principe dat de intensiteit van de serologische reactie evenredig is met de graad van verwantschap. Als twee soorten in de loop van de evolutie uit elkaar zijn gegaan, zijn daarbij chemische zowel als morfologische verschillen ontstaan. Hiervan kunnen de chemische verschillen voor een deel en dan vooral met behulp van de precipitatie-reactie worden opgespoord.

NUTTALL (1904) en BOYDEN (1934 en 1942) onderzochten een groot aantal gewervelde dieren en vonden in het algemeen een goed verband tussen de graad van verwantschap en de intensiteit van de reactie. In de plantensystematiek was het vooral de zogenaamde Königsberger school onder leiding van MEZ en ZIEGENSPECK (1925 en 1926), die een groot deel van het plantenrijk heeft doorvorst. De door hen opgestelde „Königsberger serodiagnotischer Stammbaum" vertoonde naast vele overeenkomsten met, ook enkele afwijkingen van de conclusies van systematici, die volgens morfologische, anatomische en cytologische methoden werkten. Dit leidde tot een zeer heftige kritiek (BOOM, 1930), die er ongetwijfeld toe heeft bijgedragen, dat serologische methoden thans nog slechts sporadisch worden toegepast in de systematiek.

Uit bovenstaande zou men ten onrechte de conclusie kunnen trekken, dat er binnen een morfologische eenheid, binnen de soort bijvoorbeeld, geen serologische verschillen bestaan. Een voorbeeld waar dit wel het geval is, zijn de bekende bloedgroepen bij de mens.

In de bacteriologie, waar dikwijls serologische methoden toegepast worden voor diagnostische doeleinden, loopt de serologische differentiatie in het algemeen parallel met de gebruikelijke klassificatie. In vele gevallen blijken er echter ook grote serologische verschillen te bestaan tussen organismen, die op grond van morfologische kenmerken en de wijze van groei op kunstmatige

voedingsbodems dicht bij elkaar geklassificeerd staan. Soorten kunnen aldus worden onderverdeeld in typen en typen weer gerangschikt in groepen. Men spreekt dan van soortspecificiteit, typespecificiteit en groepspecificiteit. Bij nauwverwante organismen heeft de specificiteit van de antistoffen de neiging om af te nemen als een proefdier gedurende een lange periode wordt geïmmuniseerd. (MAURER, 1954; LINK & WILCOX, 1933).

Het is niet altijd mogelijk de specificiteit te herleiden tot één chemisch zuivere stof. Dikwijls zijn chemische complexen verantwoordelijk voor de antigeniteit. MORGAN (1943) beschouwt bacteriële antigenen als een labiel molecuul-aggregaat van een specifieke groep met een bepaalde chemische samenstelling (bijv. polysacchariden) en daaraan los gebonden andere samenstellende delen, die de antigeniteit veroorzaken (dat kunnen eiwitten zijn). Zo'n complex kan aanleiding geven tot de productie van meer dan één antistof. Omgekeerd kan één antistof reageren met antigeen-complexen, die in chemische opbouw kleine verschillen vertonen, en bijvoorbeeld afkomstig zijn van nauwverwante organismen.

Bij kruisreacties tussen antigenen van, en antiserums tegen nauwverwante organismen gaat men wel uit van de volgende eenvoudige voorstelling:

	antigenen	*antistoffen*
bacterie 1	a, b, c, d, e,	serum 1 A, B, C, D, E,
bacterie 2	c, d, e, f, g, h,	serum 2 C, D, E, F, G, H,
bacterie 3	e, f, g, h, j, k,	serum 3 E, F, G, H, J, K,

Serum 1 reageert behalve met bacterie 1, ook met bacterie 2 (op grond van de antistoffen C, D en E) en met bacterie 3 (op grond van antistof E). Verzadigt men nu serum 1 met de antigenen van bacterie 2 dan zullen de antistoffen C, D en E uit de oplossing verdwijnen; de antistoffen A en B blijven over, zodat het *verzadigd serum* nog wel met bacterie 1, echter niet meer met bacterie 2 en 3 kan reageren. Omgekeerd kan men ook serum 2 met bacterie 1 verzadigen. Dit noemt men de *spiegeltoets*. Deze eenvoudige voorstelling gaat in sommige gevallen op, echter uit wat boven gezegd is over complexe antigenen blijkt al, dat dit niet altijd het geval is. Als a, b en c in één complex verenigd zijn, kunnen bij verzadiging met bacterie 2 ook de antistoffen A en B verdwijnen en zal van een specifieke differentiatie geen sprake meer zijn. Een andere moeilijkheid doet zich voor bij zwakke antiserums: verzadiging met opgeloste antigenen gaat gepaard met verdunning, wat ook het uitblijven van de reactie tot gevolg kan hebben. In dergelijke gevallen zal men zich tot andere methoden moeten wenden, bijvoorbeeld de geldiffusie-reactie. Men kan ook trachten bepaalde antigenen langs chemische weg zuiver in handen te krijgen.

3. SEROLOGISCH ONDERZOEK BIJ SCHIMMELS

a. Betekenis

Serologische methoden zijn in de mycologie van veel geringere betekenis gebleven dan in de bacteriologie. Hiervoor zijn verschillende redenen aan te wijzen.

In vele gevallen zijn schimmels met behulp van loep of microscoop te determineren en heeft men geen behoefte aan de serologische techniek, die nu eenmaal speciale voorzieningen eist en bovendien aan vele onderzoekers onbekend is.

Schimmels kunnen niet als bacteriën op eenvoudige wijze in hun geheel bij een proefdier ingespoten worden, maar moeten in de meeste gevallen eerst een of andere bewerking ondergaan (fijnmalen, extraheren).

In het algemeen zijn schimmels slechte antigenen, wat het serologisch werk erg bemoeilijkt.

Schimmels spelen slechts een ondergeschikte rol bij de ziekten van mens en dier. Het menselijk en dierlijk organisme heeft veel meer te verduren van aanvallen van bacteriën en tracht zich hiertegen te verweren door het vormen van antistoffen. Deze antistoffen zijn zowel voor therapeutische als diagnostische doeleinden direct van belang. Serologie van fytopathogene schimmels moet daarentegen langs een omweg uitgevoerd worden: de schimmel moet eerst bij een proefdier worden ingespoten en het verkregen antiserum is enkel voor diagnostische doeleinden en niet voor therapie van zieke planten bruikbaar. Bij de aantasting van een plant door een schimmel speelt de productie van antistoffen, zo die al plaats vindt, een veel geringere rol, doordat de plant niet beschikt over een centrale bloedsomloop, die gevormde antistoffen tot in de fijnste weefsels vervoert en ons bovendien in staat stelt deze antistoffen op eenvoudige wijze in handen te krijgen.

Schimmels, die ziekten bij de mens veroorzaken zijn dikwijls serologisch wel onderzocht. Omgekeerd spelen serologische methoden een geringe rol bij het onderzoek van fytopathogene en bodem-bacteriën.

b. Serologie bij zoöpathogene schimmels

De systematiek van de schimmels, die allerlei ziekten bij mens en dier kunnen veroorzaken, is nog zeer verward. De meeste moeten tot de *Fungi imperfecti* gerekend worden, terwijl een aantal *Ascomyceten* zijn.

De grote groep der ringworm-schimmels, die allerlei oppervlakkige mycosen op huid, haren en nagels veroorzaken, omvat een 100–200 soorten, die samen de familie der *Trichophytoneae* van de *Fungi imperfecti* vormen. Patiënten, die aan zo'n dermatomycose lijden, vertonen een overgevoeligheidsreactie van de huid na intracutane injectie van *trichophytine*, een stikstof bevattende polysaccharide, geëxtraheerd uit één van de *Trichophytoneae*. Dit wijst op de aanwezigheid van antistoffen (allergenen). Agglutininen, precipitinen en complementbindende antistoffen heeft men echter nooit duidelijk kunnen aantonen (KLIGMAN & DELAMATER, 1950).

Ook bijna alle schimmels, die systemische mycosen veroorzaken, geven aanleiding tot dergelijke overgevoeligheids-reacties. Bovendien kunnen hierbij dikwijls wel agglutininen, precipitinen en complementbindende factoren worden aangetoond, zowel bij de patiënten zelf, als bij kunstmatig geïmmuniseerde proefdieren. De literatuur op dit gebied is zeer uitgebreid. Voor gedetailleerde overzichten zij verwezen naar WOLF & WOLF (1947) en EMMONS (1950), die de medische mycologie van mycologisch standpunt benaderen, NICKERSON (1953), die een aanvulling geeft van meer medische zijde, KLIGMAN & DELAMATER (1950), die speciaal de immunologische kant behandelen en naar het rapport van een in 1957 gehouden „Symposion".

Ook in de medische mycologie is de therapeutische betekenis van serologische methoden gering: passieve immunisatie van patiënten met immuunserums bleek slechts in enkele gevallen mogelijk. Serologische onderzoekingen worden echter vooral toegepast om diagnostische en daarmee samenhangende taxono-

mische problemen op te lossen. Het grote aantal kruisreacties maakt interpretatie van de resultaten echter dikwijls moeilijk.

De reeds genoemde allergische verschijnselen zijn dikwijls weinig specifiek en de resultaten van de huid-reacties hebben dan ook slechts aanvullende waarde in de diagnostiek. Wel belangrijk zijn ze bij *Coccidioides immitis*, een longpathogeen, die ernstige koortsen kan veroorzaken, en bij *Sporotrichum schenkii*, die met houtsplinters het menselijk lichaam kan binnendringen.

De concentratie van *in vitro* reagerende antistoffen is bij patiënten, zowel als bij kunstmatig geïmmuniseerde dieren bijna steeds laag: soms kan zelfs bij de zeer gevoelige complementbindingsreactie alleen met onverdund serum een reactie worden verkregen. Hoewel dit in principe aan de verkregen resultaten geen afbreuk hoeft te doen, ontstaan er wel moeilijkheden, als eveneens zwakke reacties worden verkregen met andere schimmels. Dergelijke kruisreacties komen vaak voor, bijvoorbeeld tussen *Blastomyces dermatitidis* (een huidziekte veroorzakende gistachtige Ascomyceet), *Coccidioides immitis* en *Histoplasma capsulatum* (een *Fungus imperfectus*, die systemische mycosen, gepaard gaande met koorts en anemie kan veroorzaken; een meer onschuldige vorm geeft in bepaalde streken verkalkingsverschijnselen in de long, hetgeen nogal eens verwarring met t.b.c. oplevert.) (SALVIN, 1949; SMITH & SAITO, 1957). Bij de kruisreacties zijn er vaak wel kwantitatieve verschillen tussen de homologe en heterologe reacties.

Ook de gistachtige schimmels van de familie der *Torulopsidaceae*, waartoe o.a. de geslachten *Candida* (in de medische literatuur merkwaardigerwijze vaak *Monilia* genoemd) en *Torulopsis* (= *Cryptococcus* = *Torula*) behoren, vertonen allerlei kruisreacties, onderling zowel als met *Saccharomycetaceae*. Deze schimmels veroorzaken zeer verschillende ziekten van min of meer onschuldige huidziekten en spruw bij kinderen, tot zeer fatale aantastingen van het centrale zenuwstelsel (meningo-encephalitis). Volgens TSUCHIYA *et al.* (1957) zijn de antigene structuren van *Candida robusta* en *Saccharomyces cerevisiae* zelfs volledig identiek.

Onder de schimmelantigenen blijken polysacchariden dikwijls een belangrijke rol te spelen. Soms komen deze polysacchariden voor in een kapsel rondom de gistachtige schimmellichamen (bij *Candida*, *Torulopsis* en *Sporotrichum*). NEILL *et al.* (1949) baseerden hierop een gemodificeerde „Quellungsreactie": in aanwezigheid van antiserum worden de gewoonlijk onzichtbare kapsels plotseling zichtbaar. Deze reactie is in sommige gevallen specifiek.

Naast polysaccharide kunnen ook eiwitten een rol spelen bij de antigeniteit, zoals bij *Blastomyces dermatitidis* en *Histoplasma capsulatum*. LABZOFFSKY *et al.* (1957) voerden een gefractioneerde extractie van de gistachtige fase van *Histoplasma capsulatum* uit. Van de verkregen fracties waren er tenminste zeven en misschien acht serologisch en chemisch verschillend. Alle acht gaven positieve reacties met eiwit- zowel als met suikerreagentia.

SALVIN & RIBI (1955) scheidden van de gistachtige vorm van *Histoplasma capsulatum* de celinhoud van de celwand en toonden aan, dat de complementbindende antigenen, evenals de toxinen, in de celwand voorkomen; de hemolytische activiteit ten opzichte van cavia-erythrocyten berust vooral op de, in het protoplasma voorkomende stoffen, terwijl bij de huidreactie zowel protoplasma als celwand een rol kunnen spelen.

c. Serologie bij fytopathogene schimmels

Reeds in 1907 voerden MAGNUS & FRIEDENTAHL serologische reacties met *Ustilago species* uit, waarbij ze aantoonden, dat deze schimmels serologisch weinig verwantschap vertoonden met hogere planten. Dergelijke verwantschappen bestaan er wel tussen de schimmelgroepen onderling, zoals in de Koningsberger school door NEUHOFF & ZIEGENSPECK (1926) werd vastgesteld. LINK & WILCOX (1933) toonden binnen de Ascomyceten verschillen aan tussen de leden van de *Pezizales* (*Sclerotinia species*) en van de *Hypocreales* (*Neurospora tetrasperma*, *Fusarium species*, *Cylindrocarpon* en *Ramularia*). Om enige klaarheid te brengen in de strijdvraag over de systematische plaats van *Phymatotrichum omnivorum*, een wortelparasiet van katoen, werd door CUMLEY & GOLDSMITH (1940) aangetoond, dat deze serologisch nauwer verwant is met verschillende Gasteromyceten, dan met verschillende Phycomyceten en Ascomyceten.

Serologische verschillen tussen schimmelsoorten werden aangetoond door CORPACI (1925) bij *Aspergillus niger* en *A. fumigatus* met de complementbindingsreactie, en door MATSUMOTO (1928) eveneens bij *Aspergillus species* met de precipitatie-reactie en de complementbindingsreactie; de agglutinatie-reactie met sporen bleek niet te voldoen. Binnen het geslacht *Aspergillus* bleek er weinig overeenkomst te bestaan tussen serologische en morfologische verwantschappen. In biochemisch opzicht verschillende stammen van *A. niger* bleken serologisch niet te verschillen (MATSUMOTO, 1929).

COONS & STRONG (1928) immuniseerden konijnen met extracten in fysiologisch zout van *Fusarium radicicola*, *Fusarium conglutinans* en *Fusarium martii phaseoli*. Met de complementbindingsreactie toonden ze verschillen aan tussen soorten en rassen van *Fusarium*. De titers van de serums waren betrekkelijk laag (1:100). Titers van dezelfde orde verkreeg NELSON (1933) na immunisatie van konijnen met globulinen van *Fusarium lini*, verkregen door met ether geëxtraheerd mycelium van deze schimmel onder grote druk uit te persen. LINK & WILCOX (1932 en 1933) maken melding van zeer hoge precipitatietiters (1:3200) na een combinatie van intraperitoneale injecties met myceliumsuspensies en intraveneuze injecties met myceliumextracten in fysiologisch zout, na voorafgaande vetextractie. Het betreft hier echter geen titers van de serums, maar van de antigenen in reactie met onverdunde serums. De serums tegen 25 *Fusarium species* vertoonden sterke kruisreacties en waren in vele gevallen niet soortspecifiek. Dezelfde onderzoekers (WILCOX & LINK, 1935) isoleerden uit *Neurospora tetrasperma* en *N. sitophila* koolhydraten, die een precipitatiereactie vertoonden met antiserums tegen zoutextracten van deze schimmels. Deze koolhydraten waren niet „strain"-specifiek.

BECK (1934), die met verschillende *Ustilaginales* en *Uredinales* werkte, kon heldere zoutextracten verkrijgen zonder het mycelium vooraf met een vetoplosmiddel te extraheren. Serums tegen dergelijke extracten waren soortspecifiek in die zin, dat de homologe reacties sterker waren dan de heterologe, maar „it seems evident that the precipitin ring test is not sufficiently specific for the purpose in mind, namely the differentiation of closely related species and physiological forms". Later toonde BECK (1938) kwantitatieve verschillen aan tussen drie monospore-cultures van *Ustilago zeae* en eveneens tussen twee uit dezelfde chlamydospore afkomstige monospore-cultures van *U. hordei*. Agglutinatie-reacties met myceliumsuspensies bleken niet uitvoerbaar te zijn. Zowel

LINK & WILCOX als BECK constateerden een teruggang in titer tijdens het bewaren van de antiserums.

Na de tweede wereldoorlog is er op het gebied van de serologie van fytopathogene schimmels weinig meer gepubliceerd. BAHN (1957) onderzocht een aantal fysio's van vijf *Puccinia species*. Bij de door hem toegepaste precipitatiereacties en complementbindingsreacties werden als antigenen gebruikt: *a.* gehomogeniseerde, niet gekiemde uredosporen in fysiologisch zout en *b.* geconcentreerd extract van gekiemde uredosporen. Het succes van de serologische differentiatie bleek afhankelijk te zijn van de genetische zuiverheid van de uredosporen-collecties. Zo konden een aantal fysio's van *P. graminis tritici* serologisch niet gescheiden worden; ze gedroegen zich meer als serologische groepen, dan als serologische eenheden. De uredosporen van deze rassen bestonden uit een „bulk" collectie, hetgeen bleek uit infectieproeven met tarwerassen. Daarom werden van drie fysio's van deze schimmel klonen gemaakt, uitgaande van afzonderlijke uredosporen. Hiervan bleken de klonen, die zeer specifiek waren wat betreft hun pathogeniteit ten opzichte van de tarwerassen, die als „differentials" werden gebruikt, grotere serologische verschillen te vertonen, dan de „bulk" fysio's. Twee fysio's van *P. graminis tritici* bleken serologisch te verschillen, maar vertoonden kruisreacties met elkaar en met „bulk" fysio's van *P. graminis tritici*. Een betere serologische differentiatie werd verkregen met fysio's van *P. graminis avenae*, vooral bij toepassing van de complementbindingsreactie. Het betrof echter ook hier nog altijd betrekkelijk geringe verschillen (1–2 buizen in verdunningsreeksen). Bij klonen en inteeltlijnen van *P. sorghi* waren de verschillen wat groter (1–4 buizen). Bij de proeven bleken de extracten van gekiemde uredosporen grotere antigeniteit en hogere specificiteit te bezitten dan de gehomogeniseerde uredosporen.

d. Serologische methoden voor het bepalen van resistentie tegen ziekten

VAVILOV (1914) vergeleek de door botanici opgestelde serologische groepen van granen met groeperingen op basis van een aantal andere eigenschappen en ontdekte daarbij een parallel tussen serologische verwantschap en vatbaarheid voor *Puccinia rubigo-vera triticina*. Dit werd bevestigd door de onderzoekingen van NELSON & BIRKELAND (1929) en die van EDGECOMBE (1931) met tarwesoorten en -rassen.

De Russische onderzoekster FEDOTOVA (1938a) extraheerde eiwitten uit zaad van verschillende katoensoorten en liet deze reageren met antiserums tegen *Verticillium dahliae*, *Fusarium buharicum* en *Bacterium malvacearum;* de reacties waren positief of negatief al naar de vatbaarheid vóór of resistentie tegen deze micro-organismen in het veld. Soortgelijke resultaten verkreeg ze bij de bestudering van de vatbaarheid van 18 tarwerassen tegen fysio's van *Puccinia triticina* (FEDOTOVA, 1938b) en bij die van bonerassen tegen *Bacterium medicaginis* (FEDOTOVA, 1939). ZELENOVA (1937) berichtte al eerder dat de resistentie van vlasrassen tegen *Melampsora lini* en *Fusarium lini* op deze wijze met grote zekerheid vast te stellen was.

HOOFDSTUK III

MATERIAAL

1. Schimmels. Verkorte aanduiding

Het onderzoek werd uitgevoerd met een aantal schimmels uit het geslacht *Fusarium*. Voor de nomenclatuur werd het concept van Snyder en Hansen (1940) gevolgd. Op één uitzondering na, betrof het *formae speciales* (afgekort tot f.) uit het geslacht *Fusarium oxysporum* Schl. emend. Sn. et H.; in alfabetische volgorde naar de waardplant, waarnaar ze genoemd zijn, waren het:

Fusarium oxysporum f. *callistephi* (Beach) Sn. et H.	F.o.cal
Fusarium oxysporum f. *dianthi* (Prill. et Del.) Sn. et H.	F.o.di
Fusarium oxysporum f. *lupini* Sn. et H.	F.o.lup
Fusarium oxysporum f. *narcissi* (Cke. et Mass.) Sn. et H.	F.o.na
Fusarium oxysporum f. *pisi* (Lindf.) Sn. et H.	F.o.pi
Fusarium oxysporum Schl. emend. Sn. et H., geïsoleerd van tulp.	F.o.tul 1
	F.o.tul 2
Fusarium culmorum (W. G. Sm.) Sacc. (Synoniem met *Fusarium roseum* (Lk.) emend. Sn. et H.	F. culm.

Achter de namen van deze schimmels zijn de, in dit proefschrift gevolgde, verkorte aanduidingen weergegeven. In de figuren en foto's werd nog verder afgekort tot één of enkele letters, bijv. F.o. lup tot 1.

F.o.cal, F.o.lup, F.o.pi en F.culm waren afkomstig uit de collectie van het Laboratorium voor Fytopathologie te Wageningen.

Van de eerste drie werd de pathogeniteit ten opzichte van aster, lupine en erwt getoetst: F.o.cal tastte alleen asters, F.o.lup alleen lupineplanten en F.o.pi alleen erwteplanten aan; er is hier dus inderdaad sprake van *formae speciales* (zie pag. 3). De identiteit van F.culm, die onder deze naam in de collectie aanwezig was, werd niet nader onderzocht; volgens Snyder & Hansen (1945) moet deze schimmel *Fusarium roseum* heten. F.o.di werd verstrekt door G. Scholten van het Proefstation voor Bloemisterij in Nederland te Aalsmeer. F.o.na werd geïsoleerd uit een narcissebol met duidelijke symptomen van bolrot; de veroorzaker van deze ziekte werd vroeger *F. bulbigenum* Cke. et Mass. genoemd; door Snyder en Hansen is deze naam veranderd in *F.o.* f. *narcissi*. F.o. tul 1 en F.o. tul 2 werden geïsoleerd uit twee tulpebollen met symptomen van het „zuur"; de cijferaanduidingen 1 en 2 hebben betrekking op de twee verschillende isolaties. Het „zuur" van de tulp wordt eveneens veroorzaakt door *Fusarium oxysporum* (Gould, 1957); vermoedelijk betreft het ook hier een *forma specialis*, die dan *F.o.* f. *tulipae* genoemd zou kunnen worden; deze is nog niet als zodanig beschreven.

2. Konijnen. Aanduiding van de serums

Op verschillende wijze bereide preparaten van de schimmels werden ingespoten bij volwassen, 1–2 jaar oude konijnen. De antiserums werden aangeduid met een hoofdletter en een volgnummer, bijv. C 17. De hoofdletter heeft betrekking op de *forma specialis*, waarmee dit konijn werd ingespoten; C 17 is dus serum van een konijn dat werd ingespoten met een preparaat van F.o.cal; in analoge zin werden de hoofdletters D, L, N, P en T gebruikt; serum tegen

F. culm werd ter onderscheiding van dat tegen F.o.cal met Cu aangeduid. De volgnummers dienden om verschillende serums tegen dezelfde *forma specialis* te onderscheiden. Serums tegen verschillende *formae speciales* kregen hetzelfde volgnummer, als ze op analoge wijze werden verkregen: zo werden bijv. de serums van konijnen, die volgens hetzelfde spuitschema waren ingespoten met op gelijke wijze bereide extracten van F.o.cal, F.o.lup en F.o.pi, resp. C 17, L 17 en P 17 genoemd.

HOOFDSTUK IV

METHODEN

1. Immunisering van de konijnen

Volwassen konijnen werden intraveneus (in de randader van het oor), intraperitoneaal (in de buikholte) of subcutaan (onderhuids, naast de wervelkolom) ingespoten. In verband met het feit, dat de specificiteit van de antistoffen de neiging heeft om af te nemen als de konijnen over een lange periode worden geïmmuniseerd, werd over het algemeen een betrekkelijk kortdurend inspuitschema gevolgd (3 à 4 weken).

Ingespoten werd met cultuurfiltraten, sporensuspensies, suspensies van fijngemalen mycelium en mycelium-extracten.

Cultuurfiltraten van één tot twee weken oude culturen op een Richard-oplossing konden zonder toevoeging van NaCl intraveneus worden ingespoten; blijkens geleidbaarheidsmetingen kwam de elektrolyt-concentratie van een Richard-oplossing ongeveer overeen met die van een fysiologische zoutoplossing; het specifiek geleidingsvermogen veranderde niet van betekenis na enkele weken schimmelgroei op de voedingsbodem. Aan filtraten van schudculturen in een Czapek-oplossing werd 0,8 g NaCl per liter toegevoegd. De hoeveelheden per injectie konden langzaam worden opgevoerd tot 10 ml.

Sporensuspensies werden verkregen door uit twee weken oude schudculturen in een Czapek-oplossing de myceliumklonten te verwijderen door filtratie door kaasdoek, eventueel gevolgd door filtratie door grof filtreerpapier om nog aanwezige korte myceliumdraadjes te verwijderen. De zeer fijne microconidiën werden enkele malen gewassen met fysiologisch zout. Dunne suspensies in fysiologisch zout (20 procent transmissie, gemeten in een Kipp absorptiemeter, ingesteld op meetgebied 66) konden zonder gevaar intraveneus worden ingespoten, waarbij de hoeveelheden per injectie eveneens konden worden opgevoerd tot 10 ml.

Myceliumsuspensies werden bereid door het mycelium van een veertien dagen oude vliescultuur goed uit te wassen met fysiologisch zout en vervolgens in een mixer („Ceka ultramixer" of „Servall omni-mixer") tot een fijne brij te verdelen. Deze brij werd tot een dichte witte suspensie verdund (1–2 g mycelium per 100 ml fysiologisch zout) en intraperitioneaal toegediend, tot 5 ml per injectie.

De bereiding van mycelium-extracten met fysiologisch zout, met 10 % NaCl, met trichloorazijnzuur en met 1 % KOH komt bij de bespreking van de daarop betrekking hebbende proeven ter sprake. De groen-bruin gekleurde extraxten werden tegen fysiologisch zout gedialyseerd en intraveneus ingespoten.

De konijnen verdroegen injecties met alle bovengenoemde antigenen goed, mits de hoeveelheden niet te snel werden opgevoerd. Na onderbreking van een serie injecties moest, ook na desensibilisatie, voorzichtig met kleinere hoeveelheden gestart worden, dan waarmee de eerste serie was afgebroken.

Ten einde de antistofproductie zo hoog mogelijk op te voeren, werden in enkele gevallen hulpstoffen aan de antigenen toegevoegd. Als hulpstoffen dienden:

a. Een mengsel van gelijke hoeveelheden vaseline en watervrije lanoline (Ong, 1943).

b. De zogenaamde „Freund adjuvants": 40 mg gedode tuberkelbacillen[1]) vermengd met 10 ml aquaphor (dat is een mengsel van paraffine en eucerine, als emulgator) of een mengsel van 10 ml vloeibare paraffine-olie (Nerol A) en 1,5 ml Arlacel (mannide-mono-oleaat, als emulgator). (FREUND *et al.*, 1948).

De emulsies werden bereid door de gewenste hoeveelheid antigeen-oplossing druppelsgewijs aan een even grote hoeveelheid hulpstof toe te voegen, die ondertussen met een injectiespuit zonder naald herhaaldelijk werd opgezogen en weer uitgespoten. Bij het lanoline-vaseline mengsel en de aquaphor, die bij kamertemperatuur vast zijn, gebeurde dit op een waterbad bij 40 °C. De emulsies werden dan warm ingespoten: intramusculair in de rugspieren of in de dijspieren. Hierbij werd dan bijvoorbeeld het volgende inspuitschema gevolgd:

Eerste week: 2 ml antigeen + 2 ml adjuvant, subcutaan.
Tweede week: dito.
Derde week: dito.
Vierde week: Vier opeenvolgende dagen resp. 2, 3, 4 en 5 ml antigeen, intraveneus.

2. WINNEN EN BEWAREN VAN DE ANTISERUMS

Vijf dagen na de laatste injectie werd een proefmonster bloed uit een der oren afgetapt en volgens de precipitatiereactie op de aanwezigheid van antistoffen onderzocht (zie par. 3). Waren de resultaten bevredigend dan werd het konijn na één dag gevast te hebben verbloed, of werd een hartpunctie toegepast, in beide gevallen onder narcose door middel van een nembutal-injectie.

Bij het verbloeden werd zoveel mogelijk bloed uit de blootgelegde en doorgeknipte halsslagader zo steriel mogelijk opgevangen (ongeveer 100 ml). Bij de hartpunctie werd 50 ml bloed via een in het hart geprikte naald en een plasticslangetje in een gesteriliseerd flesje gezogen. De konijnen overleefden een dergelijke operatie zonder schadelijke gevolgen.

Als het bloed na enkele uren staan gestold was, werd de bloedkoek van de glaswand losgemaakt. Na 24 uur was de bloedkoek samengetrokken en werd het serum afgeschonken en een etmaal in de ijskast gezet. Dan waren ook de bloedlichaampjes bezonken. Het heldere serum werd na toevoeging van 4% merthiolaat (1:1000) bij –15 °C bewaard of droog gevroren.

3. SEROLOGISCHE REACTIES

a. De agglutinatie-reactie

Als antigenen dienden gewassen en met behulp van een Kipp absorptieapparaat gestandaardiseerde sporensuspensies of suspensies van fijne myceliumdeeltjes. De reactie werd op microschaal uitgevoerd volgens de methode van VAN SLOGTEREN (1955).

Druppeltjes antiserum worden vermengd met druppeltjes antigeen op de bodem van een petrischaal. Om uitvloeien van de druppeltjes te voorkomen wordt de bodem voorzien van een waterafstotende laag, door deze te bevochtigen met een één-procentige oplossing van polyvinyl formaldehyde (handelsnamen: formvar, mowitall F 40) in chloroform; de chloroform verdampt en de formvar vormt een filmpje op de bodem. In één petrischaal kunnen wel honderd reacties tegelijk plaats vinden, bijvoorbeeld van tien verschillende antigenen met tien verdunningen van één antiserum (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, etc.). De serumdruppels worden het eerst op de bodem gerangschikt; dit geschiedt met een fijn uitgetrokken Pasteurpipet, te beginnen

[1]) Verstrekt door het Instituut voor Volksgezondheid te Utrecht.

bij de hoogste verdunning. Door elk serumdruppeltje wordt vervolgens een druppeltje antigeen gemengd. Verdamping van de druppels wordt voorkomen door er een laag vloeibare paraffineolie over te gieten. De schalen worden twee uur bij 37 °C geplaatst. Daarna worden de druppels onder een microscoop met donkerveld belichting bij 100-voudige vergroting bekeken: bij een positieve reactie zijn de sporen op hoopjes samengeklonterd (geagglutineerd).

b. De precipitatie-reactie

Deze werd eveneens uitgevoerd volgens de micromethode van VAN SLOGTEREN (1955), dus op dezelfde wijze als de agglutinatiereactie. Als toetsantigenen werden gebruikt cultuurfiltraten of extracten van de schimmel, die voor de reactie bij hoog toerental werden gecentrifugeerd (25×10^3 g) om ze volkomen helder te krijgen. Bij een positieve reactie ontstaat een neerslag, dat we onder de microscoop waarnemen als grotere of kleinere vlokken.

c. De geldiffusie-methode

Hierbij verloopt de reactie tussen opgeloste antigenen en antistoffen inplaats van in vloeibaar milieu, zoals bij de gewone precipitatie-reactie, in een gegelifieerd milieu. Eén van de mogelijke variaties op deze methode (een overzicht geeft OUDIN, 1952) is die van de dubbele diffusie in agargel, waarvan OUCHTERLONY (1949) en ELEK (1949) de grondleggers zijn.

Men giet in een petrischaal een 4 mm dikke laag van een 1–1½ procentige glasheldere agaroplossing. In de gestolde agar ponst men putjes (grootte, vorm en aantal kunnen naar behoefte gevarieerd worden), waarin de reagentia gebracht worden. Antigenen en antistoffen diffunderen door de agar en op de plaats, waar zij met elkaar in een gunstige verhouding in aanraking komen, vormt zich een precipitatie-lijntje. Bevinden zich in de antigeenoplossing verschillende antigenen, dan zullen deze afhankelijk van grootte en lading met verschillende snelheden door de gel diffunderen en vormen zich dus verschillende precipitatie-lijntjes. Op deze wijze krijgen we een indruk van het aantal componenten van het antigenenmengsel. De methode maakt het ook op eenvoudige wijze mogelijk verschillen tussen antigenenmengsels aan te tonen. Fig. 1.

Over mogelijke afwijkingen van het gedrag van de lijntjes vindt men beschouwingen bij BURTIN (1954), KAMINSKI (1954), WILSON & PRINGLE (1955), KORNGOLD (1956) en FEINBERG (1957).

VAN SLOGTEREN (1958) voerde de reactie van virus-antigenen en antiserums uit in agarplaatjes van geringe afmetingen, gegoten in glazen ringetjes (16 mm diam.), die met behulp van paraffine op de bodem van een petrischaal zijn bevestigd. De reactie is dan gevoeliger en verloopt sneller. Men kan dergelijke ringetjes ook aan de bodem vastkitten met behulp van araldit. Eenvoudiger is het nog om de ringetjes los van elkaar op een glazen plaat te leggen. Men is dan niet aan een bepaald patroon gebonden. Door de plaat van te voren met een dun laagje agar te bestrijken en deze erop in te drogen, voorkomt men dat de ringetjes gaan glijden nadat ze gevuld zijn. Het geheel moet in een horizontaal opgestelde, vochtige bak gelegd worden, om uitdrogen te voorkomen.

Er werden ringetjes gebruikt van 16, 20, 28 en 34 mm diameter. In de agar werden met bijgeslepen kurkboren putjes geponst variërend van 3 en 4 mm voor de kleinste, tot 10 mm voor de grootste ringetjes. Anderhalf procent bacto-agar werd opgelost in gedestilleerd water of in Michaëlis-veronal-buffers van verschillende pH's (deze zijn isotonisch met fysiologisch zout). De agar werd gesteriliseerd en kon in goed afgesloten reageerbuizen lange tijd in de koude kamer bewaard worden. Bacteriegroei werd zoveel mogelijk tegengegaan door aan de agar 10% merthiolaat (1:1000) toe te voegen en door de binnenkant van de deksels van petrischalen en vochtige bakken met een watje met toluol te bestrijken.

De eerste lijntjes begonnen soms enkele uren na het vullen van de putjes al te verschijnen. De reactie was pas na enkele dagen geheel voltooid. Omdat met betrekkelijk zwakke reagentia gewerkt moest worden, werden de putjes in de loop van de eerste 24 uur enkele malen geleegd en met verse reagentia opnieuw gevuld. Om te voorkomen, dat daarbij verdubbeling van de lijntjes zou optreden, werd het opnieuw vullen gedaan, vóórdat de putjes geheel uitgedroogd waren, en werden steeds alle putjes gelijktijdig geleegd en weer gevuld. Er werd trouwens steeds gewerkt met konijneserum, waarbij het gevaar van verdubbeling geringer is dan bij gebruik van paardeserum.

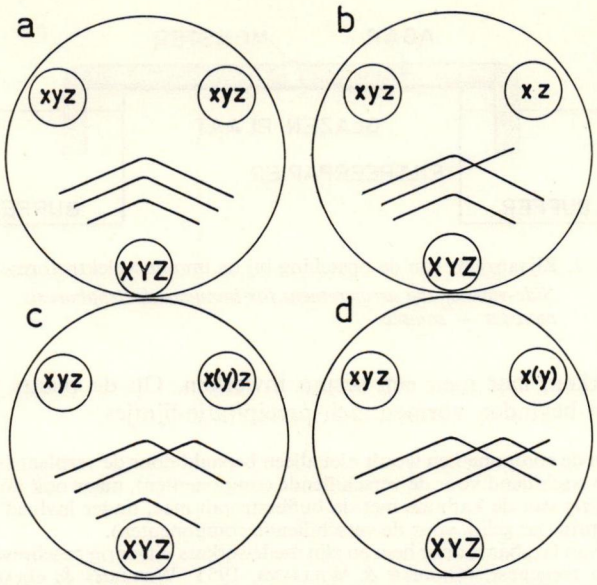


FIG. 1. Precipitatielijntjes in agargel na reactie van het serum XYZ met het homologe antigenenmengsel xyz en verschillende heterologe antigenenmengsels.
a. de antigenen zijn identiek
b. één van de antigenen ontbreekt in het heterologe mengsel
c. de antigenen zijn identiek, maar de concentraties van y zijn verschillend
d. in het heterologe mengsel ontbreekt één der antigenen en één komt in een lagere concentratie voor. (naar Ouchterlony, 1949).

Line patterns after a gel diffusion precipitin test of serum XYZ with the homologous antigen mixture xyz and different heterologous antigen mixtures.
a. the antigens are identical
b. one of the antigens is lacking in the heterologous mixture
c. the antigens are identical, the concentrations of y, however, are different
d. one of the antigens is lacking and one is present in lower concentration in the heterologous mixture.

Voor het fotograferen van de lijntjes werd een donkerveld belichting toegepast: de platen werden horizontaal boven een donkere ondergrond aangebracht en van onderen van opzij belicht. Bij gebruik van harde negatieven en hard papier kwamen zelfs met het oog nauwelijks zichtbare lijntjes in de afdrukken te voorschijn. Soms werden contactafdrukken direct van de agarplaten op hard papier gemaakt. Met deze snellere methode konden echter niet zulke goede resultaten worden bereikt.

d. Immuno-elektroforetische onderzoekingen

Principe. Een betere scheiding van de componenten van een antigenenmengsel dan bij de gewone diffusie in agargel mogelijk is, kan men verkrijgen door in de gel een elektrisch veld aan te brengen. Het principe van de elektroforese berust erop, dat de in een basische omgeving negatief geladen eiwitmoleculen zich in een elektrisch veld naar de anode bewegen. GRABAR & WILLIAMS (1953) combineerden de elektroforetische scheiding met de geldiffusiemethode. Bij deze immuno-elektroforese brengt men een antigenenmengsel op een bepaalde plaats in een laag van een basische agargel; hierin wordt een spanning aangelegd en nadat zich de scheiding van de verschillende componenten

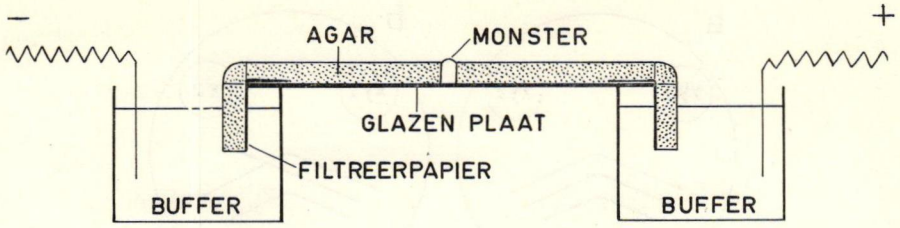


FIG. 2. Zijaanzicht van de opstelling bij de immuno-elektroforese.
Side-view of the arrangement for immuno-electrophoresis.
monster = sample

heeft voltrokken, laat men een serum inwerken. Op de plaats waar zich de componenten bevinden vormen zich precipitatie-lijntjes.

De plaats van de componenten wordt niet alleen bepaald door de verplaatsing in de richting van de anode (verschillend voor de verschillende componenten), maar ook door een verplaatsing in de richting van de kathode met de bufferstroom mee, onder invloed van de elektro-endosmose (in principe gelijk voor de verschillende componenten).

De methode van Grabar is door hem en zijn medewerkers uitvoerig beschreven en bij talrijke onderzoekingen toegepast. (GRABAR & WILLIAMS, 1955; WILLIAMS & GRABAR, 1955; KAMINSKI, 1955; URIEL, 1958). Het is mogelijk de methode te combineren met kleurreacties op de componenten (URIEL & SCHEIDEGGER, 1955, URIEL & GRABAR, 1956).

SCHEIDEGGER (1955) werkte een micromethode uit. Wunderly (1957) paste ook een kleine variatie toe en gaf een overzicht van de talrijke mogelijkheden van deze methode. KOHN (1957) combineerde de methode met zijn methode van elektroforese in een cellulose-acetaat-membraan filter, terwijl ook een combinatie mogelijk is met de methode van SMITHIES van zetmeel-elektroforese (DIXON & SMITHIES, 1957).

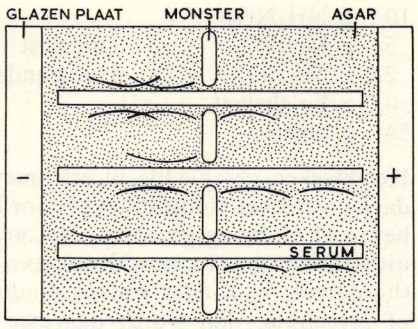
Uitvoering. 3% Bacto-agar werd opgelost in aqua dest., waaraan 20% merthiolaat (1:1000) was toegevoegd, en vermengd met een gelijk volume van een warme veronalbuffer (ionensterkte 0,05 pH 8,2) en heet gefiltreerd. Krasvrije glazen platen (12 cm lang, breedte afhankelijk van het aantal monsters), waarop een dun laagje agar was ingedroogd, werden op een horizontale onderlaag in een glazen bak gelegd. Deze onderlaag werd verkregen door in de bak eerst een 3 à 4%-ige agaroplossing te gieten. Aan twee einden van de plaat werden 3 cm brede, met buffer bevochtigde stroken „naszfest" filtreerpapier gelegd: 1 cm op de plaat en 2 cm erover heen stekend. In de bak, dus over de platen en het filtreerpapier, werd vervolgens een 4 mm dikke laag van de gebufferde agaroplossing gegoten. Na het stollen werden de platen langs de randen losgesneden en uit de bak gelicht. De over de einden heen stekende stroken filtreerpapier met agar werden langs de rand omgeklapt en de ontstane breuken met agar opgevuld (fig. 2).

In de agar werden in het midden van de plaat op een halve cm afstand van elkaar ovale putjes geponst van 15 × 3 mm (fig. 3). Deze werden gevuld met een mengsel van gelijke delen antigeen-oplossing (gedialyseerd tegen de veronalbuffer) en 3% agar. De platen werden met hun einden op de randen van de elektroforese bakken gelegd (fig. 2), waarbij de omgeklapte stroken als bufferbruggen dienst deden. Deze bakken, gemaakt van perspex waren 50 cm lang, evenals de elektroden van platinadraad, zodat een aantal platen gelijktijdig aan de elektroforese konden worden onderworpen. De veronalbuffer in de bakken werd ververst door er vanuit een voorraadfles steeds bij te laten druppelen. Er werd zo'n spanning aangelegd, dat het spanningsverschil in de agar 6 V/cm bedroeg. Na 1–1½ uur werd de stroom verbroken en werden de filtreerpapier-agar-bruggen verwijderd.

Bij elke proef werden drie platen op deze wijze behandeld. Eén werd bestemd voor de, op de elektroforese volgende immuno-reactie, de beide andere voor kleurreacties op eiwitten en polysacchariden.

In de eerste werden uit de agar 4 mm brede kanaaltjes gesneden, zoals in fig. 3 is aangegeven; deze werden gevuld met antiserum, dat dus in de agar diffundeerde in de richting loodrecht op die, waarin zich de antigenen hadden verplaatst. De platen werden in een vochtige bak gelegd. Na één of twee dagen vormden zich precipitatie-lijntjes (fig. 3) en werden de platen gefotogra-

FIG. 3. Agarplaat met precipitatie-lijntjes na de immuno-elektroforetische reactie.
Agar plate with precipitin lines after the immuno-electrophoretic reaction.



feerd. In sommige gevallen werden de lijntjes daarna gekleurd en de platen geconserveerd. Daartoe werden ze enkele dagen in een herhaaldelijk ververste fysiologische zoutoplossing uitgespoeld en vervolgens afgedekt met een goed aansluitend vochtig filtreerpapier en aan de lucht gedroogd. Als de agar geheel ingedroogd was, werd het filtreerpapier verwijderd; de platen werden onder de kraan afgespoeld om de aangehechte papiervezels te verwijderen en gedurende tenminste vier uur gedompeld in oplossing I.

I		II	
azokarmijn	1 g	indigo karmijn	1 g
azijnzuur 1 mol.	450 ml	azijnzuur 0,5 mol.	450 ml
natriumacetaat 0,1 mol.	450 ml	natriumacetaat 0,2 mol.	450 ml
glycerine	100 ml	glycerine	100 ml

De lijntjes werden dan rood gekleurd. Onduidelijke lijntjes bleven onzichtbaar. Beter verliep de kleuring door aan oplossing I een gelijk volume van oplossing II toe te voegen.[1] Zeer zwakke lijntjes bleven ook bij deze kleuring onzichtbaar. Het uitwassen van de niet vastgelegde kleurstof geschiedde met een oplossing van 2% azijnzuur en 15% glycerine in aqua dest.

Door de glycerine bleven de agarfilms soepel en konden, na gedroogd te zijn van de glazen platen worden losgemaakt en op wit karton geplakt.

De platen bestemd voor de kleuring op eiwitten werden na beëindiging van de elektroforese gedurende tenminste 4 uur gefixeerd in een oplossing van 2% azijnzuur in water. Ze werden vervolgens op dezelfde wijze gedroogd en gekleurd als de immuno-elektroforese platen; de kleuring geschiedde in een oplossing als oplossing I waarin inplaats van 1 g azokarmijn, 1 g amidoschwarz (10B) was opgelost.

Voor de kleuring op reducerende stoffen werden de platen minstens 4 uur gefixeerd in 3% azijnzuur in alcohol. De kleuring werd uitgevoerd volgens het volgende recept[1], steeds in vers bereide oplossingen;

15 min. in een oplossing van 1% perjodiumzuur in 0,2 mol. natriumacetaat.
15 min. spoelen onder de kraan.
15 min. in een mengsel van gelijke delen 0,01 mol. α-naphtol en 0,01 mol. p-phenyleendiamine, waaraan 3½% H_2O_2 (30%) was toegevoegd.
15 min. spoelen onder de kraan.

Om de agarfilms soepel te maken werden de platen vervolgens in een 15%-ige glycerine-oplossing gedompeld en daarna gedroogd en ingeplakt.

In enkele gevallen werd gekleurd op lipoiden. Daartoe werden de platen gedurende 4 uur gelegd in een verzadigde alcoholische oplossing van sudanzwart, waaraan 0,4% geconcentreerde NaOH was toegevoegd. Daarna werd uitgewassen met 50% alcohol.

4. HET KWEKEN VAN DE SCHIMMEL

a. Vliesculturen op Richard-oplossing

Grote hoeveelheden mycelium en cultuurfiltraat konden gemakkelijk worden verkregen door de schimmel te enten op een vloeibare, synthetische voedingsbodem van de volgende samenstelling:

[1] Recept verstrekt door J. URIEL, Institut Pasteur, Parijs.

10	g	NH_4NO_3
5	g	KH_2PO_4
2,5	g	$Mg\,SO_4$
0,6	g	Fe-chelaat.
54	g	glucose

Opgelost in 900 ml aqua dest., waaraan 100 ml van Hooglands A-Z oplossing was toegevoegd.

Het kweken geschiedde in erlenmeyers of cultuurflessen bij 27 °C. Na 10–14 dagen werd het cultuurfiltraat door Büchnertrechters afgefiltreerd en bij –15 °C bewaard of droog gevroren. Het mycelium werd enkele malen met aqua dest. uitgewassen en eveneens drooggevroren. Als bij de bespreking van de proeven (hoofdstuk V) zonder nadere aanduiding gesproken wordt van cultuurfiltraat of mycelium, dan wordt daarmee steeds op bovenstaande wijze verkregen materiaal bedoeld.

b. Schudculturen in Czapek-voedingsbodem

Schudculturen werden gekweekt in een synthetische voedingsbodem van de volgende samenstelling:

2	g	$NaNO_3$
1	g	KH_2PO_4
0,5	g	KCl
0,5	g	$MgSO_4$
0,3	g	Fe-chelaat
30	g	glucose

Opgelost in 900 ml aqua dest., waaraan 100 ml A–Z oplossing was toegevoegd.

De culturen werden in kolven aan een elektrische schudmachine geschud. Na 1–2 weken groei waren dichte suspensies gevormd, die door kaasdoek werden gefiltreerd om myceliumklonten te verwijderen. De filtraten werden gecentrifugeerd, de afgecentrifugeerde sporen enkele malen gewassen met fysiologisch zout en bij –15 °C bewaard.

HOOFDSTUK V

RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK

1. Inleidende proef met een fijngemalen vliescultuur

Een veertien dagen oude vliescultuur van F.o.cal werd in een gesteriliseerde kogelmortier tot een fijne brij vermalen; de nog aanwezige klontjes werden door kaasdoek afgefiltreerd en de fijne suspensie werd met fysiologisch zout 1:3 verdund. De toxiciteit van de suspensie werd onderzocht door muizen een halve ml intraveneus toe te dienen; deze ondervonden hiervan geen schadelijke gevolgen.

Vier konijnen werden acht maal intraveneus ingespoten met tussenperioden van 1 à 2 dagen, waarbij de hoeveelheden per injectie langzaam werden opgevoerd van 3 ml 1:3 tot 8 ml 1:2. Nadat een proefmonster bloed (I) afgenomen en onderzocht was, werden twee konijnen verbloed (serum C 1). De beide andere kregen na gedesensibiliseerd te zijn nog eens vijf injecties met 8 ml onverdunde suspensie, waarna weer een proefmonster bloed (II) genomen werd. Na twee maanden rust werd opnieuw een proefmonster (III) genomen en ontvingen de konijnen na gedesensibiliseerd te zijn weer twee injecties van 8 ml

per keer, gevolgd door het aftappen van proefmonster (IV). Met de proefmonsters werden precipitatiereacties uitgevoerd, waarbij als toetsantigenen gebruikt werden de heldere filtraten van gemalen en daarna gecentrifugeerde vliesculturen.

Uit de resultaten (Tabel 1) kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

a. De schimmelsuspensies zijn antigeen; de titers van de verkregen antiserums zijn nogal laag.

b. Na een rustperiode is er geen of slechts een gering „stooteffect".

c. De reactie met de controle was negatief. Bij andere proeven werd wel eens een zwakke reactie met normaal serum verkregen (alleen met onverdund serum). Werden de schaaltjes een nacht over in de ijskast bewaard, dan bleek steeds het aantal spontane uitvlokkingen met normaal serum sterk te zijn toegenomen, zodat aflezen van de reactie na 24 uur geen zin had.

TABEL 1. Homologe precipitatie-reacties van de antiserums van twee konijnen, die zijn ingespoten met gemalen vliesculturen van F. o. callistephi.
Proefmonster I: na een serie van 8 injecties;
Proefmonster II: na een meteen daaropvolgende tweede serie van 8 injecties;
Proefmonster III: na twee maanden rust;
Proefmonster IV: na een „booster"-injectie;
0: controle met normaal serum

Homologous precipitin tests of the antisera of two rabbits, immunized with homogenized surface cultures of F. o. callistephi.
Sample I: after a series of 8 injections;
Sample II: after an immediately following second series of 8 injections;
Sample III: after two months rest;
Sample IV: after a booster injection;
0: control with normal serum.

konijn *rabbit*		1308				1367				
proefmonster *sample*		I	II	III	IV	I	II	III	IV	0
serum verdunning *serum dilution*	1:1	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	–
	1:2	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	–
	1:4	++	++	+	++	++	++	++	+++	–
	1:8	+	+	+	+	+	++	++	+++	–
	1:16	+	+	+	+	+	+	+	++	–
	1:32	+	—	—	+	—	+	+	+	–
	1:64	—	—	—	—	—	+	—	+	–
	1:128	—	—	—	—	—	—	—	—	–

2. IMMUNISATIE-METHODEN

Op pag. 12 werd een overzicht gegeven van de verschillende manieren waarop de konijnen werden ingespoten. Door de grote variabiliteit van de konijnen onderling is het practisch bijna onuitvoerbaar een betrouwbaar inzicht te krijgen, welke van de vele mogelijkheden in een bepaald geval de beste is. Men zou dan immers voor elk antigeen (cultuurfiltraat, sporensuspensie, myceliumsuspensie en verschillende mycelium-extracten) inspuitschema's moeten opstellen met variaties in injectie-route (intraveneus, intramusculair, intraperitoneaal, subcutaan), hoeveelheden per injectie, frequentie der injecties (om de andere dag, eens per week, etc), de duur der immunisatie (enkele weken of enkele maanden), en toevoeging van verschillende hulpstoffen. De enkele oriënterende

proeven moeten dan ook gezien worden als controles om na te gaan, of de in het algemeen gevolgde werkwijze (een betrekkelijk korte serie elkaar snel opvolgende intraveneuze injecties) redelijk goed was.

a. Verschillende injectie-routes

Drie series van elk twee konijnen werden resp. intraveneus (in de oorvene), subcutaan (in de schouderstreek) en intramusculair (in de dijspier) veertien keer ingespoten met tussenperioden van één of twee dagen, waarbij de hoeveelheden antigeen (cultuurfiltraten van vliesculturen, door middel van droogvriezen 10:1 geconcentreerd) langzaam werden opgevoerd van 0,3 tot 1,0 ml. Tabel 2. Alle konijnen produceerden antistoffen. Op grond van deze proef kan aan geen van de drie methoden de voorkeur worden gegeven.

TABEL 2. Homologe precipitatie-reacties van serums van konijnen, die op verschillende wijze zijn ingespoten
Homologous precipitin tests of serums from rabbits immunized in different ways

wijze van injectie *route of injection*		intraveneus *intravenous*		subcutaan *subcutaneous*		intramusculair *intramuscular*	
konijn *rabbit*		*Af 1*	*Ag 1*	*Af 2*	*Ag 2*	*Af 3*	*Ag 3*
serum verdunning *serum dilution*	1:1	+	++	++	++	++	++
	2	—	++	++	+	++	++
	4	—	+	++	—	+	+
	8	—	+	+	—	+	—
	16	—	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	—	—

b. Één of meer injecties per week

Twee series van elk vier konijnen werden geïmmuniseerd met cultuurfiltraten. Één serie kreeg zes weken lang, elke week vier injecties op vier opeenvolgende dagen, waarbij de hoeveelheden langzaam werden opgevoerd van 2 tot 10 ml per injectie. De andere serie kreeg acht weken lang één injectie van 5 ml per week. Uit de resultaten (Tabel 3) blijkt, dat het de voorkeur verdient meer dan één injectie per week toe te dienen.

TABEL 3. Homologe precipitatie-reacties, na één of vier injecties per week
Homologous precipitin-tests after one or four injections a week

immunisatie *immunization*		gedurende zes weken vier injecties per week *during six weeks four injections a week*				gedurende acht weken één injectie per week *during eight weeks one injection a week*			
cultuurfiltraat van *culture liquid of*		*F. culm*		*F.o.di*		*F. culm*		*F.o.di*	
konijn *rabbit*		*At 1*	*At 2*	*At 1*	*At 2*	*At 3*	*At 4*	*At 3*	*At 4*
serum verdunning *serum dilution*	1:1	+	+	++	++	—	—	++	++
	2	+	—	++	++	—	—	+	++
	4	—	—	+	+	—	—	+	+
	8	—	—	+	+	—	—	+	—
	16	—	—	+	+	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	—	—	—	—

c. Hoeveelheden cultuurfiltraat per injectie

Twee series van twee konijnen werden drie weken lang om de andere dag ingespoten (totaal 11 injecties per konijn) met cultuurfiltraten van schudculturen. Bij de ene serie werden de hoeveelheden opgevoerd van 3 tot 5 ml, bij de andere van 3 tot 10 ml per injectie. Tabel 4. De konijnen, die met grotere hoeveelheden antigeen waren geïmmuniseerd produceerden niet meer antistoffen.

TABEL 4. Homologe precipitatie-reacties na inspuiting van verschillende hoeveelheden cultuurfiltraat per injectie
Homologous precipitin tests after injection of different quantities of culture liquid per injection

hoeveelheden per injectie opgevoerd tot *quantities per injection raised to*		*5 ml*		*10 ml*	
cultuurfiltraten van *culture liquids of*		*F.o.cal*	*F.o.pi*	*F.o.cal*	*F.o.pi*
konijn *rabbit*		*Yy 1*	*Xx 1*	*Yy 2*	*Xx 2*
serum verdunning *serum dilution*	1:1	+	++	+++	+
	2	+	+	+++	+
	4	+	+	++	+
	8	—	+	+	—
	16	—	—	—	—
	32	—	—	—	—

Na een rustperiode van vijf weken werden nog eens proefmonsters bloed afgenomen. Yy 1 en Xx 2 bleken op dat moment geen aantoonbare hoeveelheid antistoffen meer te bevatten; Bij Xx 1 was de titer teruggelopen tot een zwakke reactie met onverdund serum, bij Yy 2 tot een reactie met 1:2. Een nieuwe serie injecties met nu voor alle konijnen dezelfde hoeveelheden (drie weken lang, vier injecties per week, oplopend tot 10 ml per week) deed de titers bij Yy 1, Xx 1, Yy 2 en Xx 2 stijgen tot resp. 64, 8, 32 en 8. Deze proef werd herhaald (series Ab en Ac) met soortgelijke filtraten en eenzelfde schema als bij bovenstaande proef en daarnaast (series Ad en Ae) met iets gewijzigde schema's waarbij vier weken lang elke week vier injecties op opeenvolgende dagen werden gegeven. Tabel 5. In dit geval zijn met de grotere hoeveelheden iets betere resultaten verkregen. Twee konijnen hebben echter in het geheel geen antistoffen gevormd.

d. Sporensuspensies van verschillende dichtheid

Drie series van elk twee konijnen werden geïmmuniseerd met sporensuspensies van veertien dagen oude schudculturen. Ze kregen acht injecties van 5 ml per injectie, met tussenperioden van één of twee dagen. De dichtheden van de sporensuspensies werden gevarieerd: Met behulp van een absorptiemeter werden drie suspensies gemaakt met 10, 20 en 30 % transmissie. Met de serums werden precipitatie-reacties uitgevoerd met filtraten van gemalen vliesculturen van dezelfde schimmel. Tabel 6. Hieruit blijkt, dat ook sporensuspensies anti-

TABEL 5. Homologe precipitatie-reacties na inspuiting van verschillende hoeveelheden cultuurfiltraat per injectie

Homologous precipitin tests after injection of different quantities of culture liquid per injection

hoeveelheden per injectie opgevoerd tot *quantities per injection raised to*		*5 ml*				*10 ml*			
konijnen *rabbits*		*Ab 1*	*Ac 1*	*Ad 1*	*Ae 1*	*Ab 2*	*Ac 2*	*Ad 2*	*Ae 2*
serum verdunning *serum dilution*	1:1	+	—	+	+	+	+	+++	—
	2	+	—	+	+	+	+	++	—
	4	—	—	+	+	+	+	++	—
	8	—	—	—	—	—	—	++	—
	16	—	—	—	—	—	—	+	—
	32	—	—	—	—	—	—	—	—

geen zijn. De sporen bevatten blijkbaar antigenen, die ook in de filtraten voorkomen. De verschillen tussen de verschillende suspensie-dichtheden zijn gering.

TABEL 6. Precipitatie-reacties van serums verkregen na injectie met sporensuspensies van verschillende dichtheden, met filtraten van gemalen vliescultures als toetsantigenen

Precipitin tests of sera obtained after immunization with microconidial suspensions of different density

sporensuspensies, transmissie-% *microconidial suspensions transmission-perc.*		*10*		*20*		*30*	
konijnen *rabbits*		*Aa 1*	*Aa 1*	*Aa 2*	*Aa 2*	*Aa 3*	*Aa 3*
serum verdunning *serum dilution*	1:1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	4	+++	+++	++	+++	+++	+++
	8	+++	+++	++	+++	+++	+++
	16	+++	++	++	+++	+	++
	32	+++	++	+	++	+	++
	64	++	+	+	++	+	+
	128	+	+	+	++	—	+
	256	—	+	—	+	—	—
	512	—	—	—	+	—	—

e. Toevoeging van hulpstoffen

Lanoline-vaseline. Van een mengsel van 4 ml sporensuspensie (22 % transmissie) en 4 ml hulpstof werd de helft subcutaan bij een konijn ingespoten, de andere helft intramusculair bij een ander konijn. Na een week waren nog bijna geen antistoffen in het bloed aantoonbaar. Na anderhalve week was de titer iets toegenomen, echter zo weinig, dat in deze richting verder geen pogingen werden gedaan.

„Freund-adjuvants". Aan vijf series van vier konijnen werden intramusculair emulsies van 0,75 ml cultuurfiltraat in 0,75 ml „adjuvant" toegediend.

Hierbij werden verschillende „adjuvants" gebruikt, met fysiologisch zout als controle. Tabel 7. Na een week rust werden deze injecties gevolgd door een serie van twintig intraveneuze injecties, waarbij om de andere dag werd ingespoten, en de hoeveelheden werden opgevoerd tot 10 ml per injectie. Tengevolge van een ziekte onder de konijnen vielen vijf waarnemingen uit. De titers van de antiserums werden bepaald door precipitatie-reacties met cultuurfiltraten uit te voeren.

De verschillen met de controles (0) waren niet van die aard, dat van een duidelijk „adjuvant"-effect gesproken kan worden.

TABEL 7. Serumtiters na immunisatie met cultuurfiltraten, waaraan „Freund-adjuvants" waren toegevoegd. 0 = controle
Titers of the antisera after immunization with culture liquids to which Freund-adjuvants were added. 0 = control
Fysiologische zoutoplossing = saline

proefserie *series of rabbits* / samenstelling van de antigenen *composition of the antigens*	*0*	*I*	*II*	*III*	*IV*
ml cultuurfiltraat	0,75		0,75		0,75
ml aquaphor + tuberkelbacillen		0,75	0,75		
ml paraffine-olie + arlacel				0,75	0,75
ml fysiologische zoutoplossing	0,75	0,75		0,75	
titers	64	–	64	16	32
	–	32	32	32	–
	8	8	64	–	4
	16	–	32	16	16

3. IMMUNISATIE MET VERSCHILLENDE BESTANDDELEN VAN DE SCHIMMEL

a. Immunisatie met fijngemalen culturen

Een fijngemalen vliescultuur bevat antigenen; dit bleek uit de proef beschreven op pag. 18. Ook gemalen schudculturen bleken antigeen te zijn. Om na te gaan of de in zo'n gemalen cultuur voorkomende antigenen uit het mycelium afkomstig waren of dat ze reeds voor het malen in het cultuurfiltraat aanwezig waren, werd een precipitatie-reactie uitgevoerd met de cultuurfiltraten afzonderlijk. Tabel 8. Hierbij bleek dat in de cultuurfiltraten inderdaad al antigenen voorkwamen; na het malen nam de hoeveelheid echter toe, dus een deel werd bij het malen uit het mycelium vrijgemaakt.

b. Immunisatie met cultuurfiltraten

Dat de in de cultuurfiltraten voorkomende stoffen zelf ook antigeen zijn, bleek uit proeven, die op pag. 20 beschreven zijn. Dit geldt dus zowel voor de filtraten van vliesculturen, als voor die van schudculturen. Ook bij andere proeven werden verschillende malen met succes konijnen geïmmuniseerd met cultuurfiltraten. Zie Tabel 12 op pag. 31.

TABEL 8. Precipitatie-reacties van verschillende verdunningen van een antiserum tegen een gemalen vliescultuur (C1) met het filtraat van zo'n gemalen cultuur (H) en met cultuurfiltraten van een 14 dagen oude vliescultuur (V) en een 9 dagen oude schudcultuur (S)

Precipitin test of a dilution series of an antiserum against a homogenized surface culture (C1) with filtrate of a homogenized culture (H) and with culture liquids of a 14-day old surface culture (V) and a 9-day-old shaken culture (S)

C1		
H	*V*	*S*
+++	++	++
+++	+	+
+++	+	—
++	—	—
++	—	—
+	—	—
+	—	—
+	—	—

Zijn deze antigenen stofwisselingsproducten van de schimmel of zijn het afbraakproducten tengevolge van de autolyse? Deze vraag is moeilijk te beantwoorden, omdat stofwisseling en autolyse gelijktijdig in hetzelfde milieu plaats vinden en elkaar beïnvloeden. Uit verschillende proeven is gebleken dat de antiserums tegen cultuurfiltraten reageerden met uit mycelium geëxtraheerde stoffen. Zie bijv. Tabel 14. op pag. 37. De reactie met de extracten was dikwijls zelfs heviger. De in de filtraten en extracten aanwezige antigenen komen dus overeen, althans voor een deel. Dit wijst in de richting van autolyse, evenals de volgende proef.

Twee maal zes culturen van F.o.cal werden op verschillende tijdstippen op 25 ml Richard-voedingsbodem geënt en geoogst toen ze resp. 5, 6, 8, 10, 15 en 17 dagen oud waren. Bij de 5 dagen oude culturen bedekte de myceliummat nog niet de gehele vloeistof, bij die van zes dagen was dat wel het geval, terwijl bij die van acht dagen het autolyse-proces kennelijk op gang was. Van de ene serie culturen werden de myceliumvliezen afgefiltreerd, met fysiologisch zout gewassen, droog gevroren en gewogen. Van de cultuurfiltraten werden verdunningsreeksen gemaakt. De andere zes culturen werden in een mixer gemalen; na twee uur extractie bij kamertemperatuur werd gefiltreerd en van deze filtraten werden eveneens verdunningsreeksen gemaakt. Er werden precipitatiereacties uitgevoerd met verschillende verdunningen van het antiserum C 1. Tabel 9.

In de filtraten van 5 dagen oude culturen kwamen nog geen antigenen voor, hoewel toen wel stofwisselingsproducten aanwezig hadden kunnen zijn. Het myceliumgewicht nam daarna nog toe en was bij de zes dagen oude culturen misschien al over zijn maximum; op dat moment waren in elk geval al antigenen aanwezig. De concentratie van de antigenen nam daarna nog toe, hoewel de schimmelgroei al was opgehouden en de autolyse op volle gang was. Niet duidelijk is waarom deze concentratie niet bleef toenemen met de (wel langzamer) voortschrijdende autolyse. Het is mogelijk, dat een gedeelte van de stoffen bij verdere afbraak zijn antigeniteit weer verliest. De reacties met de filtraten van gemalen culturen vertoonden een soortgelijk beeld. Duidelijk bleek, dat door

het fijnmalen stoffen waren vrijgemaakt, die aan de reactie deelnamen, want de reactie was hier veel sterker, dan met de afzonderlijke filtraten.

TABEL 9. Titers van antiserum C1 bij precipitatie reacties met cultuurfiltraten en filtraten van gemalen culturen van verschillende ouderdom
Titers of antiserum C1 in precipitin tests with culture liquids and filtrates of homogenized cultures of different age

ouderdom cultuur in dagen *age of culture in days*	gewicht *weight*	cultuurfiltraten *culture liquids*					filtraten van gemalen culturen *filtrates of homogenized cultures*				
	mg	*1/1*	*1/10*	*1/20*	*1/40*	*1/80*	*1/1*	*1/10*	*1/20*	*1/40*	*1/80*
5	315	–	–	–	–	–	8	–	–	–	–
6	493	4	2	–	–	–	32	16	–	–	–
8	389	16	8	–	–	–	64	32	8	–	–
10	320	16	8	–	–	–	64	64	16	8	–
15	261	16	16	–	–	–	64	32	16	8	–
17	234	16	8	–	–	–	64	64	32	16	–

c. Immunisatie met geconcentreerde cultuurfiltraten

De titers van de antiserums waren over het algemeen laag. Dit zou een gevolg kunnen zijn van te lage concentraties van de antigenen, waarmee werd ingespoten. Om deze te verhogen, werden cultuurfiltraten droog gevroren en in kleine hoeveelheden water weer opgelost. Om de eveneens geconcentreerde zouten te verwijderen, werd gedialyseerd tegen fysiologisch zout. Een moeilijkheid bij deze werkwijze was, dat de droogresten niet helemaal bleken op te lossen, ook niet in alkalische fosfaatbuffers. Waarschijnlijk moet dat geweten worden aan denaturering van eiwitachtige stoffen, tijdens het droogvriezen. (Ook in cultuurfiltraten, die niet werden droog gevroren ontstond na enige dagen bewaren in ijskast of vrieskast meestal enig neerslag).

De titers van antiserums verkregen na injectie met 50–100 keer geconcentreerde cultuurfiltraten waren echter niet hoger dan die na injectie met niet-geconcentreerde cultuurfiltraten.

d. Immunisatie met sporensuspensies

Dat ook de microconidiën antigeen zijn, bleek al uit de proef, die op pag. 21 is besproken. Indien de sporensuspensies met zorg werden bereid, zodat er geen klontjes in de suspensies voorkwamen, konden de sporen zonder gevaar intraveneus worden ingespoten.

Uit bovengenoemde proef bleek, dat in de sporen dezelfde antigenen voorkomen als in de cultuurfiltraten. Of er daarnaast nog andere antigenen in de sporen voorkomen, die niet in de cultuurfiltraten aanwezig zijn, kon niet worden uitgemaakt. Er werden verschillende pogingen ondernomen om de sporen te verbrijzelen om zo de daarin aanwezige antigenen in oplossing te brengen, echter zonder resultaat. Noch een gewone mortier, noch een glasmortier met een ingeslepen, bij hoog toerental draaiende stamper, noch zelfs ultrasonore golven mochten baten.[1]

[1] Bij de proeven met ultrasonore golven werd medewerking verleend door Ir. H. de Zeeuw van de Technisch-Physische Dienst TNO-TH in Delft.

e. Immunisatie met suspensies van fijngemalen mycelium

Uit bovengenoemde proeven bleek reeds, dat in het mycelium serologisch actieve stoffen voorkomen. Dat deze stoffen zelf antigeen zijn, werd vastgesteld door suspensies en extracten (zie f.) van het mycelium in te spuiten. Myceliumvliezen van op 150 ml Richard-oplossing gegroeide schimmels werden met aqua dest. uitgespoeld, vervolgens 48 uur met overmaat aqua dest. in de ijskast gezet, en daarna met fysiologisch zout nagespoeld. Het mycelium werd in een CEKA-ultramixer tot een fijne brij vermalen en deze brij met fysiologisch zout tot het oorspronkelijk volume van 150 ml aangevuld. Met deze suspensies werden konijnen geïmmuniseerd: vier weken lang elke week vier injecties op opeenvolgende dagen, terwijl de hoeveelheden per injectie langzaam werden opgevoerd van 1–5 ml; bij één serie werden alle injecties intraperitoneaal toegediend en bij een andere serie alleen elke week de eerste injecties intraperitoneaal, en de andere intraveneus. Met beide methoden werden antiserums met behoorlijke titers verkregen (1:64). Deze antiserums reageerden zowel met de filtraten, die werden verkregen, nadat uit de suspensies het mycelium was verwijderd, als met cultuurfiltraten van de schimmel.

f. Immunisatie met mycelium-extracten

Extractie met 0,85% NaCl. Myceliumsuspensies bereid op de wijze als onder *e* is aangegeven, alleen anderhalf maal zo dicht, werden 36 uur in de ijskast geëxtraheerd. De myceliumdeeltjes werden afgecentrifugeerd en daarna werd door glasfilters (G4) gefiltreerd. Met de verkregen heldere, bruine extracten werden konijnen geïmmuniseerd op dezelfde wijze als met de suspensies. De konijnen verdroegen ook de extracten goed, hoewel minder goed dan de cultuurfiltraten. Waarschijnlijk was dit een gevolg van een hogere concentratie van de antigenen in de extracten. Er werd dan ook maximaal 5 ml per injectie gegeven. De verkregen antiserums reageerden op dezelfde wijze als die, welke na immunisatie met suspensies werden verkregen.

Extractie met 10% NaCl in fosfaatbuffer (pH = 7,3). Omdat in de, op bovenstaande wijze bereide extracten nogal eens een neerslag ontstond bij het bewaren van de antigenen, werden ook enkele series konijnen geïmmuniseerd met elke week vers bereide extracten. Hierbij werd uitgegaan van gewassen, droog gevroren mycelium. De eerste week werd 1 g mycelium met 50 ml 10% NaCl in fosfaatbuffer (pH = 7,3)geëxtraheerd, de tweede week $1\frac{1}{2}$ g met dezelfde hoeveelheid extractie-vloeistof, de derde en vierde week $1\frac{1}{2}$ g met 30 ml vloeistof. Na twee uur extraheren werd het mycelium afgecentrifugeerd en het filtraat in nauwe dialyse-„darmen" 24 uur tegen fysiologisch zout gedialyseerd. De titers van de antiserums tegen deze extracten verschilden niet veel van die tegen extracten met 0,85% NaCl.

g. Vergelijking van de titers van een aantal serums

In tabel 12 (zie pag. 31) zijn een groot aantal serums gerangschikt en is aangegeven volgens welke van de beschreven immunisatie-methoden ze zijn verkregen. Deze serums werden op verschillende tijdstippen gewonnen en steeds meteen getitreerd, waarbij als toetsantigenen de homologe antigenen werden gebruikt of in gevallen, waar dit niet mogelijk was (bij de serums tegen de sporensuspensies bijv.), filtraten van gemalen vliesculturen. Aangezien steeds

andere toetsantigenen werden gebruikt, zijn de hierbij gevonden titers, weergegeven in kolom A, niet vergelijkbaar. Daarom werden ook nog eens gelijktijdig precipitatie-reacties uitgevoerd met dezelfde toetsantigenen, in dit geval cultuurfiltraten van negen dagen oude vliesculturen. Uit de twee laatste kolommen van tabel 12 blijkt, dat de titers weliswaar variëren, maar dat deze variatie over alle immunisatiemethoden verdeeld is, zodat wat betreft de antistofproductie aan geen van de methoden de voorkeur kan worden gegeven.

h. Geldiffusie van filtraten en extracten

Met de geldiffusie-methode kunnen we een indruk krijgen van het aantal componenten in de filtraten en de extracten en het verband tussen deze twee.

In agarplaatjes (28 mm diam.) werden drie putjes geponst (8,5 mm diam.); hiervan werd één gevuld met serum, één met cultuurfiltraat van een 14 dagen oude vliescultuur en één met een extract van 1 g mycelium in 25 ml fysiologisch zout, gemalen in een omnimixer en 18 uur geëxtraheerd. Zie foto 1.

De beelden die we op deze wijze met verschillende serums krijgen, zijn tamelijk gecompliceerd, wat er op wijst, dat zowel in de filtraten als in de extracten veel componenten aanwezig zijn. Het antiserum L 9 tegen cultuurfiltraat van F.o.lup bevat antistoffen tegen minstens vier componenten uit het cultuurfiltraat; alle vier komen ook voor in het extract. Het serum L 3, tegen een sporensuspensie van dezelfde schimmel, bevat antistoffen tegen een geringer aantal componenten, terwijl de serums L 17, P 17 en C17 tegen mycelium-extracten weer antistoffen tegen meer componenten bevatten. Het aantal componenten, waartegen antistoffen gevormd zijn, lijkt in de extracten groter te zijn dan in de filtraten, terwijl de in de filtraten voorkomende antigenen ook in de extracten voorkomen. Ten opzichte van L 3 lijkt de situatie echter omgekeerd te zijn; het is mogelijk, dat alle drie lijnen tussen L 3 en l_f ombuigen in de brede diffuse lijn tussen L 3 en l_e.

Uit de afwezigheid van een lijntje tussen filtraat en serum kan niet zonder meer de conclusie worden getrokken, dat de betreffende component afwezig is; de concentratie kan te laag zijn om een zichtbaar lijntje te geven. In elk geval blijkt duidelijk, dat filtraten en extracten verschillende componenten gemeen hebben en dat in antiserums tegen cultuurfiltraten, sporensuspensies en mycelium-extracten antistoffen voorkomen tegen antigenen in filtraten en extracten.

Zijn de antistoffen in de drie verschillende soorten antiserums gericht tegen gedeeltelijk dezelfde componenten of tegen steeds weer verschillende, met andere woorden, zijn drie van de vier lijntjes tussen l_f en L 9 identiek met die tussen l_f en L3 of moeten we aannemen, dat er in totaal zeven componenten zijn, tegen vier waarvan antistoffen in L9 voorkomen, terwijl in L3 antistoffen tegen de andere drie voorkomen? Dit werd onderzocht door bij een soortgelijke geldiffusie-proef als boven, twee putjes met serum en één met antigeen te vullen. Foto 2.

Minstens twee van de in L3 voorkomende antistoffen komen overeen met antistoffen uit L9 en L17. L9 en L17 hebben in elk geval drie antistoffen gemeen. Dit blijkt vooral uit de reacties met het extract. In alle drie antiserums komen echter ook antistoffen voor, die in de andere blijkbaar ontbreken.

De hier gegeven beelden en getallen kunnen niet al te absoluut opgevat worden, maar moeten meer gezien worden als een momentopname. Bij voortschrijdende diffusie wijzigen de beelden zich soms enigszins, terwijl ook bij dezelfde reagentia onder verschillende omstandigheden kleine verschillen naar voren komen.

4. Serologische verschillen tussen de *formae speciales*

a. Agglutinatie-reacties

Microconidiën van *F. oxysporum* bleken in aanwezigheid van een antiserum te agglutineren, dit zelfs tot op zeer hoge verdunningen van het antiserum (1:4096). Bij een controle met fysiologisch zout bleek deze agglutinatie niet op te treden, echter wel bij een controle met normaal serum. Blijkbaar zijn er in het serum niet-specifieke stoffen aanwezig, die agglutinatie kunnen veroorzaken. Ook myceliumdeeltjes in een fijngemalen mycelium-suspensie agglutineerden met normaal serum zowel als met antiserum.

Er werden verschillende pogingen gedaan om deze niet-specifieke agglutinatie te voorkomen. Wassen van de mycelium-suspensies met aceton had geen effect: ook na de behandeling met aceton bleven de deeltjes met hoge verdunningen van het normaal serum agglutineren.

Getracht werd de niet-specifieke stoffen uit het antiserum te verwijderen. Na elektroforese bij pH 8,3 van 1:5 verdund serum werden enkele fracties verkregen, die een sterk verminderde agglutinatie vertoonden (1:160). De overeenkomstige fracties van normaal serum waren echter nog niet geheel vrij van de niet-specifieke stoffen, hoewel de reactie hiermee wel minder hevig was als met het antiserum.

Dit zou er op kunnen wijzen dat in het serum in elk geval specifieke agglutininen voorkwamen. Getracht werd dit te bevestigen door in een aantal serums de γ-globulinen neer te slaan. Aan het serum werd 30 % verzadigde ammoniumsulfaat toegevoegd, het neerslag afgecentrifugeerd, opgelost in fysiologisch zout en tegen fysiologisch zout gedialyseerd. Met de op deze wijze ruwweg gezuiverde oplossingen van γ-globulinen werden nog agglutinatie-reacties verkregen, echter ook met die van normaal serum.

De pogingen om met behulp van de agglutinatie-reacties *formae speciales* van *Fusarium oxysporum* te scheiden bleven dus zonder resultaat. Corpaci (1925) en Matsumoto (1928) hadden soortgelijke ervaringen met *Aspergillus species* en Tempel (1958) met sporen van *Pullularia pullulans* en *Polyspora lini.*

b. Precipitatie-reacties

Bij proeven beschreven in § 3 bleek, dat in de antiserums precipitinen voorkomen, die niet in normaal serum aanwezig zijn. De vraag rijst onmiddellijk in hoeverre deze precipitinen specifiek zijn voor de *formae speciales.*

Alle antiserums reageerden niet alleen met de *formae speciales* waartegen ze geproduceerd waren, maar eveneens met de andere *formae speciales.*

Antiserums tegen gemalen vliescultuur van F.o.cal (C1a en C1b) reageerden bijv. met filtraten van gemalen culturen als in tabel 10 is weergegeven.

Blijkbaar hebben de toetsantigenen één of meer componenten gemeen. De reactie lijkt overigens toch specifiek, immers met de homologe toetsantigenen is de reactie sterker dan met de heterologe. Dit kan echter verband houden met de concentraties van de antigenen. Bij deze proef waren de toetsantigenen bereid uit culturen, die onder precies gelijke omstandigheden waren gekweekt. Het is echter heel goed mogelijk, dat de schimmels varieerden in groeisnelheid en dat F.o.cal meer antigenen heeft geproduceerd dan de andere *formae speciales.* De toetsantigenen zouden eigenlijk op een betere wijze moeten worden gestandaardiseerd bijv. langs chemische of colorimetrische weg. De aard van de antigenen

moet dan bekend zijn. Aangezien we echter met een ingewikkeld mengsel van antigenen te maken hebben (zie pag. 27), terwijl deze antigenen in chemisch opzicht bovendien nog verschillen (zie pag. 44), wordt deze methode zo niet onuitvoerbaar, dan toch zeer ingewikkeld.

TABEL 10. Precipitatie-reacties van antiserums tegen gemalen vliesculturen van *F. o. callistephi* (C1a en C1b) met filtraten van gemalen culturen van verschillende *formae speciales*
Precipitin tests of antisera against homogenized surface cultures of F .o. callistephi (C1a en C1b) *with filtrates of different* formae speciales

filtraten van *culture liquids of*		*F.o.cal*		*F.o.lup*		*F.o.na*		*F.o.pi*	
antiserums *antisera*		*C1a*	*C1b*	*C1a*	*C1b*	*C1a*	*C1b*	*C1a*	*C1b*
serum verdunning	1	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++
serum dilution	2	+++	++	+++	++	++	++	++	++
	4	+++	++	++	++	++	+	+	+
	8	++	++	++	++	+	+	+	+
	16	++	++	+	+	+	+	+	+
	32	+	+	—	+	—	+	+	+
	64	+	+	—	—	—	—	—	+
	128	+	+	—	—	—	—	—	—
	256	—	—	—	—	—	—	—	—

Om toch met behulp van de precipitatie-reactie een indruk van de specificiteit te verkrijgen, moet men de reacties steeds reciprook uitvoeren. Reageert een antiserum A tegen schimmel a sterker met het toetsantigeen van a, dan met dat van een andere schimmel b, dan zegt dat nog weinig. Reageert echter daarnaast antiserum B tegen b sterker met b dan met a, dan is aangetoond dat de antiserums specifiek zijn.

Steeds werden dan ook naast elkaar verschillende series konijnen met verschillende *formae speciales* op dezelfde wijze geïmmuniseerd. De antiserums werden dan met de verschillende antigenen getoetst. Tabel 11 geeft daarvan een voorbeeld. De antiserums reageerden ongeveer even sterk met de verschillende toetsantigenen, en waren dus wat betreft de intensiteit van de reactie, noch ten opzichte van de filtraten, noch ten opzichte van de extracten specifiek.

TABEL 11. Titers van antiserums tegen *F.o.lupini* en *F.o.pisi* bij precipitatie-reacties met cultuurfiltraten van vliesculturen (resp. 1_f en p_f) en met mycelium-extracten (1_e en p_e) van dezelfde schimmels
Titers of antisera against F.o.lupini *and* F.o.pisi *in precipitin tests with culture liquids of surface cultures (1_f and p_f, resp.) and extracts of mycelium (1_e and p_e, resp.) of the same fungi*

serum *serum*	toetsantigenen *test antigens* tegen *against*	van *from*	1_f	p_f	1_e	p_e
Ao 1351	mycelium-suspensie	F.o.lup	16	32	16	16
Ao 1352	mycelium-suspensie	F.o.lup	16	32	32	16
Ap 1396	mycelium-extract	F.o.lup	32	32	64	32
Ap 1452	mycelium-extract	F.o.lup	32	32	32	32
Aq 1439	mycelium-suspensie	F.o.pi	64	64	64	64
Aq 1310	mycelium-suspensie	F.o.pi	32	32	32	16
Ar 1427	mycelium-extract	F.o.pi	32	32	32	32
Ar 1429	mycelium-extract	F.o.pi	32	32	64	32

De serums werden nadat ze gewonnen waren altijd meteen getitreerd. Van een groot aantal serums zijn de hierbij gevonden titers in tabel 12 onder A weergegeven. Omdat hierbij steeds gebruik werd gemaakt van verschillende toetsantigenen, zijn deze getallen onderling niet vergelijkbaar. Daarom werden met deze serums ook nog eens gelijktijdig homologe en heterologe precipitatiereacties uitgevoerd met cultuurfiltraten van negen dagen oude vliesculturen. Tabel 12, onder B.

De som van de titers van de verschillende serums met een bepaald toetsantigeen gaf ons een indruk van de hoeveelheid antigenen die daarin voorkwam. Deze bleek vrij sterk te variëren: de filtraten van F.o.tul 2 en F.o.cal bevatten de geringste hoeveelheden antigenen. Deze hoeveelheden bleken weinig verband te houden met de gewichten van de myceliumvliezen, die op de filtraten aanwezig waren.

In het algemeen reageerden de antiserums homoloog niet sterker dan heteroloog. Wat betreft de precipitatie-reacties zijn ze dus niet specifiek. Dit sluit echter de mogelijkheid niet uit, dat onder de vele antistoffen, die de meeste serums bevatten (zie pag. 27) toch nog één of meer specifiek zijn, maar waarvan de specificiteit gemaskeerd wordt door de niet-specifieke antistoffen, die met antigenen van alle *formae speciales* kunnen reageren. Eén van de methoden om dit na te gaan is de klassieke methode van *verzadigen* (zie pag. 6). Pogingen in deze richting hadden weinig resultaat, omdat de serums te zwak waren, om met succes verzadigings-reacties te kunnen uitvoeren. Een andere methode is de geldiffusie-reactie, die wel uitvoerbaar bleek te zijn.

c. Geldiffusie-reacties

Van drie putjes (2,5 mm diam.) in een kleine agarplaat (18 mm diam.) werd één gevuld met serum tegen cultuurfiltraat van F.o.pi (P2), één met cultuurfiltraat van F.o.cal (c) en de derde met cultuurfiltraat van F.o.pi (p). De putjes werden enkele keren bijgevuld. Uit het verloop van de ontstane lijntjes (foto 3) blijkt, dat het antiserum naast antistoffen tegen verschillende componenten, die in beide filtraten voorkomen, specifieke antistoffen bevat tegen een component, die alleen in het filtraat van F.o.pi voorkomt.

Soortgelijke specifieke reacties werden verkregen bij een proef waarbij de andere *formae speciales* als heterologe antigenen werden gebruikt (fig. 4).

Bij deze proef kwamen twee specifieke lijnen te voorschijn; het is mogelijk, dat het lijntje verdubbeld is onder invloed van het bijvullen van de putjes. Bij andere proeven werd het bijvullen zoveel mogelijk vermeden, of werd alleen bijgevuld als de putjes nog niet geheel opgedroogd waren.

Foto 4 vertoont de resultaten van reciproke reacties tussen de serums C1 tegen F.o.cal en P2 tegen F.o.pi met de cultuurfiltraten van deze schimmels. Deze reactie werd uitgevoerd in een agarlaag op de bodem van een petrischaal, waarin putjes van 3,5 mm diam. op onderlinge afstanden van 11 mm werden geponst. Tussen P2 en het homologe filtraat p bevindt zich weer een specifieke lijn, die tussen P2 en het heterologe filtraat c niet met de niet-specifieke lijnen mee ombuigt. Bij de reciproke reactie zou zich op de overeenkomstige plaats tussen C1 en c een specifieke lijn moeten bevinden. De zich daar bevindende lijn lijkt inderdaad niet om te buigen; de reactie is echter veel minder duidelijk. Als er dus specifieke antistoffen in het serum C1 voorkomen, dan ligt de verhouding tussen de specifieke en de niet-specifieke antistoffen veel ongunstiger.

TABEL 12. Titers van een aantal antiserums bij precipitatie-reacties met verschillende antigenen.
A. Homologe reacties van de proefmonsters.
B. Homologe en heterologe reacties met cultuurfiltraten van negen dagen oude vliesculturen.

Titers of a number of antisera in precipitin tests with different antigens.
A. *Homologous reactions of the blood samples.*
B. *Homologous and heterologous reactions with culture liquids of nine-day-old surface cultures.*

gemalen vliescultuur = *homogenized surface culture* schudcultuur = *shaken culture* gewicht mycelium = *weight of mycelium.*

antiserum *antiserum*	tegen *against*	van *from*	A	B							
				F.o.cal	F.o.lup	F.o.na	F.o.pi	F.o.tul 1	F.o.tul 2	Hoogste titer	som
C 1	gemalen vliescultuur	F.o.cal	128	4	4	8	4	4	2	8	26
P 2	filtraat van schudcultuur	F.o.pi	32	4	4	4	8	4	4	8	28
C 3	sporensuspensie	F.o.cal	32	8	16	16	16	16	8	16	80
L 3	,,	F.o.lup	8	2	16	8	8	8	8	16	50
N 3	,,	F.o.na	32	0	32	32	32	32	32	32	160
P 3	,,	F.o.pi	16	8	8	8	8	8	8	8	48
T_1 3	,,	F.o.tul 1	32	2	16	16	16	16	16	16	82
T_2 3	,,	F.o.tul 2	32	2	16	16	8	8	8	16	58
C 5	filtraat van schudcultuur	F.o.cal	4	8	8	8	8	8	4	8	44
L 5	,, ,,	F.o.lup	16	4	8	4	8	4	4	8	32
P 5	,, ,,	F.o.pi	8	0	4	0	0	0	0	4	4
C 6	,, ,,	F.o.cal	32	32	64	32	16	16	8	64	168
L 10	filtraat van vliescultuur	F.o.lup	64	32	32	32	32	32	16	32	176
P 10	,, ,,	F.o.pi	64	32	32	32	32	32	16	32	176
L 13	mycelium-suspensie	F.o.lup	64	16	32	16	16	8	8	32	96
P 13	,, ,,	F.o.pi	64	16	16	16	16	8	4	16	76
L 14	mycelium-extract	F.o.lup	64	8	32	8	8	8	4	32	64
P 14	,,	F.o.pi	64	16	32	16	8	8	4	32	84
D 16	geconcentreerd cultuurfiltraat	F.o.di	64	0	2	16	16	8	32	32	74
C 17	vers mycelium-extract	F.o.cal	32	16	16	16	16	32	4	32	100
L 17	,, ,,	F.o.lup	32	16	16	16	16	8	4	16	76
P 17	,, ,,	F.o.pi	64	64	32	32	64	32	8	64	232
normaal serum				0	1	0	0	0	0	1	1
som				290	449	352	356	300	202		1949
gewicht mycelium in grammen				3,1	3,1	2,8	3,4	2,6	1,8		

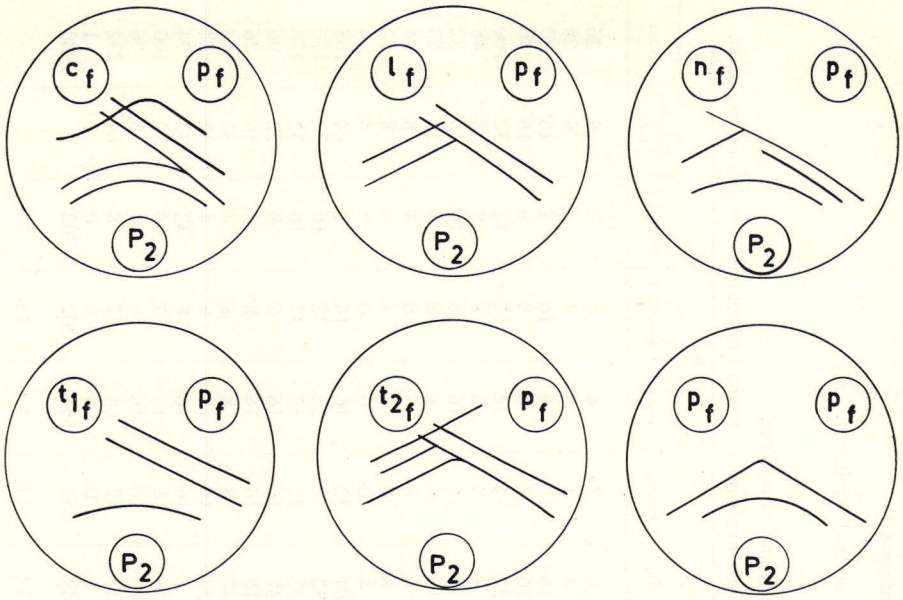


FIG. 4. Specifieke geldiffusie-reacties van het serum P 2 (tegen cultuurfiltraat van *F.o.pisi*), met antigenen uit cultuurfiltraten van *F.o.pisi* (p_f), *F.o.callistephi* (c_f), *F.o.lupini* (1_f), *F.o.narcissi* (n_f) en *F.o.tulipae* (t 1_f en t 2_f).

Specific line patterns of the gel diffusion precipitin tests of serum P 2 (against culture liquid of F.o.pisi), *with antigens from culture liquids of* F.o.callistephi (c_f), F.o.lupini (1_f), F.o.narcissi (n_f) *and* F.o.tulipae (t 1_f *and* t 2_f).

Ook de andere serums werden volgens de geldiffusie-methode op hun specificiteit onderzocht. De serums L3 tegen sporensuspensie van F.o.lup en L5 tegen cultuurfiltraat van F.o.lup reageerden specifiek. De andere serums waren niet specifiek; een aantal hiervan was op dezelfde wijze verkregen als de specifieke serums.

Met de specifieke serums P2 en L3 werden verschillende proeven gedaan, o.m. om na te gaan, waarop de specificiteit berust. Zie ook pag. 50.

Specifieke remmingsreactie. Foto 5 geeft de resultaten van de specifieke remmingsreactie volgens BJÖRKLUND (1952). Hierbij reageerden P2 en L3 met cultuurfiltraten van F.o.lup (l) en F.o.pi (p). In het middelste agarplaatje zijn de lijntjes te zien, die gevormd zijn in gewone agargel. Beide serums reageerden specifiek. In het plaatje rechts boven (+p) werd na het gieten van het plaatje de nog vloeibare agar gemengd met een weinig cultuurfiltraat van F.o.pi ($\frac{1}{2}$ ml antigeen op 2 ml agar). Dit had later bij de reactie tot gevolg, dat de antistoffen tegen p niet in de agar konden diffunderen en meteen in een halo rondom het serumputje (P2) precipiteerden. Met de niet-specifieke antistoffen van L3 gebeurde hetzelfde, de specifieke daarentegen vormden een specifiek precipitatielijntje op dezelfde plaats als in de onverzadigde agar. De reciproke reactie (+ l) geeft het omgekeerde te zien. De halo rondom P 2 is erg wijd, wat er op wijst, dat in serum P2 tamelijk veel niet-specifieke antistoffen voorkomen; binnen deze halo is het specifieke lijntje tussen P2 en p echter nog duidelijk zichtbaar.

Fraaier nog zijn de resultaten na menging van de agar met serum inplaats van met antigeen. De halo's verschenen nu rondom de putjes met antigeen. Na verzadiging met L3 (+ L3) vormden zich grote halo's rondom de putjes met l en kleine rondom die met p. De specifieke antigenen van p zijn echter ongehinderd door de agar gediffundeerd en hebben met hun antistoffen een specifiek lijntje gevormd. Verzadiging met P2 gaf weer het omgekeerde beeld te zien: tussen L3 en 1 werden nu twee specifieke lijntjes gevormd. Uit deze reactie blijkt nog eens duidelijk de specificiteit van de serums. Het gaat hierbij om een specificiteit ten opzichte van verschillende stoffen en niet om specificiteit ten opzichte van delen van één molecuul, waartegen ook niet-specifieke antistoffen gevormd zijn. In dit geval zouden deze moleculen immers al in de halo's zijn neergeslagen en zou er geen specifieke reactie zijn overgebleven na het mengen met één van de componenten.

Culturen van verschillende leeftijd. Om na te gaan of de ouderdom van de schimmelculturen belangrijk is voor het winnen van cultuurfiltraten, waarin de specifiek reagerende antigenen voorkomen, werden in kleine agarplaten reacties uitgevoerd tussen de specifieke serums en filtraten van culturen die gedurende één week, twee weken, vier maanden en elf maanden bij 27 °C hadden gestaan. De vier en elf maanden oude culturen waren reeds in een ver gevorderd stadium van autolyse; er was echter in alle culturen nog mycelium aanwezig. Met al deze filtraten werden specifieke reacties verkregen. Bij de filtraten van de jonge culturen waren de lijntjes ten opzichte van L3 zwakker dan die van de oude culturen, en ze bevonden zich dichter bij de antigeen-putjes, wat wijst op een lagere concentratie. De concentratie van de specifieke antigenen ten opzichte van P2 was in de oude culturen afgenomen.

Invloed van pH, dialyse en formol. Er werden agargelen bereid in Michaëlis-buffers van verschillende pH's. Er was geen verschil te bespeuren in de reacties, die plaats vonden bij pH 4,7, 7,0 en 8,2. Dialyse van de cultuurfiltraten in cellofaanzakjes tegen fysiologisch zout, was niet van invloed op de reactie. Cultuurfiltraten waaraan 0,5 % formol was toegevoegd reageerden nog wel met L3 echter niet meer met P2. Toevoeging van formol is dus geen geschikte methode om toetsantigenen lange tijd te bewaren.

Specificiteit ten opzichte van mycelium-extracten. Uit proeven, beschreven op pag. 23 e.v. bleek, dat de antiserums niet alleen reageerden met cultuurfiltraten, maar ook met extracten van het mycelium. Wat betreft de specificiteit van de antiserums P2 en L3 ten opzichte van mycelium-extracten bleek uit proeven in agargel, dat P2 minder duidelijk specifiek reageerde met extracten uit het mycelium dan met cultuurfiltraten. L3 reageerde echter ook met de extracten zeer specifiek.

Proeven met stammen van F.o.pi, Om na te gaan of het antiserum P2 alleen specifiek reageerde met de stam van F.o.pi, waartegen het serum geproduceerd was (p0), of dat het ook specifiek reageerde met andere stammen van F.o.pi, werden de rassen van F.o.pi, die door SNYDER en HANSEN (1940) *F. oxysporum* f. *pisi* ras 1 en *F. oxysporum* f. *pisi* ras 2 genoemd zijn, opgevraagd uit de schimmelcollectie in Baarn en eveneens uit de collectie van de Planteziektenkundige Dienst in Wageningen.

Foto 6 geeft de reactie weer tussen P2 en filtraten van p0, van de fysio's uit Baarn (p1 en p2) en van F.o.lup (1). Het antiserum reageerde specifiek met alle stammen van F.o.pi. Van de stammen van de P.D. (p3 en p4, resp. F.o.pi ras 1 en F.o.pi ras 2, zie foto 7) gaf p3 slechts een zeer zwakke reactie te zien; p4 gaf wel de specifieke lijn, die echter de lijn met p0 kruiste. Alle stammen van F.o.pi werden daarna getoetst op hun pathogeniteit ten opzichte van het erwteras Rondo, dat vatbaar is voor F.o.pi ras 1 en F.o.pi ras 2. (Het verschil tussen F.o.pi ras 1 en F.o.pi ras 2 kon niet worden getoetst, omdat geen erwteras verkrijgbaar was, dat voor een van deze schimmelrassen wel en voor de andere niet vatbaar was). Hierbij bleek, dat p3 niet meer pathogeen was, de andere stammen (p0, p1, p2, p4) daarentegen wel. Hiermee zou het ontbreken van het specifieke lijntje met p3 te verklaren zijn. Het kruisen van de lijntjes, die gevormd werden met p0 en met p4 wijst op een gering verschil tussen de antigenen, voorkomende in de filtraten van deze stammen; of dit verschil min of meer toevallig is ontstaan, door bijvoorbeeld een gedeeltelijke afbraak van de antigenen, of dat het teruggevoerd moet worden tot een bestaand verschil tussen deze stammen, werd niet nader onderzocht.

5. Aard van de antigenen

De in de cultuurfiltraten en mycelium-extracten voorkomende stoffen met antigene eigenschappen kunnen uit het protoplasma of uit de celwand van de schimmel afkomstig zijn. In verband met hun antigene eigenschappen kan verwacht worden dat het proteinen, polysacchariden of lipoiden zijn met een moleculair gewicht van 10.000 of hoger. Dergelijke hoogmoleculaire stoffen zijn niet in staat bij dialyse in een cellofaanzakje tegen fysiologisch zout of water, de wand te passeren. Bij verschillende proeven is gebleken dat dit inderdaad niet het geval is. Dat laagmoleculaire haptenen (stoffen die niet antigeen zijn, maar wel met antistoffen reageren) evenmin de dialysewand passeerden bleek uit de volgende proef: 2500 ml cultuurfiltraat werd droog gevroren en weer opgelost in 100 ml water, vervolgens 24 uur gedialyseerd tegen 850 ml fysiologisch zout. Indien haptenen de wand gepasseerd waren moesten deze dus in voldoende hoge concentratie in de buitenvloeistof aanwezig zijn, om aantoonbaar te zijn. Dit was echter niet het geval, zodat zonder gevaar voor verlies van reagerende stoffen gedialyseerd kon worden. Dit was bij de hier volgende proeven dikwijls noodzakelijk om na concentratie een overmaat aan zouten kwijt te raken.

Dat in 11 maanden oude culturen nog antigenen voorkomen (zie pag. 33) wijst erop, dat althans een deel van de antigenen tamelijk stabiel moet zijn. In het serum L3 bleken zelfs antistoffen voor te komen tegen antigenen, die de inwerking van formol doorstonden (zie pag. 33). Eiwitten zijn hiertegen niet bestand. Men zou hierbij dus kunnen denken aan hoogmoleculaire polysacchariden of lipo-polysacchariden (Boivin-antigenen).

Teneinde iets meer te weten te komen over de aard van de antigenen werden verschillende temperatuur- en kleurreacties uitgevoerd en werden de antigenenmengsels immuno-elektroforetisch onderzocht. Ook werden verschillende extracten uit mycelium bereid en een gedeelte van de antigenen uit cultuurfiltraten gezuiverd. Deze werden chromatografisch onderzocht. Uitvoerige chemische analyses werden niet uitgevoerd.

a. Warmtebehandeling van de antigenen

Het doel van de warmtebehandeling was na te gaan of de antigenen thermostabiel dan wel thermolabiel zijn. In de serologie betekent thermostabiel: resistent tegen verhitting op 55–60 °C gedurende 30–60 minuten (BOYD, 1956).

Bij een inleidende proef werden van myceliumextracten en van cultuurfiltraten van F.o.cal en F.o.pi monsters in een waterbad een half uur op 50 °C en andere een half uur op 100 °C verwarmd. Van deze antigenen werden verdunningsreeksen in fysiologisch zout gemaakt, waarmee precipitatie-reacties werden uitgevoerd met de antiserums C3 en P3 (tegen sporensuspensies). De reacties bleken voor en na de warmtebehandeling precies gelijk te zijn. In de antiserums komen blijkbaar antistoffen voor tegen een of meer thermostabiele componenten in de antigenenmengsels. Dat dit niet altijd het geval is, bleek uit een andere proef, waarbij gedialyseerd cultuurfiltraat van F.o.cal, dat tot op een verdunning 1:16 reageerde met serum C17, na verhitting op 100 °C gedurende een half uur, helemaal niet meer bleek te reageren. Aanvankelijk werd gedacht, dat dit een gevolg zou zijn van het dialyseren. Allerlei laagmoleculaire stoffen, die bij een warmtebehandeling de coagulatie van eiwitten kunnen tegengaan (SCHMIDT, 1951), zouden bij de dialyse verwijderd kunnen zijn. Zoals uit de volgende proeven zal blijken, moet de verklaring van de schijnbaar tegenstrijdige resultaten van bovenstaande proeven echter niet in de antigenen, maar in de serums gezocht worden (pag. 37). In verband met de hierboven weergegeven definitie van thermostabiliteit werd bij de volgende proeven een uur op 60 °C inplaats van een half uur op 50 °C verhit.

In tabel 13 is een samenvatting gegeven van de resultaten van een aantal proeven, waarbij naast onbehandelde cultuurfiltraten, filtraten waren betrokken, die een uur bij 60 °C en andere die een uur bij 100 °C hadden gestaan. Van alle filtraten werden verdunningsreeksen in fysiologisch zout gemaakt en hiermee werden precipitatie-reacties met onverdunde serums uitgevoerd.

TABEL 13. Titers van een aantal antiserums bij precipitatie-reacties met verdunningsreeksen van cultuurfiltraten
n = onbehandeld 60 = een uur bij 60 °C 100 = een uur bij 100 °C

Titers of a number of antisera in precipitin tests with dilution series of culture liquids
n = not treated 60 = treated one hour at 60 °C 100 = treated one hour at 100 °C

serums *sera*	antigenen *antigens* / tegen *against*	cultuurfiltraten van / *culture liquids of*								
		F.o.lup			*F.o.pi*			*F.o.di*		
		n	60	100	n	60	100	n	60	100
Cu 16	cultuurfiltraat							8	4	0
D 16	„							4	1	0
L 13	mycelium-suspensie	32	8	4	2	0	0	4	0	0
P 13	„	8	0	0	8	2	0			
L 14	mycelium-extract	16	4	0	4	0	0			
P 14	„	8	4	0	8	1	0			
L 17	„	64	64	32	8	2	0	4	0	0
P 17	„	4	1	0	8	0	0			
L 3	sporensuspensie	4	16	16	0	0	0	0	0	0
P 3	„	64	64	32	32	32	32	32	32	16
$T_1$3	„	32	32	32	32	32	4	32	32	16

Uit de reacties met serums tegen cultuurfiltraten en tegen mycelium-extracten en -suspensies blijkt, dat in de filtraten thermolabiele componenten voorkomen: filtraten die op 60 °C zijn verhit reageren veel zwakker dan onbehandelde filtraten, terwijl op 100 °C verhitte filtraten in de meeste gevallen in het geheel niet meer reageren: alleen de op 100 °C verhitte filtraten van F.o.lup reageren nog met L 13 en L 17, dus met serums die tegen F.o.lup gericht zijn. Dit wijst in de richting van een specifieke thermostabiele component. Bij de reciproke reacties van op 100 °C verhitte filtraten van F.o.pi werden met P 13 en P 17 echter geen precipitatie-vlokken verkregen. Hier was de specifieke thermostabiele component dus niet aanwezig, of waren in de serums geen antistoffen tegen deze componenten gevormd.

Uit de reacties met de serums tegen sporensuspensies blijkt, dat in de filtraten naast thermolabiele ook thermostabiele componenten voorkomen: de op 100 °C verhitte filtraten reageren alle drie vrij sterk met deze serums. De reactie is in sommige gevallen wel zwakker dan van de onbehandelde filtraten. Dit kan verband houden met het verdwijnen van de thermolabiele componenten. Het serum L 3 reageert alleen met filtraten van F.o.lup. De specificiteit van dit serum was ook reeds gebleken bij de geldiffusie-reacties.

Samenvattend kunnen de hier verkregen resultaten als volgt verklaard worden. In de filtraten komen thermolabiele en thermostabiele componenten voor. In de hier gebruikte serums tegen cultuurfiltraten en mycelium-extracten en -suspensies komen alleen antistoffen voor tegen de thermolabiele componenten: ze reageren dus niet meer, als de filtraten een warmtebehandeling hebben ondergaan. In de serums tegen sporen-suspensies daarentegen is het grootste gedeelte van de antistoffen gericht tegen de thermostabiele componenten: deze serums blijven dus ook met de behandelde filtraten reageren.

Nu kunnen ook de schijnbaar tegengestelde resultaten van de eerste proeven, die in deze paragraaf beschreven zijn, verklaard worden: de serums C 3 en P 3 (tegen sporensuspensies) bevatten veel antistoffen tegen thermostabiele componenten, het serum C 17 (tegen een gemalen vliescultuur) daarentegen weinig. Met de immuno-elektroforetische onderzoekingen konden de hier verkregen resultaten bevestigd en aangevuld worden (zie pag. 49).

Werd bij de hier beschreven proeven de invloed van een warmtebehandeling op het gedrag van de antigenen bij een precipitatie-reactie nagegaan, een andere vraag is of behandelde antigenen nog in staat zijn antistoffen bij konijnen op te wekken; met andere woorden, is (zijn) de thermostabiele component(en) een volledig(e) antigeen (-genen) of een hapteen(-tenen)? De behandelde en niet-behandelde filtraten van F.o.lup uit de proef behorende bij tabel 13 werden gecentrifugeerd, en met de heldere filtraten werden drie series van twee konijnen ingespoten; de konijnen kregen een korte serie van 9 injecties, waarbij de hoeveelheden werden opgevoerd van 3 tot 8 ml per injectie, terwijl om de andere dag werd ingespoten.

Uit de resultaten (tabel 14) blijkt, dat de thermostabiele stoffen, die in de op 100 ° C verhitte filtraten blijkens de reactie met de serums L 3, P 3 en $T_1$3 nog volop aanwezig zijn, practisch niet meer antigeen zijn. Ook bij twee andere proeven, waarbij in beide gevallen twee konijnen werden geïmmuniseerd met op 100 °C verhitte filtraten, werden geen antistoffen verkregen, terwijl ook deze filtraten met de serums tegen sporensuspensies reageerden (titers 64 en 32). De thermostabiele stoffen kunnen dus niet verantwoordelijk zijn voor de, tegen de op 60 °C verhitte filtraten gevormde antistoffen. Dit blijkt ook uit het uitblijven

TABEL 14. Precipitatie-reacties van serums tegen cultuurfiltraten, die een warmtebehandeling hebben ondergaan.
l_n, l_{60} en l_{100}, cultuurfiltraten van *F.o.lupini*, resp. onbehandeld, 1 uur bij 60 °C en 1 uur bij 100 °C behandeld; l_e, mycelium-extract van *F.o.lupini*

Precipitin tests of sera against culture liquids which were subjected to a temperature treatment.
l_n, l_{60} *and* l_{100}, *culture liquids of* F.o. lupini *not treated, treated one hour at 60 °C and treated one hour at 100 °C, resp.;* l_e, *mycelium extract of* F.o. lupini

serum *serum*	L 20a				L 20b				L 21a			
tegen *against*	l_n				l_n				l_{60}			
toets-antigenen *test antigens.*	l_n	l_{60}	l_{100}	l_e	l_n	l_{60}	l_{100}	l_e	l_n	l_{60}	l_{100}	l_e
	+++	+++	–	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	–	+++
	+++	+++	–	+++	+++	++	–	++	+	+++	–	+++
	+	+	–	++	++	+	–	++	+	++	–	+
	–	–	–	+	+	+	–	+	+	+	–	+
	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

serum *serum*	L 21b				L 22a				L 22b			
tegen *against*	l_{60}				l_{100}				l_{100}			
toets-antigenen *test antigens.*	l_n	l_{60}	l_{100}	l_e	l_n	l_{60}	l_{100}	l_e	l_n	l_{60}	l_{100}	l_e
	+	++	–	+++	+	–	–	–	+	+	+	+
	+	++	–	+++	–	–	–	–	+	–	–	–
	+	+	–	++	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

van een reactie met op 100 °C verhitte filtraten (l_{100}). Blijkbaar zijn in de op 60 °C verhitte filtraten nog voldoende „thermolabiele" stoffen aanwezig om even sterke antiserums op te wekken als de onverhitte filtraten. Volgens de boven gegeven definitie van thermostabiliteit moeten deze stoffen dus ook thermostabiel genoemd worden, hoewel ze verhitting op 100 °C niet verdragen (zie ook pag. 45).

In geen van de serums, ook niet in de serums tegen de onbehandelde antigenen, komen antistoffen voor tegen de thermostabiele stoffen, die in de op 100 °C verhitte filtraten aanwezig zijn. We hebben hier dus niet met volledige antigenen, maar met haptenen te maken. Dergelijke haptenen komen niet alleen in de filtraten, maar ook in de mycelium-extracten voor. Immers ook de mycelium-extracten reageerden blijkens de eerste in deze paragraaf vermelde proef na verhitting op 100 °C onverminderd met de serums tegen sporensuspensies. Hoe is het mogelijk, dat in de serums tegen de sporensuspensies wel antistoffen tegen deze haptenen aanwezig zijn? De meest voor de hand liggende

verklaring is dat de haptenen in de sporen op een of andere wijze aan een drager gebonden zijn, zodanig dat het complex antigeen is, dus op dezelfde wijze als dat bij sommige bacteriële polysacchariden het geval is.

b. Kleurreacties en concentratie van de antigeenoplossingen

Cultuurfiltraten en mycelium-extracten vertoonden altijd een positieve reactie van Molisch, wat wijst op de aanwezigheid van reducerende stoffen in de oplossingen. Een biureet-reactie op de aanwezigheid van eiwitten was in verband met de bruine kleur van de oplossingen vaak moeilijk vast te stellen. Deze reactie is trouwens nogal ongevoelig. Werden de oplossingen geconcentreerd dan was de biureet-reactie dikwijls zwak positief.

Cultuurfiltraten werden geconcentreerd door ze droog te vriezen en de droogrest in een klein volume water weer op te lossen; deze oplossing werd gedialyseerd om de eveneens geconcentreerde zouten te verwijderen. Hierbij bleek steeds een gedeelte van de droogrest niet weer op te lossen. Omdat dus bij het droogvriezen kennelijk bepaalde stoffen denatureerden, werd ook wel een andere methode van concentratie gevolgd, die van de zogenaamde evaporatie: de filtraten werden daartoe in nauwe cilindervormige cellofaan-„darmen" gebracht, in de luchtstroom van een ventilator gehangen en tot op een klein volume ingedampt. Ook hierbij ontstond echter meestal een neerslag, zij het minder dan na droogvriezen. Deze methode heeft echter het nadeel, dat het bij kamertemperatuur geschiedt, waarbij veranderingen kunnen optreden. Ook in niet-geconcentreerde filtraten en extracten ontstond na verloop van tijd meestal spontaan enig neerslag. Het is dus heel goed mogelijk, dat de eiwitten en eventueel lipoiden op deze wijze voor het grootste gedeelte uit de oplossingen verdwenen.

Van enkele geconcentreerde filtraten en extracten werden de neerslagen afgecentrifugeerd. De oplossingen vertoonden een zwak positieve biureet-reactie en een positieve reactie van Molisch. Een weinig van de vloeistoffen werd met een gelijk volume van een 3 %-ige agaroplossing gemengd: de mengsels werden in putjes van een agarplaat gebracht. Twee van dergelijke agarplaten werden gefixeerd in 2 % azijnzuur en vervolgens werd de een met amidoschwarz en de ander met sudanzwart gekleurd op de wijze zoals op pag. 17 is aangegeven. De reactie met amidoschwarz was positief, die met sudanzwart negatief. In de oplossingen waren dus nog proteinen aanwezig, terwijl lipoiden niet aangetoond konden worden. Als controle op de sudanzwart kleuring werden van somatische typhus-antigenen (lipopolysaccharide) 1, 2 en 4 mg in agarputjes van 0,15 ml gebracht en op dezelfde wijze gekleurd. Deze kleurden resp. zwak blauw, zwak blauw en blauw. De afgecentrifugeerde neerslagen werden in fysiologisch zout gewassen en gesuspendeerd en hiermee werden dezelfde bewerkingen uitgevoerd: van de suspensies was de biureet-reactie zwak positief, de reactie van Molisch positief, de amidoschwarz-kleuring positief en de sudanzwart-kleuring negatief.

c. Precipitatie en extractie van de antigenen

Bij de pogingen, die werden gedaan om de antigenen uit de oplossingen neer te slaan, werd er van uitgegaan, dat het eiwitten en/of polysacchariden waren: voor het neerslaan van eiwitten werden aan de oplossingen toenemende hoeveelheden (tot 60 %) van een verzadigde ammoniumsulfaat-oplossing toege-

voegd of een gelijk volume van een 10 %-ige trichloorazijnzuur oplossing (TCA). Polysacchariden of eventueel glycoproteinen werden neergeslagen met alcohol, waarbij uiteraard ook de eiwitten werden neergeslagen. In deze paragraaf wordt een overzicht gegeven van de verschillende preparaten die uit het mycelium en uit de cultuurfiltraten werden verkregen, terwijl de met deze preparaten uitgevoerde immuno-elektroforetische onderzoekingen in een aparte paragraaf worden besproken (zie pag. 41).

Cultuurfiltraten. Niet-geconcentreerde cultuurfiltraten gaven met ammoniumsulfaat en TCA weinig of geen neerslag. Toevoeging van 60 % alcohol gaf wel enig neerslag, dat in water weer oploste en serologisch actief was.

Door de toevoeging van TCA werden wel bepaalde stoffen geïnactiveerd. Cultuurfiltraten van F.o.lup en F.o.pi, waaraan TCA was toegevoegd en die vervolgens werden gedialyseerd en gecentrifugeerd reageerden alleen nog maar met de serums tegen sporensuspensies. Hiervan was het serum L3 specifiek: het reageerde alleen met filtraten van F.o.lup, en gaf geen enkele reactie meer met dat van F.o.pi. De specifieke stoffen kwamen zowel in filtraten van vliesculturen, als in die van schudculturen voor.

Vijftig maal geconcentreerde cultuurfiltraten gaven met ammoniumsulfaat heel langzaam een licht vlokkig neerslag, terwijl met TCA, na geruime tijd staan, een zeer fijn neerslag werd gevormd. Toevoeging van alcohol gaf spontaan een grote hoeveelheid kleverig, geel-bruin neerslag: dit begon al neer te slaan bij 30 % alcohol, terwijl het na toevoeging van meer alcohol toenam.

Aan 40 en 20 ml van 50 maal geconcentreerde filtraten van resp. F.o.cal en F.o.di werd 80 % alcohol toegevoegd: de neerslagen werden bij hoog toerental afgecentrifugeerd. De taai-stroperige substantie loste bijna volledig in water op, waarna het opnieuw werd neergeslagen. Dit werd enkele malen herhaald. De neerslagen gaven in 10 resp. 5 ml aqua dest. opgelost, heldere bruin gekleurde oplossingen, die 48 uur werden gedialyseerd, waarbij de bruine kleurstof grotendeels uit de oplossingen verdween. De oplossingen waren Molisch +, het dialysaat Molisch –.

Van F.o.lup werd 10 ml 20 maal geconcentreerd filtraat op dezelfde wijze behandeld. Om eventueel in de oplossing nog aanwezige eiwitten te verwijderen, werd gedurende een half uur geschud met een mengsel van 5 ml chloroform en 1 ml butylalcohol. Daarna werd 5 minuten bij laag toerental gecentrifugeerd: er ontstonden drie lagen: onder in de buis een heldere laag chloroform-butylalcohol mengsel, daarboven een laag troebele emulsie (waarin zich de uitgeschudde stoffen bevonden) en daarboven een heldere waterige oplossing. Deze heldere oplossing werd gedecanteerd en hiermee werd de bewerking vijf keer herhaald (zuivering van polysacchariden naar HEIDELBERGER *et al.*, 1936). De heldere oplossing, die nog steeds geelbruin van kleur was, was Molisch + en vertoonde precipitatie-reacties met de serums P2, L3, P3, L10, P10, L14, P14, L17, C17, niet met P17. Na 45 min. bij 60 °C te hebben gestaan was de reactie nog dezelfde gebleven.

Aangezien de op deze wijze verkregen gezuiverde antigenen vermoedelijk dezelfde zijn als de thermostabiele stoffen, die in op 100 °C verhit cultuurfiltraat aanwezig bleken te zijn, werd ter vergelijking ook nog een preparaat als volgt bereid: 100 ml cultuurfiltraat van F.o.pi werd gedurende 1 uur op 100 °C verhit, vervolgens door middel van evaporatie geconcentreerd tot 1 ml en gedialyseerd.

Mycelium-extracten in een NaCl-oplossing. Mycelium-extracten werden bereid door per gram gewassen en droog gevroren mycelium 40 ml van een 10 %-ige NaCl-oplossing in fosfaatbuffer (pH = 7,3) toe te voegen, dit in de „Servall omnimixer" 3 minuten op volle toeren te malen, enkele uren te extraheren, het mycelium af te centrifugeren en vervolgens tegen fysiologisch zout te dialyseren. In sommige gevallen werd direct in fysiologisch zout geëxtraheerd, wat het voordeel heeft, dat minder lang gedialyseerd hoeft te worden, terwijl de concentratie van de geëxtraheerde stoffen niet lager leek te zijn.

Extracten gaven met ammoniumsulfaat, met TCA en met alcohol neerslagen. Met alcohol werden veel grotere hoeveelheden precipitaat verkregen dan met de andere reagentia.

Aan een extract van 7 g mycelium van F.o.pi in 140 ml fysiologisch zout werd 50 % van een verzadigde ammoniumsulfaat-oplossing toegevoegd. Het neerslag (A) werd afgecentrifugeerd en aan het extract werd opnieuw ammoniumsulfaat toegevoegd (tot 66 %); er ontstond weer enig neerslag (B). A en B werden opgelost in fysiologisch zout (daarbij loste niet alles op) en gedialyseerd. De oplossing van A vertoonde een zwakke, die van B een sterkere reactie met L 14 en P 14. De proteinen A en B behoren dus tot het complex van antigenen van de schimmel. De stoffen zijn in deze min of meer gezuiverde vorm erg labiel: in de oplossingen ontstond spoedig enig neerslag. Immunisatie van konijnen met dergelijke oplossingen leverde serums op met lage titers (homoloog resp. 1:8 en 1:16). Deze serums reageerden zwak met cultuurfiltraten van F.o.lup en F.o.pi.

Vierhonderd ml extract van F.o.pi werd door middel van evaporatie tot 15 ml ingedampt en vervolgens gedialyseerd. Hierbij sloeg een deel van de geëxtraheerde stoffen neer; dit werd afgecentrifugeerd. Het heldere bruine extract was Molisch +. Aan 7½ ml hiervan werd 15 ml verzadigde ammoniumsulfaat-oplossing toegevoegd: het hierna gevormde neerslag werd meteen afgecentrifugeerd en weer opgelost in 2 ml water en tegen veronalbuffer gedialyseerd. Het extract waaruit de eiwitten waren neergeslagen werd eveneens gedialyseerd en tot 5 ml geconcentreerd. Al deze handelingen werden bij lage temperatuur uitgevoerd.

Extractie met loog. Aan suspensies van 2½ g fijngemalen mycelium van F.o.cal en F.o.pi in 50 ml water werden gelijke volumina 2 % KOH toegevoegd. Er werd 40 uur geëxtraheerd, waarbij af en toe werd geschud, vervolgens gecentrifugeerd, gefiltreerd door een G4 glasfilter, gedialyseerd tegen water en geëvaporeerd tot 12 ml. Bij deze handelingen sloeg slechts een geringe hoeveelheid van de geëxtraheerde stoffen spontaan neer. De geconcentreerde, opalescente, iets groenachtige oplossingen waren biureet + en Molisch +. De in de oplossing aanwezige eiwitten waren niet antigeen: konijnen produceerden geen antistoffen als ze met dergelijke loogextracten werden ingespoten. Waarschijnlijk zijn de eiwitten onder invloed van de KOH zodanig veranderd, dat ze weliswaar stabieler geworden zijn in de oplossing, maar hun serologische activiteit hebben verloren. Het is ook van andere eiwitten bekend, dat ze met loog alkalische metaproteinen vormen, wat de antigene activiteit sterk doet afnemen (BOYD, 1956).

Extractie met TCA. Hierbij werd een extractieprocedure gevolgd, zoals die door BOIVIN & MESROBEANU (1935) werd uitgewerkt voor de extractie van lipo-polysacchariden van gramnegatieve bacteriën. Aan suspensies van 2½ g

fijngemalen mycelium van F.o.cal en F.o.pi in 50 ml aqua dest. werd een gelijk volume van een vers bereide 10 %-ige TCA-oplossing toegevoegd. Na 1½ uur schudden werd gecentrifugeerd, en aan het heldere, iets groenachtige extract 5 ml 5n NaOH toegevoegd, vervolgens werd het met enkele druppels NaOH op pH = 7,0 gebracht. Na dialyse tegen water werd geëvaporeerd tot 12 ml: hierbij ontstond nog enig neerslag, dat werd afgecentrifugeerd. De heldere, lichtgroene extracten waren Molisch + en vertoonden precipitatie-reacties met de serums C3 en P3 (tegen sporensuspensies) en niet met L10 en P10 (tegen cultuurfiltraten) en evenmin met C14 en P14 (tegen mycelium-extracten).

Toevoeging van overmaat alcohol gaf een fijn wit neerslag, dat werd afgecentrifugeerd, drooggedampt en weer opgelost in 2 ml water.

Immunisatie van konijnen met TCA-extracten leverde geen antistoffen op. Hieruit blijkt, dat de geëxtraheerde stoffen niet te vergelijken zijn met de zogenaamde Boivin-antigenen, die zeer antigeen zijn.

De met TCA neergeslagen proteinen bleken in fysiologisch zout gedeeltelijk weer op te lossen en waren uit deze oplossing met ammoniumsulfaat weer neer te slaan. Ze waren serologisch weinig actief, waarschijnlijk als gevolg van de denaturerende invloed van het TCA.

Extractie met kokend water. Indien onder de antigenen polysacchariden voorkomen, moeten deze met kokend water te extraheren zijn. Myceliumsuspensies werden één uur op 100 °C gebracht en gecentrifugeerd: de heldere extracten werden 30 maal geconcentreerd. De concentraten waren Molisch +.

Extractie met phenol. Bij de extractie met zoutoplossingen ging steeds een belangrijk deel van het mycelium (celwandresten) niet in oplossing. Dergelijke myceliumresten werden op drastische wijze met phenol geëxtraheerd. Na extractie van 10 g mycelium van F.o.pi in 10 %NaCl werden de myceliumresten afgecentrifugeerd en in water geresuspendeerd (met behulp van een bij hoog toerental draaiende „ultra turrax") en weer afgecentrifugeerd. Dit werd drie maal herhaald, waarna de rest op een waterbad bij 60 °C werd gedroogd. Van de oorspronkelijke 10 g mycelium bleek ongeveer de helft over te zijn. De droge koek werd in een mortier fijngewreven en hieraan werd ongeveer twee maal het volume phenol toegevoegd. Dit werd op een waterbad bij 60 °C opgesmolten, waarbij een dikke bruine, niet geheel heldere, stroperige massa gevormd werd. Hieraan werd vijf maal het volume (200 ml) water toegevoegd. Er ontstond een vuilgrijze suspensie. De niet in water oplosbare stoffen werden afgecentrifugeerd. Het heldere extract werd gedialyseerd en tot 5 ml ingedampt: het was Molisch + en gaf geen neerslag met TCA.

d. Immuno-elektroforetische onderzoekingen

Bij immuno-elektroforese van niet-geconcentreerde filtraten en extracten werden in sommige gevallen enkele vage lijntjes, in andere daarentegen in het geheel geen lijntjes gevormd. De antigeen-concentratie was voor dit doel te laag. Alle te onderzoeken monsters werden daarom 20–50 keer geconcentreerd.

Bij het interpreteren van de resultaten en vooral bij vergelijking met de resultaten van de precipitatie- en geldiffusie-reacties moet met het volgende rekening worden gehouden:

1. Bij het concentreren van de oplossingen met de daarop volgende dialyse traden steeds verliezen op in de vorm van onoplosbare neerslagen en moge-

lijk ook in de vorm van laagmoleculaire splitsingsproducten; 20–50-voudige concentratie wil dus nog niet zeggen, dat in de oplossingen 20–50 keer zoveel antigenen aanwezig waren. Het neerslaan van sommige producten kon niet worden voorkomen door bij lage temperaturen te werken of door de pH boven 7 te houden.

2. Bij het mengen van de monsters met vloeibare agar van ongeveer 50 °C kunnen eveneens veranderingen zijn opgetreden.
3. Om technische redenen konden niet alle proeven gelijktijdig worden uitgevoerd, zodat de afbraak- en denaturatie-verschijnselen door variaties in de omstandigheden niet steeds dezelfde geweest zullen zijn.
4. De te onderzoeken monsters werden midden op de plaat aangebracht en vervolgens anderhalf uur aan een spanningsverval van 6 V/cm onderworpen. De verschillende componenten verdeelden zich daarbij over de gehele plaat, dus zowel in de richting van de positieve pool (in de figuren en foto's naar beneden), als in de richting van de negatieve pool; bij de verplaatsing in de richting van de negatieve pool speelde ongetwijfeld de elektro-endosmose een grote rol (zie pag. 16). Voor het gemak van de bespreking werden de platen van boven naar beneden verdeeld gedacht in zes stroken a, b, c, d, e, en f. Aan deze schematische indeling mag geen principiële betekenis worden toegekend, in de zin dat er van zes streng te onderscheiden stoffen sprake zou zijn, elk met een verschillende beweeglijkheid. Integendeel, de verdeling van de verschillende stoffen was meestal continu; ook op de grenzen van de zones werden wel componenten aangetroffen. Als er dus gesproken wordt van een component bij b, dan wil dat alleen maar zeggen, dat het met deze component gevormd lijntje, zijn grootste kromming heeft ergens in de zone b, terwijl de uitlopers zich tot in a en c kunnen bevinden.

α. Cultuurfiltraten. In foto 8 en fig. 5 zijn de resultaten weergegeven van de immuno-elektroforese van twintig maal geconcentreerde cultuurfiltraten van F.o.lup. Blijkens de verschillende plaatsen waar lijntjes gevormd zijn, bevat het filtraat minstens vier componenten, die zich bevinden bij a, b, d en f: bij a reageerden L10, P14 en zwakker L14, bij b: L14, bij d: L10, L14 en P14 en bij f: L3. Op de verschillen tussen de antiserums wordt later in deze paragraaf (zie pag. 49) uitvoeriger ingegaan, maar in verband met de bespreking is het van belang hier te wijzen op het verschil tussen de serums tegen sporensuspensies, zoals L3, enerzijds en die tegen filtraten (L10) en extracten (L14 en P14) anderzijds: de laatste reageerden nooit met de bij f voorkomende component. Het diffuse karakter van het lijntje, dat L3 met deze component vormt, wijst erop dat deze niet homogeen is, maar bestaat uit een polydispers mengsel. Het lijntje zette zich bij andere proeven meestal naar boven toe voort tot bij a, terwijl het dikwijls nog weer samengesteld leek te zijn uit verschillende lijntjes (zie ook fig. 6 en 8). Ook in andere opzichten werden bij andere proeven wel afwijkende resultaten gevonden van wat in foto 8 is weergegeven. Dit zal aan de hand van deze foto worden besproken.

Het lijntje bij a zet zich vaag voort tot bij d. De hierbij behorende antigeencomponent heeft zich dus niet kwantitatief naar a verplaatst. Hij werd bovendien niet in alle filtraten aangetroffen, meestal wel in die van F.o.lup en F.o.di, soms bij F.o.tul, minder vaak bij F.o.cal en niet bij F.o.pi. Hier kan echter geen principiële betekenis aan worden toegekend met het oog op verschillen tussen *formae speciales*, want serums tegen F.o.cal en F.o.pi reageerden wel met deze

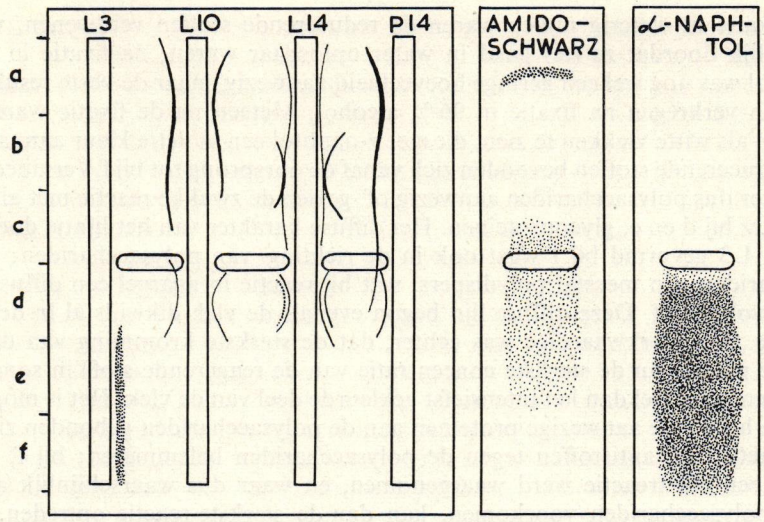


FIG. 5. Immuno-elektroforese van geconcentreerd cultuurfiltraat van *F.o.lupini*.
L 3, serum tegen sporensuspensie van *F.o.lupini*
L 10, serum tegen cultuurfiltraat van *F.o.lupini*
L 14, serum tegen mycelium-extract van *F.o.lupini*
P 14, serum tegen mycelium-extract van *F.o.pisi*.
Immuno-electrophoresis of concentrated culture liquids of F.o.lupini.
L 3, *serum against microconidial suspension of* F.o.lupini
L 10, *serum against culture liquid of* F.o.lupini
L 14, *serum against mycelium extract of* F.o.lupini
P 14, *serum against mycelium extract of* F.o.pisi.

component. Bij b werd zeer dikwijls een component aangetroffen, vooral bij filtraten van F.o.cal en F.o.pi; verder bij F.o.lup steeds in de gevallen, waarin bij a geen component aanwezig was; soms was bij a en b gelijktijdig een component aanwezig. In foto 8 is bij c geen lijntje te zien; bij andere proeven, ook met filtraten van F.o.lup was dit echter dikwijls wel het geval. Zeer algemeen was de aanwezigheid van een component bij d; soms werden hier zelfs verschillende lijntjes gevormd. Bij e werden soms ook één of meer lijntjes aangetroffen. De polydisperse component bij e en f tenslotte, werd in alle filtraten aangetroffen. Het aantal lijntjes en de plaats van deze lijntjes was, ook bij filtraten van dezelfde *forma specialis*, nogal aan variaties onderhevig. Dit betekent, dat de componenten in het antigenenmengsel in fysisch opzicht nogal variabel waren.

Met de gelijktijdig uitgevoerde kleurreacties waren niet alle componenten duidelijk te karakteriseren. Met amidoschwarz werden slechts zeer zwakke kleuren verkregen (foto 8): de component bij a gaf een smalle blauwe band, terwijl verder bij c en d vage blauwe zones werden waargenomen, die zich soms tot bij e uitstrekten; de kleuring was hier te zwak om fotografisch reproduceerbaar te zijn. Deze kleuring wijst op de aanwezigheid van eiwitachtige stoffen, die òf in zeer lage concentratie aanwezig zijn, òf slecht met amidoschwarz kleuren.

Met sudanzwart kleurde geen van de componenten. Lipoiden waren dus waarschijnlijk niet aanwezig.

Met α-naphtol werd een zeer duidelijke kleuring verkregen (foto 8), mits de platen vooraf gefixeerd weren in alcohol, waaraan 3 % azijnzuur was toegevoegd.

Na fixatie in waterig milieu waren de reducerende stoffen verdwenen, waarschijnlijk doordat ze (te) goed in water oplosbaar waren; na fixatie in 50 % alcohol was nog wel een geringe hoeveelheid aanwezig, maar de beste resultaten werden verkregen na fixatie in 96 % alcohol. Meteen na de fixatie waren de stoffen als witte vlekken te zien, die met α-naphtol een violette kleur aannamen. De reducerende stoffen bevonden zich vanaf de oorsprong tot bij f. Vermoedelijk zijn hier dus polysacchariden aanwezig of, gezien de zwakke reactie met amidoschwarz bij d en e, glycoproteinen. Het diffuse karakter van het lijntje door het serum L3 gevormd bij f wijst ook in de richting van polysacchariden: polysacchariden zijn meestal polydispers, wat bij reactie in agargel een diffuse lijn tot gevolg heeft. Deze diffuse lijn begon evenals de vlek dikwijls al in de oorsprong. Het merkwaardige was echter, dat de sterkste kromming van de lijn (op de plaats van de sterkste concentratie van de reagerende stof) in sommige gevallen lager viel dan het intensiefst gekleurde deel van de vlek. Het is mogelijk dat de bij d en e aanwezige proteinen aan de polysacchariden gebonden zijn en de reactie met antistoffen tegen de polysacchariden belemmeren; bij f, waar nooit een eiwitreactie werd waargenomen, en waar dus waarschijnlijk alleen vrije polysacchariden voorkomen, kan dan de sterkste reactie optreden. Een andere mogelijkheid is, dat er twee (of meer) verschillende stoffen in het spel zijn: enerzijds reducerende stoffen met een maximum bij e, die serologisch helemaal niet reageren of verantwoordelijk zijn voor de lijntjes bij d en e, en anderzijds zuivere polysacchariden, die de andere stof gedeeltelijk overlappen, maar waarvan het maximum lager ligt. Om deze laatste mogelijkheid te onderzoeken werden monsters van geconcentreerde cultuurfiltraten van F.o.cal en F.o.di gedurende drie uur, dus tweemaal zolang als bij de andere proeven, aan elektroforese onderworpen om op deze wijze een scheiding tussen de eventuele componenten te bewerkstelligen. De monsters werden daartoe hoger aangebracht, ongeveer bij a. Er werd op deze wijze echter geen scheiding verkregen: de diffuse lijntjes met serums tegen sporensuspensies breidden zich nu uit over de gehele lengte van de plaat; bij F.o.cal lag het maximum van de vlek hoger dan de grootste kromming van de lijn; bij F.o.di lag het maximum van de vlek echter lager en op dezelfde hoogte als de grootste kromming van de lijn. Dit wijst dus niet in de richting van twee afzonderlijke stoffen. Een aanwijzing in de richting van de eerste hypothetische mogelijkheid was ook nog het feit, dat het cultuurfiltraat van F.o.cal bovendien nog scherpe lijntjes gaf bij d en e (met de serums C1, D15 en D16), terwijl dat van F.o.di hier geen lijntjes gaf; als de reactie bij d en e opgevat wordt als een reactie met het eiwitachtige deel van de molecuul (zie ook pag. 43) dan wijst dit erop dat in het filtraat van F.o.cal deze eiwitten wel en in dat van F.o.di daarentegen niet aanwezig waren.

Polysacchariden zijn onoplosbaar in alcohol. Van de opgeloste alcoholprecipitaten van F.o.cal, F.o.di en F.o.lup (zie pag. 39) kon dus verwacht worden, dat de polysacchariden hier in min of meer zuivere vorm aanwezig waren. Het karakter van deze neerslagen (taai-kleverige substantie, goed oplosbaar in water, niet dialyseerbaar, sterke Molisch-reactie) wees eveneens op polysacchariden. Bij immuno-elektroforetisch onderzoek bleek, dat deze stoffen brede diffuse lijnen gaven met de serums tegen sporensuspensies bij e en f. De hier aanwezige stoffen kleurden sterk met α-naphtol. Daarnaast werd ook met amidoschwarz nog een zwakke kleuring verkregen: de oplossing van het F.o.calprecipitaat kleurde bij a, d en e, terwijl hier met de serums C1, D15 en D16 scherpe lijntjes werden gevormd; vergeleken met niet-gezuiverde cultuurfiltra-

ten was hier dus weinig veranderd. Bij de oplossing van het F.o.di-precipitaat was alleen bij a een smalle band aanwezig. De serums D 15 en D 16 gaven hier een scherp lijntje; D 18 en D 19 gaven een zwak lijntje bij c; bij d reageerde geen van de serums: Het niet-gezuiverde filtraat van F.o.di reageerde daarentegen wel bij d en zeer sterk bij c. Bij de zuivering is hier dus een deel van de proteinen verdwenen. Hetzelfde was te verwachten geweest van de met chloroform-butanol uitgeschudde oplossing van het F.o.lup-neerslag. Hier was de reactie bij d inderdaad zwakker geworden, echter nog niet afwezig, terwijl de reactie bij a gelijk gebleven was. Het is onwaarschijnlijk, dat zuivere proteinen het herhaaldelijk precipiteren met alcohol en het uitschudden met chloroform-butanol kunnen doorstaan. Hier zou dus sprake kunnen zijn van andere stoffen, die met amidoschwarz kleuren, maar op grond van de met mycelium-extracten verkregen resultaten (zie pag. 47) is het wel zeer waarschijnlijk, dat in elk geval de bij d aanwezige stoffen proteinen zijn.

Op grond van al deze gegevens kan de volgende hypothese opgesteld worden. In de cultuurfiltraten zijn polysacchariden aanwezig, waaraan proteinen gebonden zijn, dus glycoproteinen. De proteinen zijn betrekkelijk zwak gebonden. Voor een deel laten ze los en blijven in de vorm van grotere of kleinere brokstukken in de oplossing aanwezig, terwijl een ander deel spontaan neerslaat. Daarnaast komen in de oplossing misschien ook vrije, uit het protoplasma afkomstige eiwitten voor. Met alcohol slaan de polysacchariden, waaraan nog veel of weinig of in het geheel geen proteinen meer gebonden zijn, neer. Dit niet homogene mengsel verdeelt zich bij de elektroforese in een langgerekte zone naar de negatieve pool: de zuivere polysacchariden verplaatsen zich het meest, terwijl naarmate nog meer proteinen aanwezig zijn, de stoffen dichter bij de oorsprong blijven. Dicht bij de oorsprong kleuren ze dan ook met amidoschwarz en geven lijntjes met serums, die geen antistoffen tegen de thermostabiele polysacchariden hebben. Als de alcohol-precipitaten in water opgelost zijn, en vooral bij het mengen met de warme agar, worden opnieuw proteinen afgesplitst die zich bij de elektroforese naar de negatieve pool bewegen tot bij c en a.

In dit verband moeten ook de temperatuur-behandelingen ter sprake worden gebracht. Op 100 °C verhit en vervolgens 100 maal geconcentreerd filtraat van F.o.pi reageerde alleen nog maar bij e en f met de serums tegen sporensuspensies en niet meer met die tegen filtraten en extracten. Aangenomen mag worden dat de glycoproteinen tijdens de verhitting grotendeels uiteengevallen zijn in polysacchariden en proteinen, terwijl de proteinen onder invloed van de hoge temperatuur zijn gedenatureerd. Het uitblijven van een reactie met de serums tegen filtraten en extracten, die antistoffen tegen de proteinen bevatten, kan op deze wijze verklaard worden. De serums tegen sporensuspensies reageren nog wel, omdat ze antistoffen tegen de thermostabiele polysacchariden bevatten. Deze polysacchariden zijn niet antigeen (zie pag. 36) en kunnen dus haptenen genoemd worden.

Op 60 °C verhitte filtraten daarentegen waren nog wel antigeen. Het serum D 19, gericht tegen op 60 °C verhit cultuurfiltraat van F.o.di, bevatte echter geen antistoffen tegen de thermostabiele polysacchariden, maar reageerde met de alcoholprecipitaten bij c, dus met proteinen. In de op 60 °C verhitte filtraten moeten dus ook proteinen aanwezig geweest zijn; dat deze een verhitting op 60 °C konden doorstaan kan verklaard worden, door aan te nemen, dat bij 60 °C de hydrolyse van de glycoproteinen niet volledig is geweest en dat de

polysacchariden waaraan de proteinen waren gebonden, beschermend hebben gewerkt tegen de hoge temperatuur. Ook de andere, bij de temperatuurproeven gevonden resultaten zijn nu te verklaren (zie pag. 35). De thermolabiele stoffen zijn eiwitten; bij verhitting op 60 °C denatureren alleen de vrije proteinen; bij verhitting op 100 °C vallen de glycoproteinen uiteen in proteinen, die denatureren en polysacchariden, die thermostabiel zijn, maar met het verlies van de proteinen hun antigene eigenschappen hebben verloren.

β. Myceliumextracten. Globaal gezien werd bij de immuno-elektroforese van mycelium-extracten een analoog beeld verkregen als bij de cultuurfiltraten. In fig. 6 zijn ter illustratie de resultaten weergegeven van de reacties van verschillende serums met geconcentreerde extracten van F.o.lup. De duur van de elektroforese is iets korter geweest, de zones a, b,...f werden daarom smaller genomen.

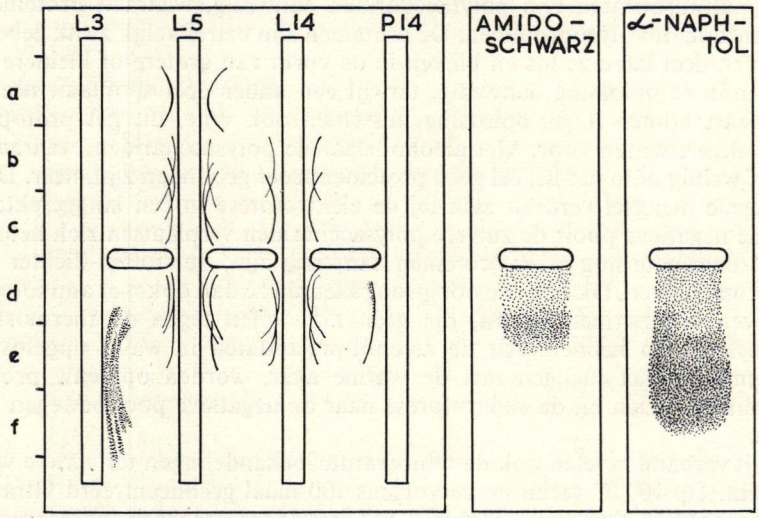


FIG. 6. Immuno-elektroforese van geconcentreerde mycelium-extracten van *F.o.lupini*.
L 3, serum tegen sporensuspensie van *F.o.lupini*
L 5, serum tegen cultuurfiltraat van *F.o.lupini*
L 14, serum tegen mycelium-extract van *F.o.lupini*
P 14, serum tegen mycelium-extract van *F.o.pisi*.

Immuno-electrophoresis of concentrated extracts of mycelium of F.o.lupini.
L 3, *serum against microconidial suspension of* F.o.lupini.
L 5, *serum against culture liquid of* F.o.lupini.
L 14, *serum against mycelium extract of* F.o.lupini.
P 14, *serum against mycelium extract of* F.o.pisi.

Ook hier een verdeling van de verschillende componenten over de gehele plaat, waarbij de plaats van de lijntjes eveneens aan variaties onderhevig was. Bij d werden over het algemeen meer lijntjes aangetroffen dan bij de filtraten het geval was. Wat betreft de fysische karakterisering door middel van elektroforese was er geen principieel onderscheid tussen de antigeen-componenten in de filtraten en die in de extracten. Hetzelfde kan gezegd worden van de karakterisering door middel van kleurreacties. Bij de extracten werden, na kleuring

met amidoschwarz, ook gekleurde zones waargenomen vlak boven de oorsprong, en over een grotere lengte onder de oorsprong. De kleuren waren meestal iets intensiever dan bij de filtraten. Er waren dus meer proteinen aanwezig, behalve bij a, waar slechts zelden een kleuring te zien was, hoewel daar soms wel lijntjes gevormd werden. De intensieve kleuring met α-naphtol overlapte weer grotendeels de blauwe zone van amidoschwarz. Met sudanzwart kleurde weer geen van de componenten.

De reacties van een ammonium-sulfaat-precipitaat (p) en de oplossing (o), waarin dit precipitaat werd neergeslagen (geconcentreerd extract van F.o.pi, zie pag. 40) zijn in fig. 7 weergegeven.

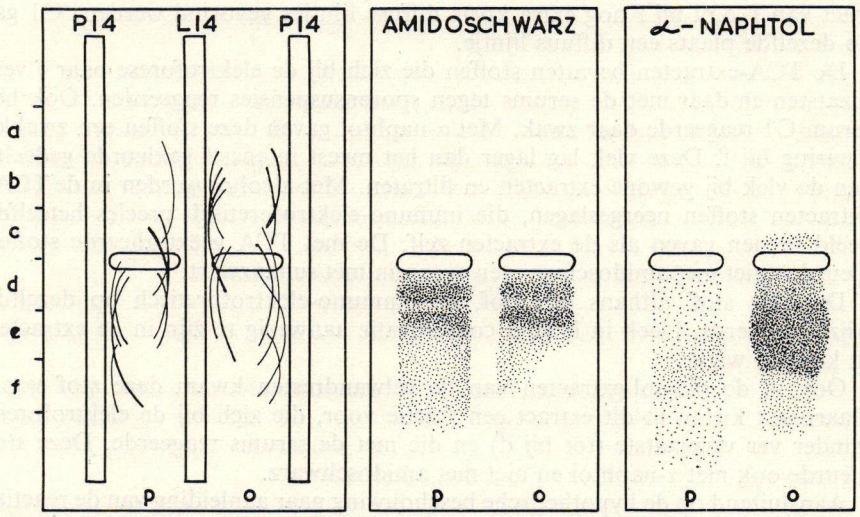


FIG. 7. Immuno-elektroforese van geconcentreerd mycelium-extract van *F.o.pisi.*
o is het extract, waaruit een deel van de eiwitten zijn neergeslagen met 66% ammoniumsulfaat.
p is een oplossing van de neergeslagen eiwitten.
L 14 is serum tegen mycelium-extract van *F.o.lupini.*
P 14 is serum tegen mycelium-extract van *F.o.pisi.*
Immuno-electrophoresis of concentrated extract of F.o.pisi.
o is the extract from which a part of the proteins are precipitated by adding 66 per cent ammoniumsulphate.
p *is a solution of the precipitated proteins.*
L 14 *is serum against mycelium extract of* F.o.lupini.
P 14 *is serum against mycelium extract of* F.o.pisi.

Uit deze proef bleek duidelijk dat de componenten bij b, c, d en e met ammoniumsulfaat precipiteerbare eiwitten zijn; uit het extract zijn echter lang niet alle eiwitten neergeslagen; de aard van de eiwitten is in beide monsters dezelfde: de lijntjes werden in grote trekken op overeenkomstige plaatsen gevormd. De neergeslagen eiwitten vertoonden een zwakke reactie met α-naphtol, waarschijnlijk tengevolge van aan de eiwitten gebonden reducerende suikers. De gebruikte serums L14 en P14 (tegen mycelium-extracten) bevatten blijkens andere proeven geen antistoffen tegen de soms bij a aanwezige eiwitten en de bij e en f aanwezige polydisperse reducerende stoffen. Uit de kleurreactie met amidoschwarz kan geconcludeerd worden dat van de component bij a niets of althans zeer

weinig aanwezig was. De polysacchariden of glycoproteinen bij e en f waren daarentegen blijkens de kleuring met α-naphtol wel aanwezig en deze bleven grotendeels in de oplossing achter.

De met KOH-geëxtraheerde stoffen verplaatsten zich bij de elektroforese in positieve richting en vormden bij e vlekken met uitlopers tot de oorsprong en het einde van de plaat (foto 9). Deze stoffen kleurden intensief met amidoschwarz en zwakker met α-naphtol. Waarschijnlijk hebben we hier dus ook met eiwitten te maken, waaraan suikers zijn gebonden. De serums C6, P5 en P14, die blijkens andere proeven antistoffen tegen eiwitten bevatten, gaven geen lijntjes met deze stoffen. De serums C3 en P3 (tegen sporensuspensies) daarentegen, gaven brede diffuse lijnen over de gehele lengte van de vlek, terwijl bij het extract van F.o.pi bij f nog extra korte diffuse lijntjes gevormd werden; C1 gaf op dezelfde plaats een diffuus lijntje.

De TCA-extracten bevatten stoffen die zich bij de elektroforese naar f verplaatsten en daar met de serums tegen sporensuspensies reageerden. Ook het serum C1 reageerde daar zwak. Met α-naphtol gaven deze stoffen een zwakke kleuring bij f. Deze vlek lag lager dan het meest intensief gekleurde gedeelte van de vlek bij gewone extracten en filtraten. Met alcohol werden in de TCA-extracten stoffen neergeslagen, die immuno-elektroforetisch precies hetzelfde beeld te zien gaven als de extracten zelf. De met TCA geëxtraheerde stoffen kleurden niet met amidoschwarz en evenmin met sudanzwart.

Dezelfde stof, althans een stof, die immuno-elektroforetisch op dezelfde wijze reageerde, bleek in hogere concentratie aanwezig te zijn in de extracten in kokend water.

Ook in de phenol-extracten van de celwandresten kwam deze stof voor. Daarnaast kwam in dit extract een fractie voor, die zich bij de elektroforese minder ver verplaatste (tot bij d) en die met de serums reageerde. Deze stof kleurde ook met α-naphtol en niet met amidoschwarz.

Aansluitend op de hypothetische beschouwing naar aanleiding van de reacties van de cultuurfiltraten kan worden opgemerkt, dat gezien de analogie tussen deze reacties en die van de extracten, ook in de extracten vermoedelijk glycoproteinen aanwezig zijn, waarvan gemakkelijk bepaalde eiwitten afsplitsen, die met ammoniumsulfaat zijn neer te slaan. Verder duiden deze resultaten erop, dat de in de filtraten voorkomende stoffen hierin terecht zijn gekomen door autolytische processen, waarbij dus dezelfde stoffen worden vrijgemaakt, die ook uit het mycelium zijn te extraheren. Dat het gehalte aan eiwitten in de geëxtraheerde stoffen hoger is dan in de stoffen, die in de filtraten voorkomen, ligt voor de hand, gezien de lange periode, waarin de laatste aan autolyse hebben blootgestaan. De met KOH geëxtraheerde stoffen bevatten nog zeer veel eiwitten, die weliswaar onder invloed van deze KOH hun serologische activiteit verloren hebben, maar waaraan suikers gebonden zijn, die op dezelfde wijze reageren als de in NaCl-extracten en filtraten voorkomende suikers (foto 9). Het is opvallend, dat het KOH-extract van F.o.pi zich minder ver naar de positieve pool verplaatst heeft, dan dat van F.o.cal; het extract van F.o.pi geeft evenwel met de serums, behalve een lange diffuse lijn van d–f, bij f nog een extra lijn. Nemen we aan dat zich van de, zich in het complex bevindende, negatief geladen polysacchariden bij F.o.pi een gedeelte heeft afgesplitst, dan verklaart dit zowel de aanwezigheid van de lijntjes bij f, als de geringere verplaatsing van het resterende deel. Op het complex zouden bij de agar-elektroforese dus twee tegengesteld gerichte krachten werken: de sterk negatief gela-

den polysacchariden trekken het in de richting van de positieve pool, de zwakker geladen eiwitten in de richting van de negatieve pool (met de endo-osmotische bufferstroom mee). Valt het complex onder invloed van hydrolyserende krachten uiteen, dan ontstaan hierbij polysacchariden, die zich naar de positieve en eiwitten, die zich naar de negatieve pool bewegen met daarnaast allerlei tussenproducten, die zich minder ver verplaatsen.

De resultaten van de elektroforese van de TCA-extracten klopt met deze hypothese. Het sterk zure TCA hydrolyseert de glycoproteinen gedeeltelijk en precipiteert de eiwitten, met daaraan gebonden een gedeelte van de suikers. In de extracten blijven dan alleen zuivere polysacchariden over, die zich ver naar de positieve pool zullen bewegen. Dit klopt met de waarnemingen.

Het feit dat dezelfde polysacchariden voorkomen in de phenol-extracten van de celwandresten, doet vermoeden, dat de glycoproteinen afkomstig zijn uit de celwanden van de schimmel. Het is bekend, dat ook in celwanden van bacteriën glycoproteinen voorkomen, terwijl ook hier de bindingen tussen polysacchariden en eiwitten gemakkelijk loslaten. Van verschillende bacteriële polysacchariden is bekend dat ze hapteen-eigenschappen bezitten, van die uit de celwanden is dat echter nog niet aangetoond (FREY-WYSSLING, 1959). Uit bovenstaande proeven is gebleken, dat uit de celwanden van de schimmel *Fusarium oxysporum* afkomstige polysacchariden wel hapteen-eigenschappen bezitten.

γ Verschillen tussen de antiserums. Dat de antiserums zich verschillend gedroegen bij het immuno-elektroforetisch onderzoek kwam reeds ter sprake. Als de antigenen zich na de elektroforese over de gehele plaat hadden verdeeld (van a–f) dan reageerden de antiserums niet overal. In dit opzicht was er een duidelijk verschil tussen de serums tegen de sporensuspensies enerzijds en die tegen filtraten en extracten anderzijds: de eerste reageerden steeds met de polysacchariden bij e en f, de laatste niet. Het serum C 1 (tegen gemalen cultuur) reageerde ook zwak met de polysacchariden; in de gemalen cultuur kwamen ongetwijfeld ook microconidiën voor. Het merkwaardige is dus, dat hoewel deze stof in de filtraten en extracten voorkomt, de konijnen er alleen antistoffen tegen produceren, indien ze met sporensuspensies zijn ingespoten. De serums tegen filtraten en extracten reageerden met de proteinen uit de schimmel. De verschillende serums gedroegen zich in dit opzicht verschillend. Bij de proef waarnaar foto 8 is gemaakt, reageerde het serum L 14 met de bij b voorkomende component, P 14 daarentegen niet; dit serum bevat hiertegen dus kennelijk geen antistoffen. Bij andere proeven reageerde het serum P 14 echter wel met een zich bij b bevindende component. Bij deze proeven had zich dus naar b een stof verplaatst, die fysisch wel dezelfde eigenschappen had, maar serologisch verschilde. Het zelfde kan gezegd worden van de andere componenten. Er kunnen dus geen algemene conclusies worden getrokken in de trant van: het serum L 23 reageerde alleen met de fractie bij a en c enz. Integendeel, bijna alle onderzochte serums gaven nu eens hier, dan weer daar meer lijntjes en waren in principe in staat overal op de plaat een lijntje te geven. Ook de serums tegen sporensuspensies, die naast de sterke reactie met de reducerende stoffen bij e en f dikwijls nog één of twee zwakke lijntjes vormden op een andere plaats, vertoonden dit verschijnsel: dit extra lijntje werd meestal bij b of c gevormd maar soms ook bij a, d, of e. Deze inkonsekwentie kan alleen maar verklaard worden door aan te nemen, dat de met een bepaalde antistof specifiek reagerende groep zich nu eens aan een antigeen-molecuul bevond, die zich bij de elektroforese ver naar de negatieve

pool verplaatste, dan weer aan een molecuul, die zich minder ver of zelfs in positieve richting bewoog. Deze waarnemingen kloppen dus met de hypothese, dat de verschillende antigeen-componenten afbraakproducten, brokstukken van een complex geheel zijn. Deze veronderstelling wordt gesteund door de vorm van de lijntjes: soms werden zeer langgerekte lijntjes gevormd, zoals tussen L 10 en cultuurfiltraat van F.o.lup (foto 8), terwijl in andere gevallen lijntjes zich vlagvormig splitsten, zoals tussen L 14 en de mycelium-extracten in fig. 6 en tussen L 14 en o in fig. 7. Dergelijke vlagvorming werd zowel bij filtraten als extracten waargenomen.

Het feit, dat bijna elk serum in principe in staat was overal op de plaat een lijntje te vormen, betekent niet, dat in elk serum antistoffen tegen alle afbraakproducten voorkwamen. Ter illustratie zij weer verwezen naar foto 8, waaruit blijkt dat L 10 en P 14 kennelijk geen antistoffen bezitten tegen de zich bij b bevindende component. Dergelijke verschillen kwamen veel voor, ook tussen op analoge wijze bereide serums. Bij een proef met extracten van F.o.lup en F.o.pi en serums tegen deze extracten (resp. L 14 en P 14) vormde L 14 lijntjes bij c en d zowel met extract van F.o.lup als met dat van F.o.pi, terwijl P 14 met dezelfde extracten lijntjes vormde bij e. De antistoffen in L 14 zijn dus gericht tegen andere brokstukken, dan die in P 14 en dat is niet verbazingwekkend, aangezien de extracten, waarmee de konijnen werden ingespoten, antigenen zullen hebben bevat in verschillende stadia van afbraak; het is ook uit andere onderzoekingen bekend, dat konijnen dikwijls niet tegen alle in een mengsel voorkomende antigenen antistoffen produceren en dat de antigenen, waartegen dan wel antistoffen gevormd worden van konijn tot konijn sterk kunnen variëren (GRABAR, 1955; WUNDERLY, 1957).

De combinatie van omstandigheden, dat enerzijds de antigenen in vrij willekeurige brokstukken uiteen kunnen vallen, terwijl anderzijds de serums niet steeds antistoffen tegen alle brokstukken bevatten, maakt het zeer moeilijk de verschillende serums onderling te vergelijken. Principiële verschillen leken er tussen de serums tegen cultuurfiltraten en die tegen extracten niet te bestaan en dit is na hetgeen boven gezegd werd, over de in de filtraten en extracten voorkomende antigenen niet verbazingwekkend.

De in deze paragraaf gegeven hypothetische beschouwing over de aard van de antigenen, kunnen ook de bij de geldiffusie-reacties met filtraten en extracten verkregen resultaten (pag. 27) verklaren. Daarbij werd gevonden, dat het aantal componenten in de extracten groter was, dan in de filtraten. Dit werd bij de elektroforetische onderzoekingen in zoverre bevestigd, dat bij de extracten, vooral bij c en d, vaak veel lijntjes werden gevormd (fig. 6 en 7). Principiële betekenis mag hieraan niet worden toegekend.

Bij de geldiffusie-reacties bleken de serums L 3 en P 2 specifiek te reageren. (pag. 30). In fig. 8 zijn de immuno-elektroforetische reacties van deze serums met cultuurfiltraten van F.o.lup en F.o.pi weergegeven.

De specifieke antistoffen van het serum L 3 waren gericht tegen de reducerende stoffen bij f; dit serum reageerde alleen met de reducerende stoffen van F.o.lup en niet met die van de andere *formae speciales*. Dit verklaart ook de reactie van L 3 met cultuurfiltraten, waaraan TCA was toegevoegd (pag. 39). De andere serums tegen sporensuspensies waren niet specifiek. Ze reageerden met de reducerende stoffen van alle *formae speciales*, ook met die van F.o.lup. Het serum P 2 bleek geen antistoffen tegen de reducerende stoffen te bevatten. Dit verklaart het verschil tussen beide serums met antigenen, waaraan formol was

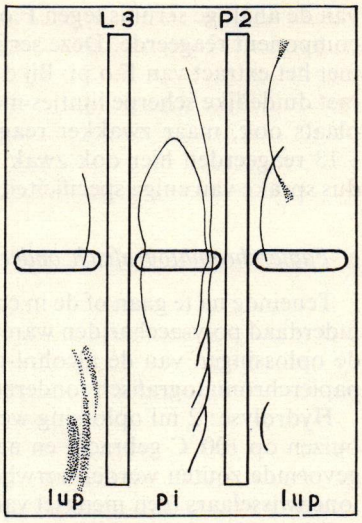


FIG. 8. Immuno-elektroforese van geconcentreerde cultuurfiltraten van *F.o.lupini* en *F.o.pisi.* (resp. 1 en p.)
L 3, serum tegen sporensuspensie van *F.o.-lupini.*
P 2, serum tegen cultuurfiltraat van *F.o.pisi.*

Immuno-electrophoresis of concentrated culture liquids of F.o.lupini *and* F.o.pisi. (1 *and* p, *resp.*)
L 3, *serum against microconidial suspension of* F.o.lupini.
P 2, *serum against culture liquid of* F.o.pisi.

toegevoegd (zie pag. 33). De polysacchariden konden de inwerking van formol doorstaan, de labielere eiwitachtige stoffen, waar de specificiteit van P2 op berust, niet. Het serum P2 reageerde met het filtraat van F.o.lup nog wel bij a en c, met het filtraat van F.o.pi was de reactie veel sterker en zette zich met een dubbele lijn voort tot bij f. De aard van de reactie van P2 met het filtraat van F.o.pi wijst erop, dat de reagerende antigenen in dit filtraat nog niet sterk uiteengevallen zijn. Het is mogelijk dat de specificiteit van het serum P2 er juist op berust, dat het antistoffen bevat, tegen de nog weinig uiteengevallen moleculen, waarin de verschillende onderdelen op een specifieke manier gerangschikt zijn. Dit zou dan tevens een verklaring geven voor de vele gevallen, waarin van specificiteit geen sprake was: de antistoffen zijn gericht tegen allerlei afzonderlijke brokstukken van moleculen, die hun specifieke rangschikking hebben verloren, terwijl tegen de moleculen in hun geheel geen antistoffen aanwezig zijn. Deze hypothese is moeilijk te bewijzen, en alleen dan, als een extractie-procedure gevolgd kan worden, waarbij de moleculen zoveel mogelijk intact blijven; dit is dan tevens één van de voorwaarden om met succes specifieke serums te krijgen. Bij extractie met KOH bleven de glycoproteinen grotendeels intact, echter waarschijnlijk juist onder invloed van deze KOH was de serologische activiteit verloren gegaan. Extractie met gebufferde zout-oplossingen van hoge pH gaf weer allerlei afbraakproducten.

Bij de proef behorende bij fig. 7 reageerde het serum P14 (tegen extract van F.o.pi) met het extract van F.o.pi bij e, terwijl L14 hier niet reageerde. Dit lijkt dus een specifieke reactie. Het kan echter een gevolg zijn van toevallige verschillen tussen de serums, zonder dat dit verband houdt met de *formae speciales* waartegen ze gericht zijn. Dit zou uit een reciproke reactie moeten blijken. Uit het bovenstaande is echter al gebleken, dat het practisch onmogelijk was, om bij een herhaling van de proef, ook als precies dezelfde extractieprocedure gevolgd werd, dezelfde afbraakproducten te voorschijn te roepen. Bij een immuno-elektroforetische reactie, waarbij extracten van F.o.lup en F.o.pi, met serums tegen deze *formae speciales*, bleek het volgende. De serums L10, L13 en L14, alle drie tegen F.o.lup, reageerden bij c met het extract van F.o.lup, terwijl geen

van de analoge serums tegen F.o.pi, P10, P13 en P14, met de hier voorkomende component reageerde. Deze serums reageerden evenwel op deze plaats ook niet met het extract van F.o.pi. Bij e daarentegen reageerden de serums tegen F.o.pi met duidelijke scherpe lijntjes met de extracten van F.o.pi, terwijl ze op dezelfde plaats ook, maar zwakker reageerden met de extracten van F.o.lup. L10 en L13 reageerden hier ook zwak, terwijl L14 hier niet reageerde. Ook hier was dus sprake van enige specificiteit van de serums.

e. Papierchromatografisch onderzoek van polysacchariden uit cultuurfiltraten

Teneinde na te gaan of de in cultuurfiltraten voorkomende reducerende stoffen inderdaad polysacchariden waren en tevens om deze nader te analyseren werden de oplossingen van de alcohol-precipitaten van F.o.cal en F.o.di (zie pag. 39) papierchromatografisch onderzocht.

Hydrolyse: 2 ml oplossing werd met 2 ml 2.2 n HCl 3 uur in dichtgesmolten buizen op 100 °C gebracht en na afloop met NaOH geneutraliseerd. De hierbij gevormde zouten werden verwijderd door de hydrolysaten uit te schudden met ionenwisselaars (een mengsel van „amberlite" IR-120 (H) en IR-4B (OH)).

Bij enkele oriënterende proeven met circulaire chromatogrammen (Whatman No. 1), waarbij als loopvloeistof werd gebruikt *n*-butanol-azijnzuur-water (4:1:5), werden de hydrolysaten vergeleken met glucose, galactose en fructose. Bij deze methode werden glucose en galactose niet gescheiden; op dezelfde hoogte als waar deze zich bevonden, werden ook suikers aangetroffen afkomstig uit de hydrolysaten; deze hydrolysaten verschilden onderling niet; in de hydrolysaten was kennelijk geen fructose aanwezig.

Om glucose en galactose te scheiden werd met afdalende chromatogrammen gewerkt, waarbij als loopvloeistof werd gebruikt *n*-butanol-ethanol-ammoniak-water (40:10:1:49). Na 4 × 24 uur lopen werden de chromatogrammen gedroogd en bespoten met een benzidine oplossing (18,2 g benzidine en 16,5 g TCA in 1000 ml alcohol). Na 10 minuten bij 105 °C werden op de plaatsen waar zich de suikers bevonden bruine vlekken gevormd. Glucose was verder gelopen dan galactose. De suikers uit het hydrolysaat (bij deze proef werd alleen het hydrolysaat van F.o.cal onderzocht) hadden zich gesplitst in twee duidelijke vlekken, waarvan de een zich bevond op de hoogte van glucose, de andere op die van galactose; daarnaast kwamen nog geringe hoeveelheden niet nader geanalyseerde reducerende stoffen voor met een grotere R_F-waarde.

HOOFDSTUK VI

CONCLUSIES EN SAMENVATTING

Op grond van het hier uitgevoerde onderzoek moet men aannemen, dat de schimmel *Fusarium oxysporum* antigenen bevat, die bestaan uit een labiel molecuulaggregaat van proteinen en polysacchariden, dus glycoproteinen. Waarschijnlijk zijn deze glycoproteinen afkomstig uit de celwand van de schimmel.

Werd mycelium geëxtraheerd met fysiologisch zout dan kwamen in de extracten allerlei brokstukken van deze aggregaten voor: enerzijds polysacchariden,

waaraan nog meer of minder proteinen gebonden waren, anderzijds proteinen, die wat betreft hun fysische eigenschappen (beweeglijkheid in een elektrisch veld) sterk varieerden (foto 9, fig. 5–8). Een deel van de stoffen denatureerde en sloeg spontaan in de extracten neer. Waarschijnlijk was dit de oorzaak van de lage concentratie van de proteinen in de extracten. Ook in cultuurfiltraten konden polysacchariden en proteinen worden aangetoond, die zich serologisch en elektroforetisch op dezelfde wijze gedroegen als de in de extracten voorkomende stoffen. Waarschijnlijk zijn deze tengevolge van autolytische processen tijdens de groei van de schimmel uit het mycelium vrijgemaakt.

Werden konijnen intraveneus, subcutaan, intramusculair of intraperitoneaal met filtraten en extracten ingespoten, dan vormden deze antistoffen, die gericht waren tegen de verschillende proteinen. De konijnen moesten daartoe enkele malen per week worden ingespoten, terwijl de hoeveelheden per injectie vrij hoog moesten worden opgevoerd: 5–10 ml per injectie. De titers van de verkregen antiserums waren betrekkelijk laag (tabel 12), door toevoeging van hulpstoffen (Freund-adjuvants) aan de antigenen kon de antistofproductie niet in gunstige zin worden beïnvloed (tabel 7).

Tegen de in filtraten en extracten aanwezige polysacchariden werden geen antistoffen gevormd. Antistoffen hiertegen konden evenwel worden verkregen door de konijnen in te spuiten met suspensies van microconidiën. In de antiserums tegen microconidiën kwamen meestal ook antistoffen voor tegen enkele eiwitachtige bestanddelen van de schimmel. Agglutinatie-reacties van deze antiserums met microconidiën konden niet worden toegepast, omdat de microconidiën ook agglutineerden met normaal serum en zelfs met uit normaal serum bereide γ-globulinen.

De antistoffen tegen polysacchariden gaven precipitatie-reacties met de polysacchariden uit cultuurfiltraten en extracten. Deze waren thermostabiel en konden uit de filtraten en extracten worden neergeslagen met alcohol. Uit mycelium konden ze worden geëxtraheerd met kokend water en met trichloorazijnzuur. Bij agar-elektroforese bewogen ze zich in de richting van de positieve pool. Papierchromatografisch kon worden aangetoond, dat ze grotendeels bestaan uit glucose en galactose.

De polysacchariden konden ook worden verkregen door celwandresten, die na extractie van fijngemalen mycelium met een 10 %-ige NaCl oplossing overbleven, drastisch met phenol te extraheren. In deze phenol-extracten kwamen bovendien nog andere, niet-antigene stoffen voor.

Met loog konden uit het mycelium glycoproteinen geëxtraheerd worden, die reageerden met de antiserums, die antistoffen tegen polysacchariden bevatten, daarentegen niet met de antiserums, die alleen maar antistoffen tegen proteinen bevatten. De proteinen hadden hun antigeniteit waarschijnlijk verloren door de inwerking van de loog. Konijnen produceerden er dan ook geen antistoffen tegen.

Uit het mycelium konden geen lipo-polysacchariden worden geëxtraheerd volgens de procedure van BOIVIN en MESROBEANU voor de extractie van lipopolysacchariden uit gramnegatieve bacteriën met trichloorazijnzuur. De antigenen van *Fusarium oxysporum* zijn beter vergelijkbaar met die van grampositieve bacteriën. Het is bekend dat in de celwanden van grampositieve bacteriën glycoproteinen aanwezig zijn. Of de polysacchariden uit deze glycoproteinen haptene eigenschappen bezitten is niet bekend (FREY–WYSSLING, 1959). Dit is met die uit de glycoproteinen uit *Fusarium oxysporum* dus wel het geval,

zoals uit het hier uitgevoerde onderzoek is gebleken. Het feit dat de antiserums tegen sporensuspensies voornamelijk antistoffen tegen polysacchariden bevatten, doet vermoeden, dat de polysacchariden bij de microconidiën in de buitenste oppervlakte van de celwand gesitueerd zijn.

Enkele van de verkregen antiserums bleken specifiek te zijn ten opzichte van *formae speciales* van *Fusarium oxysporum*, waartegen ze gericht waren. Dit kon met behulp van de geldiffusie-methode worden aangetoond (foto 3–6). In het ene geval betrof het een antiserum tegen microconidiën van *F.o.lupini*, waarbij de specifieke antistoffen gericht waren tegen reducerende stoffen uit de schimmel, in het andere geval een antiserum tegen proteinen uit cultuurfiltraat van *F.o.pisi* (fig. 8). Het serum tegen F.o.pisi reageerde niet alleen specifiek met de stam van F.o.pisi, waartegen het serum geproduceerd was, maar ook met de rassen 1 en 2 van F.o.pisi uit de collectie van het Centraal Bureau voor Schimmelcultures in Baarn (foto 7). Van de rassen 1 en 2 uit de collectie van de Planteziektenkundige Dienst gaf ras 1 geen specifieke precipitatie-lijn. Dit ras bleek echter niet pathogeen te zijn ten opzichte van het erwteras Rondo, terwijl ras 2 van de P.D., de rassen 1 en 2 uit Baarn en de stam, waartegen het serum geproduceerd was, wel pathogeen waren.

Het is moeilijk te verklaren waarom in enkele gevallen wel en in andere daarentegen geen specifieke antistoffen gevormd werden. Het is mogelijk, dat de molecuulaggregaten van proteinen en polysacchariden in de *formae speciales* op specifieke wijze zijn opgebouwd, terwijl deze specifieke opbouw bij het uiteenvallen van de aggregaten verloren gaat. Voor verder onderzoek verdient het aanbeveling om een extractie-procedure te zoeken, waarbij de molecuulaggregaten zoveel mogelijk intact gelaten worden en hun antigene eigenschappen bewaren.

SUMMARY

Introduction (Chapter I and II)

Differentiation of *formae speciales* and physiological races of parasitic fungi presents many problems. It might be very useful to apply an easy *in vitro* test in diagnosis. The present investigations were started to study how far serological methods could be applied for this purpose.

In medical mycology serological methods are generally applied. A survey of literature is given in Chapter II.3.b. In plant pathology serological methods are applied in diagnosis of virus diseases (Van Slogteren & Van Slogteren, 1957), but only incidentally in diagnosis of fungus diseases. A survey of literature on serological investigations in fungi causing plant diseases is given in Chapter II.3. c and d.

Material and methods (Chapter III and IV)

A number of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum* Schl. emend. Sn. et H. was studied (see page 11). The fungus was cultured in Richard medium for 10–14 days at 27 °C to obtain culture liquids and mycelium. Shaken cultures were prepared in Czapek medium to obtain microconidia. One to two year old rabbits were injected intravenously, intraperitoneally, subcutaneously or

intramuscularly with different preparations of the fungus. The serums were studied by means of micro-agglutination tests, micro-precipitin tests (VAN SLOGTEREN, 1955), gel diffusion precipitin tests (OUCHTERLONY, 1949) and the immuno-electrophoretic method (GRABAR & WILLIAMS, 1953).

RESULTS (Chapter V)

1. *Preliminary investigations on the antigenicity of the fungus*

Rabbits were immunized with a homogenized culture of *F. oxysporum;* they produced precipitating antibodies of rather low titer (Table 1). After two months rest antibodies were still present. A booster injection at that moment did not result in a secondary response.

2. *Immunization methods*

Mostly short injection schemes were followed in order to have greater possibilities of obtaining antisera specific for closely related strains of the fungus.

The rabbits produced antibodies after a series of intravenous, subcutaneous and intramuscular injections (Table 2). Four injections a week gave better results than one injection a week (Table 3). The quantities of culture liquid per injection should be raised to a rather high level. Final quantities of 10 ml per injection sometimes gave better results than 5 ml per injection (Table 4 and 5). Addition of adjuvants (lanoline-vaseline mixture, Freund adjuvants) to the antigens had no effect (Table 7).

3. *Immunization with different preparations of the fungus*

Culture liquids, homogenized mycelium in saline, mycelium extracts and microconidial suspensions appeared to be antigenic. Antibodies against all these preparations reacted in precipitin tests with both culture liquids and mycelium extracts used as test-antigens (Table 8, 10 and 11). The titers of the serums varied from 1–28. This variation was spread over all the immunization methods (Table 12), so that no preference could be given to one of these methods or to one of the preparations of the fungus with respect to the quantity of produced antibodies.

Culture liquids and mycelium extracts and sera against different preparations were compared by gel diffusion precipitin tests (photo 1 and 2). The antigenic structure of these preparations appeared to be rather complicated. Various components present in the culture liquids could be demonstrated in the extracts as well. Antisera against culture liquids, extracts, and microconidial suspensions had several antibodies in common, but at the same time all these antisera contained antibodies which were not present in the others.

4. *Serological differentiation of the formae speciales*

Microconidia agglutinated very easily with highly diluted antisera (1:4096), but also with highly diluted normal serum, so that agglutination reactions could not be applied to differentiate *formae speciales.*

Precipitins were only present in antisera and not in normal sera. Cross reactions between *formae speciales* were very common in precipitin tests (Table 10, 11 and 12). The gel diffusion precipitin test turned out to be the most suitable test to differentiate *formae speciales.* Most sera did not differentiate the *formae speciales* specifically. However the serums P2, against a culture liquid of *F.o.pisi* and L3 against a microconidial suspension of *F.o.lupini* reacted very specifically. This is demonstrated in photo 3, 4 and 5 and in fig. 4. The specific antigens were present in culture liquids of cultures of different age. Mycelium extracts

only reacted specifically with L3 and not with P2. The antiserum P2 did not only react specifically with the strain of *F.o.pisi* used in these investigations but also with the races 1 and 2 of *F.o.pisi* from the collection of the "Centraal Bureau voor Schimmelcultures" at Baarn (photo 6). The races 1 and 2 derived from the collection of the "Planteziektenkundige Dienst" at Wageningen were also tested: race 1 (p3) did nog give the specific precipitation line (photo 7). In pathogenicity tests with the pea variety "Rondo" the last one (p3) produced no disease symptoms, whereas all others did (p0, p1, p2 and p4).

5. *Character of the antigens*

a. The antigens in culture liquids are partly resistant to heating at 60 °C for one hour and partly to heating at 100 °C for one hour (Table 13). The reaction of antisera against culture liquids and mycelium extracts appeared to be weaker with liquids heated to 60 °C than with untreated liquids; only in a few cases the antisera reacted with liquids heated to 100 °C. Antisera against microconidial suspensions reacted equally strong with treated liquids and untreated liquids. Rabbits produced antibodies against liquids heated to 60 °C but not against liquids heated to 100 °C (Table 13). Therefore both thermolabile and thermostable substances are present in the culture liquids; the thermostable substances are not antigenic; only in the serums against microconidia antibodies are present which react with these thermostable haptens.

b. Reducing substance sreacting with α-naphtol were present in culture liquids and in extracts. Protein-like substances could be demonstrated with amido-black. The colouring with amido-black was weak; probably the proteins were present in very low concentration. Lipoids could not be demonstrated. Denaturated substances always precipitated in liquids and extracts; this could not be prevented by working at low temperature or by raising the pH of the solutions above 7. Possibly these denaturated substances were proteins.

c. Culture liquids and extracts were concentrated by freeze drying and by evaporation. Antigenic substances could be precipitated in these concentrated solutions with ammonium sulphate, trichloro-acetic acid and alcohol. The alcohol precipitates of culture liquids mainly consisted of a brownish gluey substance, soluble in water and reacting with α-naphtol. Mycelium was extracted with different chemicals (see d).

d. Immuno-electrophoresis of culture liquids and extracts in saline gave analogous results (photo 8 and fig. 5). A number of reacting substances spread all over the plate after 1–1½ hour electrophoresis (6 V/cm). These substances were evidently very unstable: the results with analogous preparations were always different. Very probably we have to do with breakdown products. The substances in the culture liquids may be products of autolysis of the mycelium.

A polydisperse mixture of reducing substances moved in the direction of the positive pole. They gave long diffuse lines with the sera against microconidia and were present both in culture liquids and mycelium extracts (photo 8 and fig. 5). Proteins which moved slower in positive direction and even in negative direction, reacted with sera against culture liquids and mycelium extracts. They could be precipitated with ammonium sulphate (fig. 7). The reducing substances could be precipitated with alcohol. Even after repeated purification by alcohol precipitation and shaking with chloroform-butyl-alcohol mixture they still contained proteins which moved slowly in positive or in negative direction. Paper chromatography of hydrolysed alcohol precipitates of culture liquids gave evidence of the presence of glucose and galactose. It is concluded that the

thermostable reducing substances mainly consist of polysaccharides of these sugars.

The specific antibodies of the serum L3 were directed against the reducing substances of the fungus, those of the serum P2 against the proteins (fig. 8).

Substances reacting strongly with amido-black and weaker with α-naphtol were present in alkali extracts of the mycelium (photo 9). Alkalis react with proteins to form alkali metaproteins; this decreases the antigenic activity. Rabbits immunized with alkali extracts did not produce antibodies. The extracts did not react with serums against culture liquids and saline extracts of mycelium, but they still reacted with serums against microconidial suspensions, because of the presence of polysaccharides.

Mycelium was extracted with trichloro-acetic acid following the procedure of BOIVIN and MESROBEANU (1935) for the extraction of lipo-polysaccharides of gramnegative bacteria. In the extracts reducing substances were present, which could be precipitated with alcohol, were soluble in water and in immuno-electrophoretic tests moved fast in positive direction, where they reacted with the sera against microconidial suspensions.

These substances were not antigenic. Evidently they were polysaccharides; lipoids could not be demonstrated. Analogous polysaccharides could be extracted with hot water out of the mycelium and with phenol out of the mycelium parts which were left after an extraction with 10% NaCl of homogenized mycelium.

From these investigations it is concluded that in the mycelium glycoproteins are present. These glycoproteins split up into polysaccharides and various proteins both during autolysis in the cultures and during extraction of the mycelium. In alkali extracts they are rather stable but have lost their antigenicity.

Rabbits only produce antibodies against proteins after injection with culture liquids or with saline extracts of mycelium. These proteins vary widely in physical properties and it is very difficult to obtain the same proteins even when the same extraction procedure is applied. The polysaccharides are much more stable, but antibodies against these substances can be obtained only by immunization with microconidia. Probably these polysaccharides are present at the surface of the cell wall of the microconidia.

The antigens of *Fusarium oxysporum* are more comparable with those of grampositive bacteria than with those of gramnegative bacteria. It is known that glycoproteins are present in the cell walls of grampositive bacteria. Whether the polysaccharides of these glycoproteins are haptenic is not known (FREY-WYSSLING, 1959). In these investigations it is demonstrated, that the polysaccharides from the glycoproteins of *Fusarium oxysporum* are haptens.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is greatly indebted to Prof. Dr. A. J. P. OORT, Director of the Laboratory of Phytopathology at Wageningen, for suggesting the problem and for his continuous guidance and interest during the investigations.

This study was carried out at the Laboratory of Flower Bulb Research at Lisse. The writer wishes to express his thanks to Prof. Dr. E. VAN SLOGTEREN, director at that time of this laboratory for his great hospitality.

Many thanks are also due to Prof. Dr. P. GRABAR of the "Institut Pasteur"

at Paris for his hospitality and valuable suggestions in the immuno-chemical part of the investigation, to Ir. D. H. M. VAN SLOGTEREN, Ir. J. A. VAN DER VEKEN at Lisse and Drs. G. J. SAALTINK at Wageningen for helpful criticism throughout the investigation.

LITERATUUR

BAHN, A. N., 1957. Serological differentiation of physiological races within the cereal rusts. Diss. Abstr. **17**, 720–721.

BECK, E. C., 1934. The precipitin ring test applied to some *Ustilaginaceae*. Can. J. Res. **10**, 234–238.

BECK, E. C., 1938. The application of serological methods to the differentiation of closely related smut fungi. Can. J. Res. **16**, 391–403.

BISBY, G. R., 1945. An introduction to the taxonomy and nomenclature of fungi. Kew, 117 pp.

BJÖRKLUND, B., 1952. Specific inhibition of precipitation as an aid in antigen analysis with gel diffusion method. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. **79**, 319–327.

BOIVIN, A. et L. MESROBEANU, 1935. Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries. Rev. d'Immunol. **1**, 553–569.

BOOM, B. K., 1930. Botanisch-serologische onderzoekingen. Proefschr., Wageningen, 77 pp.

BOYD, W. C., 1956. Fundamentals of immunology. 3d Ed. New York, London, XIV + 776 pp.

BOYDEN, A., 1934. Precipitins and phylogeny in animals. Am. Naturalist **68**, 516–536.

BOYDEN, A., 1942. Systemic serology: a critical appreciation. Physiol. Zoöl. **15**, 109–145.

BURTIN, P., 1954. Application de la méthode d'Ouchterlony au système précipitant sérum albumine humaine – immunsérum de cheval. Bull. Sté. Chim. Biol. **36**, 1021–1028.

COONS, G. H. and M. C. STRONG, 1928. New methods for the diagnosis of species of the genus *Fusarium*. Pap. Mich. Acad. Sci., Arts a. Lett. **9**, 65–88.

CORPACI, A. 1925. Reazioni immunitaric nelle Aspergillosi. Boll. Ist. Sieroterap., Milan, **4**, 295–306.

CUMLEY, R. W. and G. W. GOLDSMITH, 1940. Preliminary serological studies of *Phymatotrichum omnivorum*. Phytopathology **30**, 4 en 130–139.

DIXON, G. H. and O. SMITHIES, 1957. Zone electrophoresis of cabbage enzymes in starch gels. Biochim. Biophys. Acta **23**, 198–199.

EDGECOMBE, A. E., 1931. Immunological relationship of wheats resistant and susceptible to *Puccinia rubigo-vera triticina*. Bot. Gaz. **91**, 1–21.

ELEK, S. D., 1949. The serological analysis of mixed flocculating systems by means of diffusion gradients. Brit. J. Exp. Path. **30**, 384–500.

EMMONS, C. W., 1950. The natural occurrence in animals and soil of fungi which cause disease in man. Proc. 7th Int. Bot. Congr., Stockholm, 1950, 416–421.

FEDOTOVA, T. I., 1938a. (The serological method of determining the varietal resistance of plants to disease). Pl. Prot., Leningrad, 1938 (16), 50–58. (Rev. Appl. Myc. **18**, 1939, 127).

FEDOTOVA, T. I., 1938b. Symposion: Rust of cereal crops. Moscov, 163–169. (Rev. Appl. Myc. **19**, 1940, 138).

FEDOTOVA, T. I., 1939. (Application of simplified serological reactions for the determination of varietal resistance to disease). Bull. Pl. Prot., Leningrad, 1939 (1), 85–91. (Rev. Appl. Myc. **19**, 1940, 383).

FEINBERG, J. G., 1957. Specific absorbtion with line extinction in Ouchterlony plates. Biochem. J. **65**, 40 P.

FREUND, J., K. JEFFERSON THOMSON, H. B. HOUGH, H. E. SOMMER and T. M. PISANI, 1948. Antibody formation and sensitization with the aid of adjuvants. J. Immunol. **60**, 383–398.

FREY-WYSSLING, A., 1959. Die pflanzliche Zellwand. Berlin, 367 pp.

GOULD, C. J., 1957. Tulips. Fungus diseases. In: Handbook on Bulb Growing and Forcing, Washington, 153–160.

GRABAR, P., 1955. Immunoelektrophoretische analyse. Behringwerk-Mitteillungen **30**, 23–41.

GRABAR, P. et C. A. WILLIAMS, 1953. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochim. Biophys. Acta **10**, 193–194.

GRABAR, P. et C. A. WILLIAMS, jr., avec aide techn. J. COURCON, 1955. Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. Biochim. Biophys. Acta **17**, 67–74.

HEIDELBERGER, M., 1956. Lectures in immunochemistry. New York, 150 pp.

HEIDELBERGER, M., F. E. KENDALL and H. W. SCHERP, 1936. The specific polysaccharides of type I, II and III pneumococcus. A revision of methods and data. J. Exp. Med. **64**, 559–572.

INTERNATIONAL CODE of Botanical nomenclature, adopted by the eighth International Botanical Congress, Paris July, 1954. Utrecht, 1956, 338 pp.
KAMINSKI, M., 1954. Quelques observations sur la technique de précipitation spécifique en milieu gélifié d'Ouchterlony. Bull. Sté. Chim. Biol. **36**, 279–293.
KAMINSKI, M., 1955. Studies on egg white and its constituents by immunochemical techniques in gelified media: Specific precipitation by double diffusion and immuno-electrophoretic analysis. J. Immunol. **75**, 375–376.
KLIGMAN, A. M. and E. D. DELAMATER, 1950. The immunology of human mycoses. Ann. Rev. Microbiol. **4**, 283–312.
KOHN, J., 1957. A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis. Clin. Chim. Acta **2**, 297–303.
KORNGOLD, L., 1956. Immunological cross-reactions studied by the Ouchterlony gel diffusion technique. J. Immunol. **77**, 119–122.
LABZOFFSKY, N. A., J. B. FISHER and J. J. HAMVAS, 1957. Studies on the antigenic structure of *Histoplasma capsulatum*. Can. J. Microbiol. **3**, 975–985.
LINK, G. K. K., A. DE S. LINK, G. L. CROSS and H. W. WILCOX, 1932. The precipitin ring test applied to fungi. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. **29**, 1278–1281.
LINK, G. K. K. and H. W. WILCOX, 1933. Precipitin ring test applied to fungi II. Bot. Gaz. **95**, 1–34.
MAGNUS, W. und H. FRIEDENTAHL, 1907. Ueber die Specificität der Verwandtschaftsreaktionen der Pflanzen. Ber. Deut. Bot. Gez. **25**, 242–247.
MATSUMOTO, T., 1928. Some investigations of *Aspergilli* by serological methods. Phytopathology **18**, 148.
MATSUMOTO, T., 1929. The investigation of *Aspergilli* by serological methods. Trans. Brit. Myc. Soc. **14**, 69–88.
MAURER, P. H., 1954. The cross reaction between albumins of different species and gamma globulins of different species. J. Immunol. **72**, 119–122.
MEZ, C. und H. ZIEGENSPECK, 1925. Zur Theorie der Sero-Diagnostik. Bot. Archiv. **12**, 163–202.
MEZ, C. und H. ZIEGENSPECK, 1926. Der Koenigsberger serodiagnostische Stammbaum. Bot. Archiv. **13**, 483–485.
MORGAN, W. T. J., 1943. Recent advances in immunochemistry. Nature **152**, 82–83.
NEILL, J. M., C. G. CASTILLO, R. H. SMITH and C. E. CAPROS, 1949. Capsular reactions and soluble antigens of *Torula histolytica* and of *Sporotrichum schenkii*. J. Exp. Med. 89, 93–106.
NELSON, C. J., 1933. A method for determining the specificity of the intracellular globulin of *Fusarium lini*. J. Agric. Res. **46**, 183–187.
NELSON, C. I. and J. M. BIRKELAND, 1929. A serological ranking of some wheat hybrids as an aid in selecting for certain genetic characters. J. Agric. Res. **38**, 169–181.
NEUHOFF, W. und H. ZIEGENSPECK, 1926. Morphologisch-serologische Bearbeitung des Systems der Basidiomyceten. Bot. Archiv. **16**, 296–359.
NICKERSON, W. J., 1953. Medical mycology. Ann. Rev. Microbiol. **7**, 245–272.
NUTTALL, G. H. F., 1904. Blood immunity and blood relationship. Cambridge.
ONG, S. G., 1943. Sur la production d'anticorps au moyen d'un antigène enrobé dans la lanoline-vaseline. Antonie van Leeuwenhoek **9**, 1–18.
OUCHTERLONY, O., 1949. Antigen-antibody reactions in gels. Acta Path. et Microbiol. Scand. **26**, 507–515.
OUDIN, J., 1952. Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis. In: CORCORAN, A. C., Methods in medical research. Vol. 5. Chicago, 335–378.
SALVIN, S. B., 1949. The serologic relationship of fungus antigens. J. Lab. a. Clin. Med. **34**, 1096–1104.
SALVIN, S. B., and E. RIBI, 1955. Antigens from yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. II. Immunologic properties of protoplasm vs. cell walls. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., U.S.A. **90**, 287–294.
SCHEIDEGGER, J. J., 1955. Une micro-méthode de l'immuno-électro-phorèse. Int. Arch. Allergy **7**, 103–110.
SCHMIDT, H., 1951. Fortschritte der Serologie. Lieferung 6. Frankfurt/Main, Darmstadt, 321–384.
SLOGTEREN, D. H. M. VAN, 1955. Serological micro-reactions with plant viruses under paraffin oil. Proc. 2nd Conf. Potato Virus Diseases, Lisse–Wageningen, 1954, 51–54.
SLOGTEREN, D. H. M. VAN, 1958. Multiple antigenicity of tobacco plants infected with viruses, notably strains of cucumber mosaic virus. Coresta, Inf. Bull. 1958 (2), 14–15.
SLOGTEREN, E. VAN and D. H. M. VAN SLOGTEREN, 1957. Serological identification of plant

viruses and serological diagnosis of virus diseases of plants. Ann. Rev. Microbiol. **11**, 149–164.

SMITH, C. E. and M. T. SAITO, 1957. Serologic reactions in coccidiomycosis. J. Chron. Dis., U.S.A. **5**, 571–579.

SNYDER, W. C. and H. N. HANSEN, 1940. The species concept in *Fusarium*. Am. J. Bot. **27**, 64–67.

SNYDER, W. C. and H. N. HANSEN, 1945. The species concept in *Fusarium* with reference to discolor and other sections. Am. J. Bot. **32**, 657–666.

SYMPOSION Chronic Fungus Infections, 1957. J. Chron. Dis. **5**, 371–591.

TEMPEL, A., 1957. Serological studies on *Fusarium oxysporum* Schl. emend Sn. et H. Nature **180**, 1483.

TEMPEL, A., 1958. Over de serologische verschillen tussen *Polyspora lini* en *Pullularia pullulans*. T. Pl. ziekten **64**, 482–484.

TSUCHIYA, T., Y. FUKAZAWA, S. HAYASHI, J. HAYASHI and M. DOI, 1957. Serological relationships among ascosporogenous and asporogenous yeasts. I. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candia robusta*. Jap. J. Microbiol. **1**, 125–131.

URIEL, J., 1958. Les réactions de caractérisation des constituants des liquides biologiques après électrophorèse en gélose. Clin. Chim. Acta **3**, 17–23.

URIEL, J. et P. GRABAR, 1956. Emploi des colorants dans l'analyse électrophorétic et immuno-électrophorétique en milieu gélifié. Ann. Inst. Past. **90**, 427–440.

URIEL, J. et J. J. SCHEIDEGGER, 1955. Electrophorèse en gélose et coloration des constituants. Bull. Soc. Chim. Biol. **37**, 165–168.

VAVILOV, N. I., 1925. Phylogenesis of wheat and the interspecies hybridization in wheats. Bull. Appl. Bot. Pl. Breed. **15**, 110–159.

WILCOX, H. W. and G. K. K. LINK, 1935. Serically active (haptenic) carbohydrates of genotypes of *Neurospora tetrasperma* and *N. sitophila*. Phytopathology **25**, 39.

WILLIAMS, C. A., jr. and P. GRABAR, 1955. Immuno-electrophoretic studies on serum proteins. J. Immunol. **74**, 158–168; 397–403 and 404–410.

WILSON, M. W. and B. H. PRINGLE, 1955. Interpretation of the Ouchterlony precipitin test. J. Immunol. **75**, 460–469.

WOLF, F. A. and F. T. WOLF, 1947. The fungi. Vol. II. London, XII + 538 pp.

WUNDERLY, CH., 1957. Die Immunoelektrophorese in Agar-Gel. Methode und Ergebnisse. Experientia **13**, 421–434.

ZELENOVA, N., 1937. (Summary of the scientific research work of the Institute of Plant protection for the year 1936. Part. II. Pests and diseases of industrial fruit crops). Publ. Off. Pan. Sov., V.I. Lenin Acad. Agric. Sci., Leningrad, 1937, 351–355. (Rev. Appl. Myc. **17**, 1938, 441).

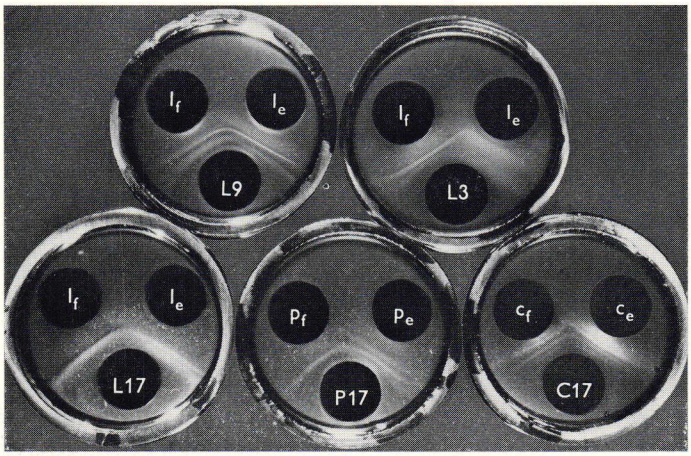


FOTO 1. Vergelijking van cultuurfiltraten en mycelium-extracten met de geldiffusie-methode.
l_f, p_f en c_f, filtraten van resp. *F.o.lupini*, *F.o.pisi* en *F.o.callistephi*.
l_e, p_e en c_e, extracten van resp. *F.o.lupini*, *F.o.pisi* en *F.o.callistephi*.
L 9 serum tegen filtraat van *F.o.lupini*.
L 3 serum tegen sporensuspensie van *F.o.lupini*.
L 17, P 17 en C 17, serums tegen extracten van resp. *F.o.lupini*, *F.o.pisi* en *F.o. callistephi*.

Comparison of culture liquids and mycelium extracts in gel diffusion precipitin tests.
l_f, p_f *and* c_f, *culture liquids of* F.o.lupini, F.o.pisi *and* F.o.callistephi, *resp.*
l_e, p_e *and* c_e, *extracts of* F.o.lupini, F.o.pisi *and* F.o.callistephi.
L 9 *serum against culture liquid of* F.o.lupini.
L 3 *serum against microconidial suspension of* F.o.lupini.
L 17, P 17 *and* C 17, *sera against extracts of* F.o.lupini, F.o.pisi *and* F.o.callistephi, *resp.*

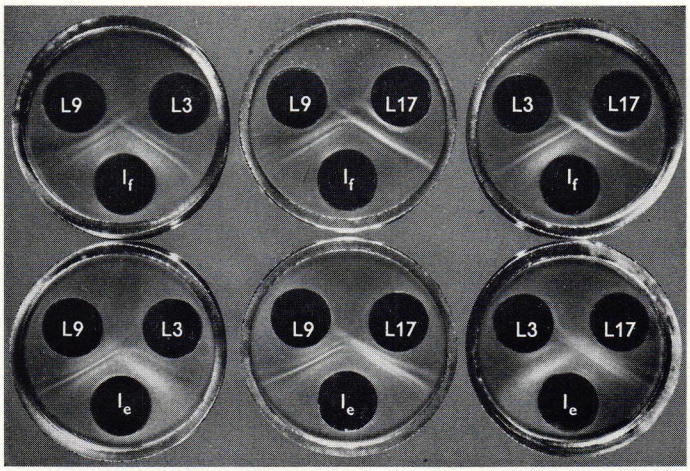


FOTO 2. Vergelijking van antiserums met de geldiffusie-methode. Symbolen als in foto 1.
Comparison of antisera in gel diffusion precipitin tests. Symbols as in photo 1.

FOTO 3

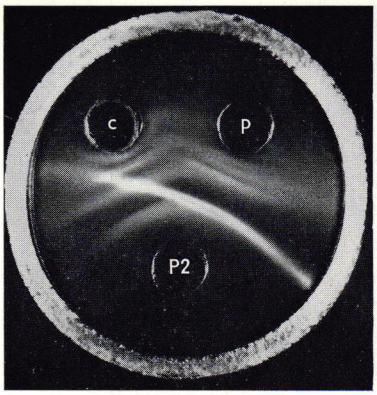


FOTO 4

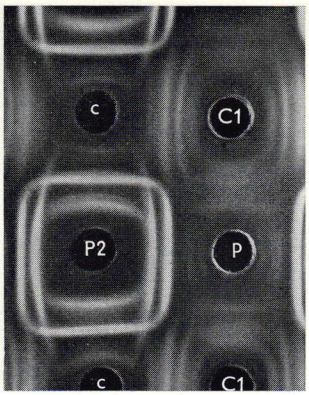


FOTO 3. Specifieke geldiffusie-reactie van het serum P 2 (tegen cultuurfiltraat van *F.o.pisi*), met de antigenen uit cultuurfiltraten van *F.o.callistephi* (c) en *F.o.pisi* (p).

Specific line pattern of the gel diffusion precipitin test of serum P 2 (against culture liquid of F.o.pisi), *with antigens from culture liquids of* F.o.callistephi (c) *and* F.o.pisi (p).

FOTO 4. Reciproke geldiffusie-reacties.
P 2, serum tegen *F.o.pisi.*
C 1, serum tegen *F.o.callistephi.*
p, cultuurfiltraat van *F.o.pisi*
c, cultuurfiltraat van *F.o.callistephi.*

Reciprocal gel diffusion precipitin tests.
P 2, *serum against* F.o.pisi.
C 1, *serum against* F.o.callistephi.
p, *culture liquid of* F.o.pisi.
c, *culture liquid of* F.o.callistephi.

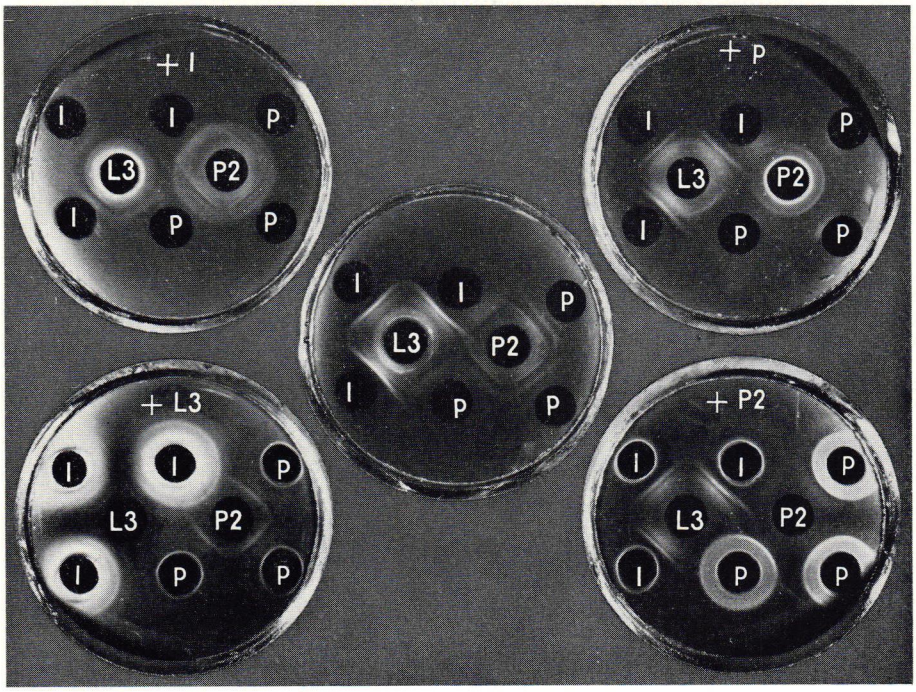


FOTO 5

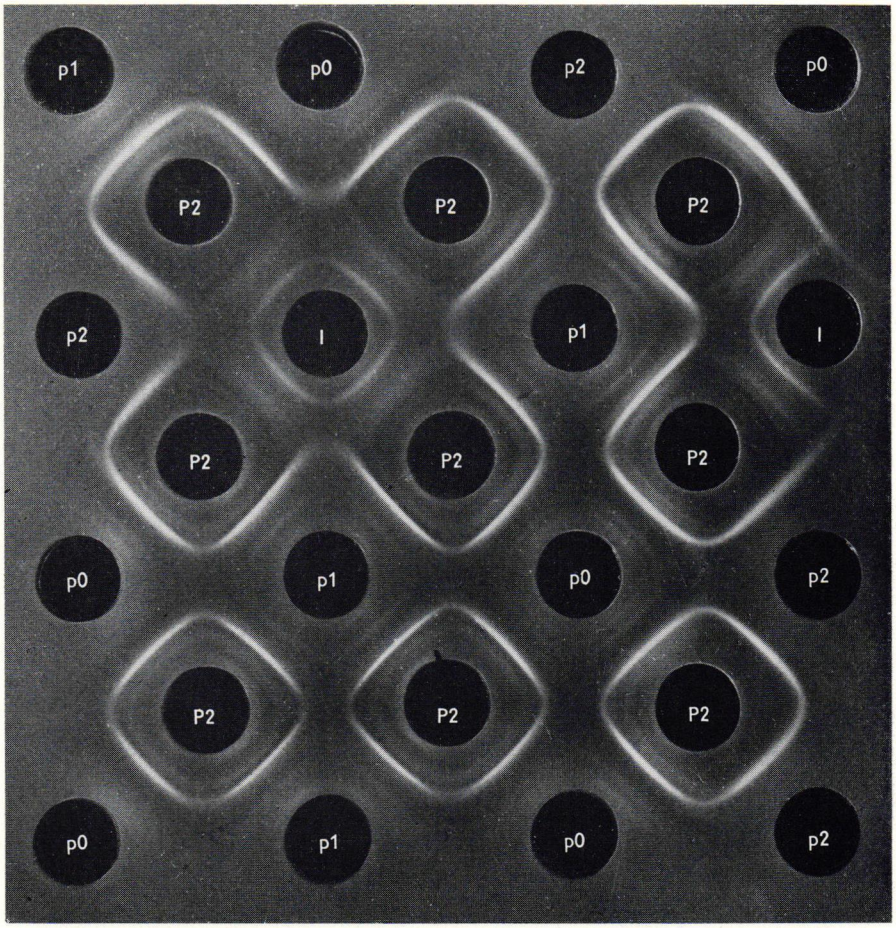


FOTO 6. Vergelijking van verschillende stammen van *F.o.pisi*.
P2 is serum tegen cultuurfiltraat van *F.o.pisi* (p0)
p1 en p2 zijn cultuurfiltraten van resp. *F.o.pisi* ras 1 en *F.o.pisi* ras 2 van het Centraal Bureau voor Schimmelcultures te Baarn.
1 is cultuurfiltraat van *F.o.lupini*.

Comparison of different strains of F.o.pisi.
P2 *is serum against culture liquid of* F.o.pisi (p0).
p1 *and* p2 *are culture liquids of* F.o.pisi *race 1 and* F.o.pisi *race 2 of the* "Centraal Bureau voor Schimmelcultures in Baarn".
1 is culture liquid of F.o.lupini.

Tekst foto 5

Specifieke remmingsreactie in agargel.
P 2, serum tegen *F.o.pisi*.
L 3, serum tegen *F.o.lupini*.
p, cultuurfiltraat van *F.o.pisi*.
l, cultuurfiltraat van *F.o.lupini*.
In de twee bovenste plaatjes werd de agar voor de reactie gemengd met een van de antigenen, in de onderste met één van de antiserums.

Specific inhibition in gel diffusion precipitin test
P 2, *serum against* F.o.pisi
L 3, *serum against* F.o.lupini.
p, *culture liquid of* F.o.pisi
l, *culture liquid of* F.o.lupini.
Before the reaction the agar was mixed with one of the antigens in the two plates above, and with one of the antisera in the two plates below.

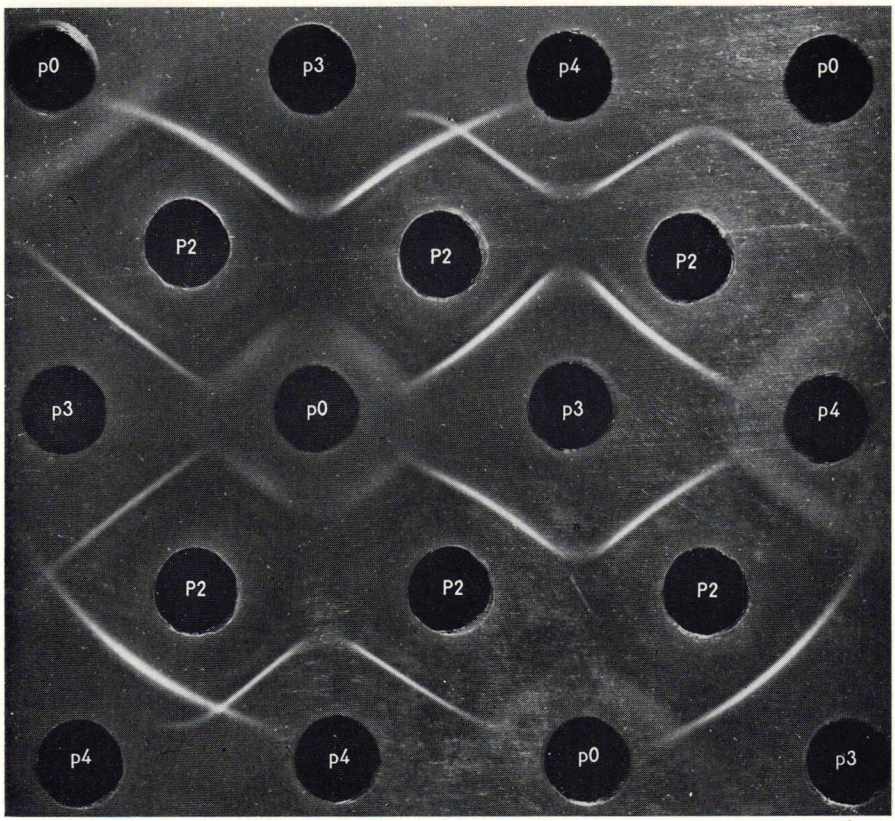
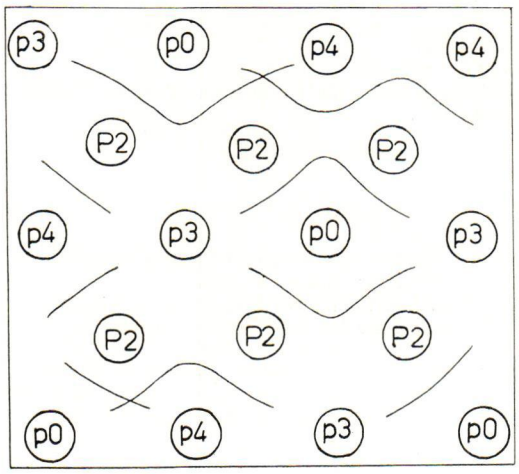


FOTO 7. Vergelijking van verschillende stammen van *F.o.pisi*.
P2 is serum tegen cultuurfiltraat van *F.o.pisi* (p0).
p3 en p4 zijn cultuurfiltraten van resp. *F.o.pisi* ras 1 en *F.o.pisi* ras 2 van de Plantenziektenkundige Dienst.

Comparison of different strains of F.o.pisi.
P2 *is serum against culture liquid of* F.o.pisi (p0). p3 *and* p4 *are culture liquids of* F.o.pisi *race 1 and* F.o.pisi *race 2 of the Plant Protection Service at Wageningen.*



ERRATUM FOTO 7

De symbolen in foto 7 zijn 180° ten opzichte van de foto gedraaid. Deze moeten gelezen worden als in de figuur hiernaast.

ERRATUM PHOTO 7

The symbols in photo 7 are turned 180° with respect to the photo. These symbols should be read as in the figure annexed.

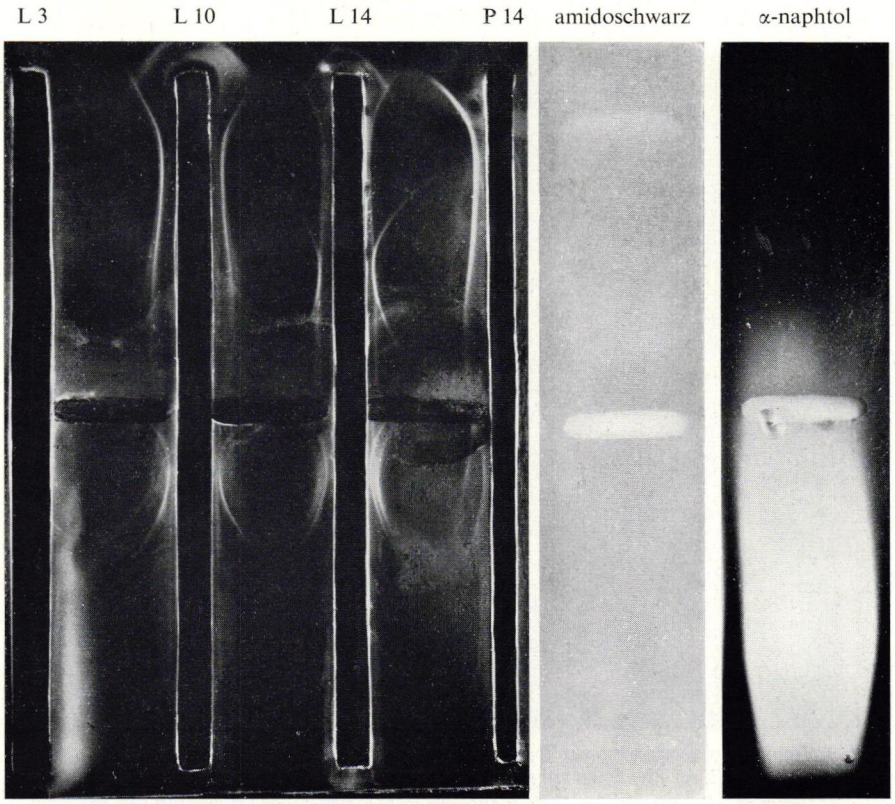


FOTO 8. Immuno-elektroforese van geconcentreerd cultuurfiltraat van *F.o.lupini*.
L 3, serum tegen sporensuspensie van *F.o.lupini*.
L 10, serum tegen cultuurfiltraat van *F.o.lupini*.
L 14, serum tegen mycelium-extract van *F.o.lupini*.
P 14, serum tegen mycelium-extract van *F.o.pisi*.

Immuno-electrophoresis of concentrated culture liquids of F.o.lupini.
L 3, *serum against microconidial suspension of* F.o.lupini.
L 10, *serum against culture liquid of* F.o.lupini.
L 14, *serum against mycelium extract of* F.o.lupini.
P 14, *serum against mycelium extract of* F.o.pisi.

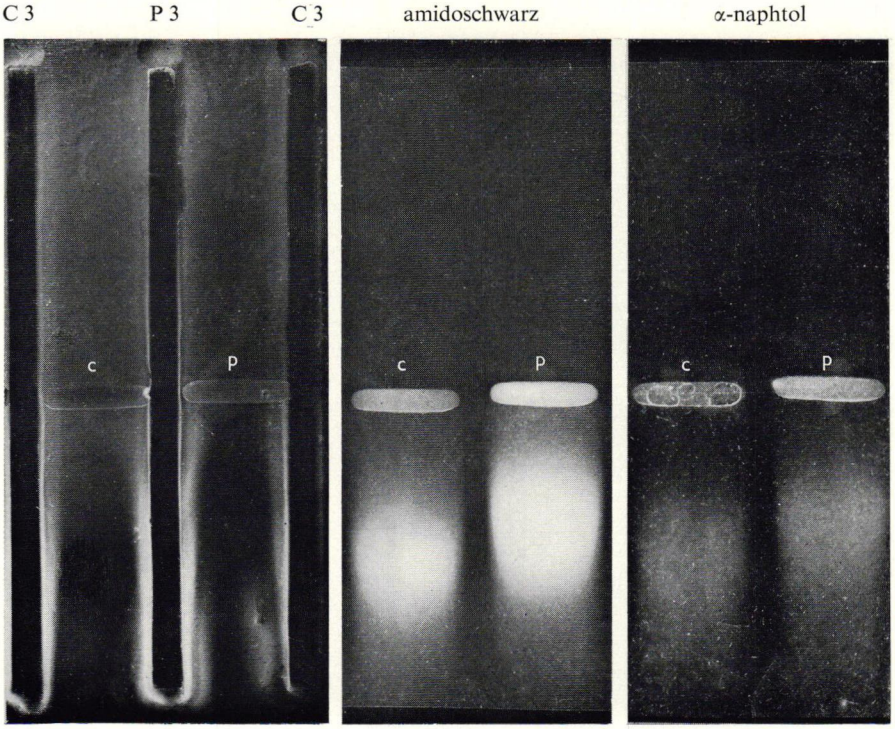


FOTO 9. Immuno-elektroforese van loogextracten van *F.o.callistephi* (c) en *F.o.pisi* (p).
C 3 en P 3, serums tegen sporensuspensies van resp. *F.o.callistephi* en *F.o.pisi*.
Immuno-electrophoresis of alkali extracts of F.o.callistephi (c) *and* F.o.pisi (p).
C 3 *and* P 3, *serums against microconidial suspensions of* F.o.callistephi *and* F.o.pisi, *resp.*