

DE INVLOED VAN AUXINE, TRYPTOFAAN EN ENIGE
ANORGANISCHE ZOUTEN OP DE INFECTIE VAN
NICOTIANA GLUTINOSA MET TABAKSMOZAÏEKVIRUS

WITH A SUMMARY

THE INFLUENCE OF AUXIN, TRYPTOPHANE AND SOME
INORGANIC SALTS ON THE INFECTION OF
NICOTIANA GLUTINOSA WITH TOBACCO MOSAIC VIRUS

LIEM ANNIE SWAT NIO



CENTRUM VOOR LANDBOUWPUBLIKATIES EN LANDBOUWDOCUMENTATIE

206902

**De auteur promoveerde op 3 mei 1963 aan de Landbouwhogeschool te Wageningen op een gelijk-
luidend proefschrift tot doctor in de Landbouwkunde.**

INHOUD

1	INLEIDING	1
1.1	Doel van het onderzoek	1
1.2	Enige literatuurgegevens	1
1.3	Het onderzoek van mevrouw M. RAVEN-LUCARDIE	4
2	HET EFFECT VAN AUXINEN EN VAN TRYPTOFAAN.	6
2.1	Materiaal en methodiek	6
2.2	Resultaten	8
2.2.1	Het effect van groeistoffen	8
2.2.2	Het effect van tryptofaan	9
2.2.3	De directe invloed van IAZ op de activiteit van TMV	10
2.3	Discussie	10
3	PROEVEN OVER HET MECHANISME VAN DE WERKING VAN β -INDOLYLAZIJN- ZUUR OP DE INFECTIE	12
3.1	Inleiding	12
3.2	Het tijdstip van inwerking van IAZ	12
3.3	De osmotische druk van perssap uit bladeren van <i>Nicotiana glutinosa</i>	13
3.3.1	Inleiding	13
3.3.2	Materiaal en methode	14
3.3.3	Resultaten	15
	a. Het effect van plantegroeistoffen op de osmotische druk van het perssap	15
	b. De osmotische druk van perssap uit bladeren welke niet met IAZ of met water waren behandeld	16
3.4	De oorzaak van de verlaging van de osmotische druk door IAZ	17
3.4.1	De invloed van IAZ op de waterabsorptie van de bladeren	17
3.4.2	Het effect van IAZ op het geleidingsvermogen van het perssap	18
	a. Inleiding	18
	b. Materiaal en methode	19
	c. Resultaten	19
3.4.3	Het geleidingsvermogen van de vloeistof waarop de bladeren hebben ge- dreven	20
3.4.4	De invloed van het volume van de oplossingen, waarop de bladeren dreven, op het aantal necrotische vlekjes	20
3.5	Discussie	21
4	DE SPECIFIEKE INVLOED VAN ENIGE ANORGANISCHE IONEN	22
4.1	De invloed van een mengsel van anorganische ionen	22
4.1.1	Inleiding en methode.	22

4.1.2	Resultaten	22
a.	De invloed van de zoutoplossing op de osmotische druk van het perssap	22
b.	De invloed van een oplossing van zouten op het aantal virusvlekjes	23
c.	Discussie	23
4.2	De invloed van drie kationen afzonderlijk	24
4.2.1	Inleiding en methode.	24
4.2.2	Resultaten	24
a.	Effect van een behandeling met calcium voor de inoculatie	24
b.	Effect van een behandeling met kalium en magnesium voor de inoculatie.	25
c.	Effect van het toevoegen van calcium, kalium of magnesium aan het virus	25
4.3	De invloed van fosfaat-ionen	26
4.3.1	Inleiding en methode.	26
4.3.2	Resultaten	26
4.3.3	Discussie.	27
5	NABESPREKING	28
	SAMENVATTING	31
	SUMMARY	34
	LITERATUUR.	44
	TABELLEN EN FIGUREN	

1 INLEIDING

1.1 DOEL VAN HET ONDERZOEK

Door mevrouw M. RAVEN-LUCARDIE werd van 1951 tot 1953 onderzoek verricht over de invloed van aminozuren en van β -indolylazijnzuur (IAZ) op de necrose die ontstaat als gevolg van infectie van *Nicotiana glutinosa* met tabaksmozaïekvirus (TMV). Hieruit bleek dat IAZ en in mindere mate D-tryptofaan, een reducerend effect hadden op de aantallen necrotische vlekjes op *N. glutinosa*-bladeren die voor de inoculatie op oplossingen van deze stoffen hadden gedreven. Dit effect kwam in het bijzonder tot uiting als de bladeren afkomstig waren van planten die gedurende een tot twee weken voor de inoculatie in zwak kunstlicht hadden gestaan.

Door bijzondere omstandigheden werd het onderzoek van mevrouw RAVEN niet gepubliceerd. Een kort overzicht van haar werk zal in 1.3 worden gegeven.

Mijn onderzoek was er in de eerste plaats op gericht, de door mevrouw RAVEN verkregen resultaten te verifiëren. Hierbij bleek dat IAZ inderdaad het effect van een inoculatie met TMV verlaagt. Tryptofaan had, naar in dit geschrift nader zal worden toegelicht, echter veel minder constante werking. Daarom werd dienaangaande geen verder onderzoek verricht, doch werd getracht het mechanisme van de werking van IAZ aan de hand van experimenten te verklaren. Dit leidde tot een onderzoek van het effect van auxine op de osmotische druk van perssap van *N. glutinosa*-bladeren. In samenhang hiermee werd nagegaan wat het effect is van een concentratieverandering van het perssap door middel van toediening van anorganische zouten op de vatbaarheid van *N. glutinosa* voor TMV.

1.2 ENIGE LITERATUURGEGEVENS

In het jaar 1929 nam HOLMES waar dat zich op de bladeren van *N. glutinosa* necrotische vlekjes ontwikkelden, enkele dagen nadat ze met TMV waren geïnoculeerd. De vlekjes waren scherp begrensd en daardoor gemakkelijk te tellen; hun aantal bleek af te hangen van de virusconcentratie.

Veel onderzoekers hebben van de door HOLMES beschreven necrose gebruik gemaakt om een onderzoek in te stellen naar de invloed van allerlei stoffen op het verloop en de gevolgen van de virusinfectie. Hierbij dient men te bedenken dat deze stoffen hun werking op geheel verschillende wijze kunnen laten gelden. De stof kan een directe werking op het virus hebben, resulterend in verlies van infectievermogen voordat het de cellen van de waardplant is binnengedrongen. Verder is het mogelijk,

dat de stof een dusdanige werking op de cellen van het geïnoculeerde blad heeft, dat geen infectie tot stand kan komen, hetgeen door BAWDEN (1954) als 'inhibition of virus infection' is aangemerkt. Ook is het denkbaar dat de stof na vestiging van het virus in de cel een invloed op het metabolisme uitoefent als gevolg waarvan de virusvermeerdering zich niet of slechts vertraagd voltrekt, door BAWDEN (1954) 'inhibition of virus increase' genoemd. Ten slotte kan men zich voorstellen, dat de werking van de stof berust op een dusdanige beïnvloeding van de fysiologische processen, dat de plant de virusinfectie meer tolereert, m.a.w. de ziekteverschijnselen zijn minder hevig of verdwijnen zelfs geheel zonder dat echter het proces van de virusvermeerdering wordt stil gelegd. Zo vonden FARKAS, KIRALY & SOLYMOSY (1960), dat afgeplukte bladeren van *N. glutinosa* na infiltratie met een ascorbinezuuroplossing geen necrotische vlekjes vormden als zij met TMV werden geïnoculeerd. Er bleek echter wel vermeerdering van dit virus op te treden, ofschoon in mindere mate dan in de met water geïnfiltreerde bladeren waarop wel vlekjes ontstonden.

Aangaande de vatbaarheid van *N. glutinosa* voor TMV, tot uitdrukking komend in het aantal necrotische vlekjes dat na inoculatie ontstaat, toonden BAWDEN & ROBERTS (1947, 1948), POUND & BANCROFT (1956) en WILTSHIRE (1956) aan, dat hierbij ook licht en duisternis een belangrijke rol spelen. Het bleek, dat die vatbaarheid zelfs binnen het etmaal wisselt. Zo vond MATTHEWS (1953), dat op bonebladeren de meeste necrotische vlekjes ontstaan, als zij tussen 10 en 17 uur met tabaksnecrosevirus worden geïnoculeerd.

Met het oog op mijn eigen onderzoek verdienen de plantegroeistoffen en de aminozuren bijzondere aandacht.

Plantegroeistoffen zijn bij allerlei groeiprocessen van de cel van zeer veel betekenis en werden daarom door vele schrijvers met virusinfectie in verband gebracht. Veelal werd bij deze onderzoeken van weefselcultures gebruik gemaakt. AUGIER DE MONTGREMIER & MOREL (1948) stelden vast, dat een hoge concentratie van naftylazijnzuur de ontwikkeling van TMV in tabakscallusweefsel remt. KUTSKY & RAWLINS (1950) konden dit bevestigen. Zij kweekten tabakscallusweefsel op agar. Was daarin $10^{-4}\%$ naftylazijnzuur aanwezig, dan had dit tot gevolg dat na drie of vier weken de hoeveelheid virus in het weefsel slechts 20 tot 40% bedroeg van de hoeveelheid virus in weefsel dat op een voedingsbodem zonder deze groeistof was gekweekt. KUTSKY (1952) vond een remmende werking van indolylboterzuur op de produktie van TMV in tabakscallusweefsel.

LOCKE (1948) stelde vast, dat 2,4-D de symptomen van bladrol bij aardappels maskeert. LIMASSET, LEVIEIL & SECHET (1948) rapporteerden dat plantegroeistoffen de vermenigvuldiging van het X-virus en van het Y-virus van de aardappel in tabak remmen. GENDRON (1950) nam hetzelfde waar voor kokosmelk.

PAVILLARD (1954) vond, dat in een plant geïnfecteerd met TMV de hoeveelheid auxine beneden het normale peil is gedaald. NICHOLS (1952) bespoot tabaksplanten met naftylazijnzuur en indolylboterzuur. De ontwikkeling van de symptomen van

tabaksmozaïek werd daardoor geremd. Indolylboterzuur gaf bij bepaalde concentraties de beste resultaten zonder dat de groei van de gastheer er nadelige gevolgen van ondervond. Voor de ene noch voor de andere groeistof werd een concentratie gevonden die de vermenigvuldiging van het virus geheel remde zonder dat aan de tabaksplanten schade werd toegebracht.

GONDO (1954) begoot met tussenpozen bladhelften van *N. glutinosa* met waterige oplossingen van naftylazijnzuur, indolylazijnzuur of 2,4-D, waarna de bladeren met TMV werden geïnoculeerd. Tot 96 uur na de bespuiting kon een remmend effect van de groeistof op het verloop van de infectie worden geconstateerd. GONDO vermoedde dat de groeistoffen de planten beïnvloedden en niet de activiteit van het virus. Hij zocht in een verhoging van de katalase-activiteit van de behandelde bladhelften een van de oorzaken van de verminderde vatbaarheid ten aanzien van het virus. BHATT & VERMA (1958) namen in een tomatenaanplant bij een groot aantal planten symptomen van 'tomato streak virus' waar. Na bespuiting van de planten met een oplossing van 3-indolylpropionzuur of van naftylazijnzuur trad binnen enkele weken herstel in. De desbetreffende publikatie vermeldt niet of hier sprake was van een vermindering van de virusconcentratie dan wel alleen van een vermindering van de gevoeligheid van de planten voor het virus.

In 1947 schreef CASPERSSON: 'The observations on the nucleic acid metabolism in the infected cell show that all viruses appear as parasites on the system for protein formation of the host cell, indicating that their own system for that is incomplete'. Er zou dus in de cel een concurrentie bestaan tussen enerzijds de normale eiwitopbouw en anderzijds de virusproductie. Indien dit juist is, zou het wellicht mogelijk zijn, hetzij op het ene, hetzij op het andere proces invloed uit te oefenen door toevoeging van bepaalde aminozuren. Inderdaad vonden VAN RAALTE & VAN DER WANT (1952) en RYZHKOV (1952), dat toediening van bepaalde aminozuren aan bladeren van *N. glutinosa* het effect van een infectie met TMV kan verminderen. Ook de hiervoor reeds genoemde waarneming van GENDRON (1950), dat kokosmelk de virusproductie remt, zou op deze wijze kunnen worden verklaard; kokosmelk bevat namelijk verschillende aminozuren.

Door BAWDEN (1954) is echter op dit soort onderzoeken, waarbij getracht wordt inzicht te verkrijgen in het mechanisme van de virusinfectie door bepaalde stoffen aan het virus of aan de plant toe te voegen, kritiek geoefend. Hij beriep zich daarbij op een onderzoek van BAWDEN & ROBERTS (1948) die waarnamen, dat het aantal door een virus teweeggebrachte vlekken groter wordt, wanneer men de plant voor de inoculatie in het donker plaatst. Zet men de plant na de inoculatie in het donker, dan is het resultaat juist omgekeerd: het aantal vlekken wordt dan kleiner. Op grond daarvan menen BAWDEN & ROBERTS te kunnen stellen, dat de virusinfectie in twee fasen verloopt. Na de inoculatie moet het virus eerst aanslaan, dat wil zeggen een cel binnendringen en daar waarschijnlijk nog veranderingen ondergaan. Pas daarna begint de tweede fase, de virusvermeerdering, en het laat zich verstaan dat die door licht (foto-

synthese!) wordt bevorderd. De waarneming dat licht ongunstig voor het verloop van de infectie is, indien men de plant er voor de inoculatie aan blootstelt, wijst er kennelijk op dat men hier met een invloed op de eerste fase van de infectie te doen heeft.

Als hoofdbezwaar van het werk van GENDRON, RYZHKOV en VAN RAALTE & VAN DER WANT ziet BAWDEN dat deze auteurs dit bestaan van twee fasen in het verloop van de infectie uit het oog verliezen: 'The way in which their tests are made precludes definite conclusions about whether the amino acids are inhibitors of infection, inhibitors of virus increase or of both'. Voor de genoemde onderzoeken moge dit waar zijn – het betekent nog niet, dat met andere verbindingen of met dezelfde verbindingen, maar onder andere omstandigheden toegediend, geen inzicht in het mechanisme van de virusinfectie zou kunnen worden verkregen. Indien het zou lukken, verband te leggen tussen de werking van een verbinding op de virusinfectie en haar werking op andere processen in de plant, zou men mogelijkerwijs het inzicht in deze materie wel kunnen verdiepen.

1.3 HET ONDERZOEK VAN MEVROUW RAVEN-LUCARDIE

Het in 1.2 genoemde onderzoek van VAN RAALTE & VAN DER WANT over de invloed van aminozuren op de infectie van *N. glutinosa* met TMV werd voortgezet door mevrouw RAVEN. Het werd in 1953 voorlopig afgesloten, maar is door bijzondere omstandigheden niet gepubliceerd. Daar het onderzoek, waarvan in de volgende bladzijden verslag wordt gedaan, er een rechtstreekse voortzetting van is, mogen de resultaten van haar werk hier kort worden vermeld.

In een aantal proeven onderzocht zij het effect van enige aminozuren op de infectie van *N. glutinosa* met TMV. Van de bladeren werd steeds de ene helft op een oplossing van het te onderzoeken aminozuur gelegd, terwijl de andere helft bij wijze van controle een plaats vond op gedistilleerd water. Twaalf tot achttien uur later werden de bladhelften afgespoeld met gedistilleerd water, vervolgens geïnoculeerd en daarna in petrischalen op vochtig filtreerpapier gelegd. Ten slotte werden de vlekjes die op beide bladhelften waren ontstaan, geteld.

In het begin bleken de uitkomsten zeer wisselend te zijn. Dezelfde verbinding bleek niet steeds hetzelfde effect te hebben: soms vertoonde de behandelde bladhelft meer vlekjes dan de niet behandelde helft, soms minder vlekjes en in andere gevallen was er geen verschil te constateren. Nadat de proeven gedurende enige jaren waren herhaald, viel het op, dat de uitkomsten van proeven, die korte tijd na elkaar waren genomen, wel overeenstemden. Gelijke proeven, op verschillende tijden van het jaar genomen, vielen echter vaak ongelijk uit. Kennelijk werden de uitkomsten vertroebeld door de een of andere seizoensinvloed. Omdat de bladhelften na het inoculeren vrijwel steeds onder gelijke omstandigheden verkeerden, moet die seizoensinvloed hebben

ingewerkt tijdens de periode die aan de proef voorafging, dat wil zeggen toen de planten in de kas werden opgekweekt.

Met deze ervaring voor ogen zette mevrouw RAVEN de planten een à twee weken voor het begin van de proef in een van het daglicht afgesloten ruimte onder een aantal Philips TL-fluorescentielampen, kleur 33. Een deel van de planten stond dicht bij de lampen, een ander deel wat verder van de lichtbron weg. In het eerste geval bedroeg de lichtsterkte aan de voet van de stengels 2600 Lux, in het tweede geval 1500 Lux.

Bij een dergelijke inrichting van de proef deed de invloed van het jaargetijde zich in veel mindere mate gelden. Echter bleek de invloed van een verbinding op het aantal vlekjes – indien die althans bestond – steeds het grootst te zijn bij de planten, die verder van de lampen, dus in zwakker licht, hadden gestaan.

Een soortgelijke waarneming werd enkele jaren later gerapporteerd door WEINTRAUB & KEMP (1955). Anders dan bij mevrouw RAVEN was hier het effect van verschillende verbindingen minder duidelijk bij de planten, die in zwakker licht hadden gestaan.

Na deze wijziging in haar proefmethodiek te hebben aangebracht, heeft mevrouw RAVEN nog de invloed van D-tryptofaan en van IAZ op het verloop van de infectie onderzocht. In beide gevallen bleek, dat op de behandelde bladhelften minder necrotische vlekjes waren ontstaan; het IAZ vertoonde echter een veel krachtiger werking dan het D-tryptofaan. Werden de aminozuren voor de inoculatie met het viruspreparaat gemengd, dan gaven ze geen enkele werking op het verloop van de infectie te zien. Het ging hier dus blijkbaar niet om een binding aan het virus, maar om een invloed die de toegediende verbindingen op de plant uitoefenden.

2 HET EFFECT VAN AUXINEN EN VAN TRYPTOFAAN

2.1 MATERIAAL EN METHODIEK

De planten van *N. glutinosa* werden gekweekt in de kas tot ze een leeftijd van ongeveer twee maanden hadden (planten met zeven of acht bladeren). Ongeveer een week voordat de blaadjes voor een proef werden gebruikt, werden de planten onder constant licht gebracht. Hiertoe werden ze geplaatst in een lage langwerpige kast onder vier evenwijdige Philips TL-fluorescentielampen, kleur 33. De planten en de lampen waren gescheiden door een glazen plaat. In de ruimte boven de plaat, waarin de lampen zich bevonden, kon de lucht met een ventilator worden ververst, om te voorkomen, dat de temperatuur in de kast te hoog werd.

Daar mevrouw RAVEN bij haar in 1.3 besproken proeven gevonden had, dat de invloed van een verbinding op de virusinfectie bij bladeren die in licht van verschillende intensiteit waren gekweekt, verschillend was, werden in de lichtkast de planten in twee lichtintensiteiten gehouden. De hoge lichtintensiteit was ongeveer 6400 Lux gemeten op circa 30 cm onder de lampen, dat is op 10 cm boven de pot ongeveer ter hoogte van het midden van de plant. De lage lichtintensiteit werd verkregen door op de glazen plaat, die de lampen van de planten scheidde, kaasdoek te leggen. Deze zo verkregen lichtintensiteit bedroeg ongeveer 183 Lux, gemeten op gelijke hoogte als bij de hoge lichtintensiteit. In het volgende worden de planten, die voor de proef in licht van 6400 Lux hadden gestaan 'planten uit sterk licht' genoemd, de planten die voor de proef bij 183 Lux hadden gestaan 'planten uit zwak licht'. Deze aanduidingen slaan dus op de behandelingen die de planten gedurende een week voor de eigenlijke proef ondergingen.

Voor zover mogelijk werden bij de proeven bladeren van gelijke leeftijd gebruikt: de bladeren werden geplukt en door een snede langs de middennerf in gelijke helften verdeeld. De invloed van een verbinding op de viruswerking werd onderzocht door van een blad de ene helft in een petrischaal op een oplossing van de verbinding te laten drijven, en de andere op gedistilleerd water. De bladhelften werden in de tijd, dat ze op oplossingen dreven en na de inoculatie altijd met dezelfde intensiteit belicht. De petrischalen werden geplaatst op 30 cm afstand van 5 evenwijdige, 15 cm van elkaar geplaatste, continu brandende Philips TL-fluorescentielampen van 60 Watt, kleur 33.

Na een nacht (ongeveer 16 uur) werden de bladhelften goed met leidingwater afgespoeld. Ze werden meestal zo goed mogelijk tussen filtreerpapier gedroogd en daarna met carborundumpoeder (500 mesh) bestrooid. Dan werden ze met TMV geïnoculeerd. De virusoplossing werd verkregen uit perssap van met TMV geïnoculeerde bladeren

van *Nicotiana tabacum* var. 'White Burley'. Het sap werd gedurende 10 minuten op 50–60°C verhit. De groene bestanddelen werden daarna verwijderd door centrifugeren gedurende 30 minuten bij 4000–5000 toeren per minuut. Deze ruwe virusoplossing werd bij –20°C bewaard.

Na de inoculatie werden de bladhelften in gesloten petrischalen op vochtig filtreerpapier gelegd. Ook nu werden ze op de bovenbeschreven wijze in constant licht geplaatst. De lichtintensiteit waarin de blaadjes na de inoculatie verbleven, was dus gelijk voor alle bladeren, of zij voor de proef in sterk dan wel in zwak licht hadden gestaan.

Nadat de vlekjes zich ontwikkeld hadden, werden ze geteld. Het effect van iedere behandeling werd in iedere proef bepaald aan minstens 10 bladhelften.

KLECZKOWSKI (1949) vond, dat de verdeling van het aantal virusvlekjes, die door een bepaalde concentratie van TMV op een aantal *N. glutinosa*-bladeren veroorzaakt worden, geen normale is. Men mag dus niet zonder meer de betrouwbaarheid van het resultaat bepalen met methoden, die op een normale verdeling gebaseerd zijn. KLECZKOWSKI toonde aan, dat door een eenvoudige transformatie de verdeling van de resultaten wel normaal kon worden gemaakt. Hiertoe paste hij de volgende formule toe: $y = \log(x + c)$, waarin x het getelde aantal vlekjes is en c een constante. Ik heb bij het berekenen van de resultaten steeds deze transformatie toegepast, waarbij c op 1 werd gesteld.¹ Van het met 1 vermeerderde aantal vlekjes op iedere behandelde bladhelft en op de onbehandelde controlehelft werden de logaritmen berekend. Het verschil van deze logaritmen werd bepaald. Per object werden zoveel verschillen verkregen, als er bladeren werden gebruikt. Daar het hier verschillen van logaritmen betreft, gaat het bij de vergelijking van twee corresponderende bladhelften dus eigenlijk om de logaritme van het quotiënt:

$$\frac{\text{aantal vlekken op de behandelde bladhelft} + 1}{\text{aantal vlekken op de controlehelft} + 1}$$

Het gemiddelde van deze quotiënten geeft het resultaat van de proef. De middelbare fout wordt niet in de tabellen vermeld. Een positief effect wordt in de tabellen weergegeven met het teken Δ , als het quotiënt: $\frac{\text{gemiddeld verschil}}{\text{middelbare fout}}$ groter is dan de waarde uit de t-tabel van FISHER voor $P = 0,01$, en met het teken $\square$, als het quotiënt: $\frac{\text{gemiddeld verschil}}{\text{middelbare fout}}$ groter is dan de waarde uit de t-tabel van FISHER voor $P = 0,05$; $\circ$ betekent, dat er geen effect is. In een aantal tabellen werd de betrouwbaarheid van de tussen de behandelingen gevonden verschillen met een parametervrije toets berekend. Hiervoor werd de tekentoets of de toets van WILCOXON gebruikt.

¹ De waarde van c werd door de heer C. VAN DEN ANKER, Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen, uit de proefnemingen berekend.

2.2 RESULTATEN

2.2.1 Het effect van groeistoffen

Het effect van een behandeling van de planten met β -indolylazijnzuur (IAZ), α -naftylazijnzuur (NAZ) en 2,4-dichloorfenoxiazijnzuur (2,4-D) voor de inoculatie met virus, is weergegeven in tabel 1.

IAZ veroorzaakte bij planten uit zwak licht een sterke vermindering van het aantal necrotische vlekjes, die hier in de vijf weergegeven proeven significant is. Bij planten uit sterk licht veroorzaakte IAZ in twee van de vijf proeven een significante vermindering van het aantal vlekjes; in de proeven 12 en 17 had het geen effect en in proef 10 was in de met IAZ behandelde bladhelften het aantal vlekjes hoger dan in de controle.

Bij bladeren van planten uit zwak licht verminderde NAZ het aantal necrotische vlekjes in drie van de vijf proeven. Onder deze omstandigheden had een behandeling met 2,4-D in twee gevallen meer en in drie gevallen minder vlekjes, vergeleken met de controles, tot gevolg.

De met NAZ verkregen resultaten wijken af van die van mevrouw RAVEN. Zij vond geen effect van NAZ op het aantal necrotische vlekjes. In haar proeven had slechts een van de drie groeistoffen, namelijk IAZ, een verlagend effect. Dit werd toen als een aanwijzing beschouwd, dat het niet de auxine-eigenschap van IAZ zou zijn, waardoor deze stof het ontstaan van een kleiner aantal virusvlekjes veroorzaakt.

In de hier weergegeven proeven heeft nu echter ook een andere groeistof, namelijk NAZ, een uitgesproken verlagende invloed op het aantal door TMV veroorzaakte vlekjes. Het effect van de groeistof 2,4-D is onduidelijk.

Daar het al of niet werkzaam zijn van andere groeistoffen dan IAZ voor de interpretatie van het gevonden effect zeer belangrijk is, werd de invloed van een voorbehandeling met verschillende concentraties van de drie groeistoffen nog eens, in een groot aantal proeven, onderzocht.

Het resultaat van deze proeven is weergegeven in de figuren 1 tot en met 4. Ieder punt is het gemiddelde verschil van de logaritme van het aantal vlekken op de bladhelft die op groeistof, en de logaritme van het aantal vlekken op de bladhelft die op water had gedreven. Het gemiddelde is berekend uit minstens 10 bladeren. Uit deze grafieken blijkt, dat alle groeistoffen in de concentraties $10^{-2}\%$, $2 \times 10^{-3}\%$ en $10^{-3}\%$ een reducerende werking op het aantal vlekken hebben.

Deze werking schijnt afhankelijk van de concentratie, behalve bij NAZ. Het is echter wel mogelijk, dat de maximale vermindering van het aantal vlekjes in het geval van NAZ reeds bereikt was bij de laagst onderzochte concentratie van $10^{-3}\%$.

Hogere concentraties dan $10^{-2}\%$ waren toxisch en konden dus niet worden onderzocht. De concentraties beneden $10^{-3}\%$ van IAZ en 2,4-D schenen verhoging van het aantal necrotische vlekjes tengevolge te hebben.

Terwijl IAZ en NAZ in de concentraties van $10^{-2}\%$ in vele gevallen het aantal necrotische vlekjes deden afnemen, is de invloed van 2,4-D onregelmatiger, doordat hier de concentratie van $10^{-2}\%$ ook wel een vermeerdering van het aantal necrotische vlekjes veroorzaakte.

Het verschil tussen planten, die in sterk of in zwak licht hadden gestaan, is in de grafieken niet direct zichtbaar. Wanneer men echter berekent, in hoeveel procent van de proeven het IAZ een significante vermindering gaf, dan ziet men, dat dit bij planten uit zwak licht in 60% en bij de uit sterk licht afkomstige planten slechts in 38% van de proeven het geval is.

2.2.2 Het effect van tryptofaan

De invloed van tryptofaan is weergegeven in tabel 2. De bladhelften dreven een nacht op een tryptofaanoplossing en de controles dreven dezelfde tijd op water. In totaal werden 33 proeven met tryptofaan uitgevoerd en voor iedere proef werden 10 of meer blaadjes gebruikt. In tabel 2 is het aantal proeven weergegeven, waarin een verhoging of verlaging van het aantal vlekken in de behandelde bladhelften werd waargenomen en waarbij het quotiënt: $\frac{\text{gemiddeld verschil}}{\text{middelbare fout}}$ groter is dan de waarde uit de t-tabel van FISHER voor $P = 0,01$ of $P = 0,05$. Onder het hoofd 'geen effect' is het aantal proeven genoemd, waarin tevoren genoemd quotiënt minder is dan de waarde voor $P = 0,01$ of $P = 0,05$ uit de t-tabel van FISHER.

Werd D-tryptofaan toegediend, dan bleek bij planten uit sterk licht, dat van de 12 genomen proeven 9 geen effect hadden. In de drie andere proeven werd een verlagerende invloed op het aantal necrotische vlekjes geconstateerd. Bij planten uit zwak licht had het D-tryptofaan in 7 proeven geen effect en in 5 proeven werkte het verlagerend op het aantal vlekjes van TMV.

In 12 van de 13 proeven had het L-tryptofaan bij planten uit sterk licht geen invloed en in een proef verhoogde het het aantal necrotische vlekjes. Bij zwak belichte planten had het in 9 proeven geen effect, in 2 proeven een verlagerende en in 2 andere proeven een verhogende werking op het aantal necrotische vlekjes van TMV.

De DL-vorm van tryptofaan had bij planten uit sterk licht in alle proeven (6) geen invloed. Bij planten, die onder zwak licht hadden gestaan, had het in 5 proeven geen effect en in 3 proeven een verhoging van het aantal necrotische vlekjes veroorzaakt.

Uit bovengenoemde resultaten kan geconcludeerd worden, dat de drie vormen van tryptofaan in de meeste gevallen bij aan sterk licht onderworpen planten geen effect hadden. L- en DL-tryptofaan hadden bij planten, die aan zwak licht waren blootgesteld geweest, meestal eveneens geen invloed op het aantal necrotische vlekjes van TMV. D-tryptofaan echter veroorzaakte in de helft van het aantal proeven een verlaging van het aantal vlekjes, in de andere helft had het geen effect.

2.2.3 De directe invloed van IAZ op de activiteit van TMV

De in 2.2.1 beschreven werking van IAZ zou kunnen berusten op een inactivering van het virus door het IAZ of op een inwerking op de plant, waardoor deze minder met necrose reageert.

Het IAZ werd tot nu toe aan het blad toegediend. Het virus werd aan de tegenovergestelde zijde in het blad geïnoculeerd. Om op elkaar te kunnen inwerken, moeten virus en IAZ elkaar dus in de plant ontmoeten.

Indien de werking van IAZ op een binding aan het virus zelf berust, zou dit evengoed kunnen geschieden, indien groeistof en virus voor de inoculatie werden gemengd.

Om na te gaan, of IAZ de activiteit van TMV direct beïnvloedt, werd het virus met een 0,01 % IAZ-oplossing of, als controle, met gedistilleerd water, gemengd in een verhouding van 1 : 1. Deze mengsels bleven gedurende verschillende tijden, nl. 1 uur, 6½ uur, 16 uur en 24 uur bij kamertemperatuur. Dan werden ze geïnoculeerd op bladeren van *N. glutinosa*-planten, die tevoren gedurende 6-7 dagen sterk of zwak waren belicht. Van een bladhelftenpaar werd op de ene bladhelft het IAZ-TMV-mengsel en op de andere het water-TMV-mengsel geïnoculeerd. De invloed van het IAZ werd bepaald uit de aantallen vlekjes op bladhelften, die respectievelijk geïnoculeerd waren met het water-TMV- en het IAZ-TMV-mengsel. Deze aantallen werden dan volgens KLECZKOWSKI (1949) getransformeerd en statistisch verwerkt (zie 2.1).

De resultaten van deze proeven zijn in tabel 3 samengevat. Uit deze tabel blijkt, dat bij planten uit sterk licht in 3 van de 9 proeven en bij planten uit zwak licht in 2 van de 9 proeven het mengsel van IAZ en virus significant minder vlekken veroorzaakt dan het virus alleen. Vergelijkt men dit resultaat met dat van een voorbehandeling van de bladhelften met IAZ (tabel 1), dan lijkt het zeer waarschijnlijk, dat het contact tussen groeistof en virus geen inactivering van het laatste tot gevolg heeft. Waardoor in ongeveer 30% van de proeven het mengsel van virus en auxine wel minder vlekken gaf dan de controle, valt niet met zekerheid te zeggen. Een verband met de tijd voor de inoculatie, waarop het mengsel gemaakt werd is er blijkbaar niet. Uit in het volgende hoofdstuk beschreven proeven is gebleken, dat in sommige gevallen ook na de inoculatie een behandeling met IAZ nog invloed kan hebben op het aantal virusvlekjes. Dan kan dus zeker een gelijktijdig toedienen effect hebben, doch dit effect berust dan niet op een inactivering *in vitro* van het virus door het auxine.

2.3 DISCUSSIE

De in dit hoofdstuk vermelde resultaten bevestigen de uitkomst van de proeven van mevrouw RAVEN, dat IAZ voor de inoculatie aan de bladeren toegediend, het effect van een inoculatie met TMV verlaagt.

Tryptofaan had een zeer variabele werking. Het is wel zeker, dat in mijn proeven

L- en DL-tryptofaan geen effect hadden. Van D-tryptofaan werd soms een duidelijk verlagend effect op het aantal virusvlekjes gevonden, doch vaak had dit isomeer geen invloed. Dat het D-isomeer een werking zou uitoefenen en het L-isomeer niet, is op zichzelf niet uitgesloten. Zo vond VAN ANDEL (1958), dat de symptomen van het vruchtvuur (*Cladosporium cucumerinum* Ell. et Arth.) op komkommer geringer waren bij plantjes, die tevoren D-serine hadden opgenomen, dan bij de controleplantjes. L-Serine vertoonde dit effect niet.

Het feit, dat IAZ in voldoende hoge concentratie steeds het effect van een inoculatie met TMV verlaagde, terwijl tryptofaan dit slechts in een deel van de proeven deed, geeft misschien een aanwijzing omtrent het verband tussen de werking van deze verbindingen. Dat ook NAZ eenzelfde invloed op het aantal virusvlekjes heeft als IAZ wijst er op, dat de werking van deze verbindingen op hun auxinekarakter berust. IAZ en tryptofaan zijn biochemisch verwante verbindingen. Door GORDON & SANCHEZ NIEVA (1949), THIMANN (1935) en WILDMAN, FERRI & BONNER (1947) is aangetoond, dat in de plant auxine uit tryptofaan kan ontstaan. Het lijkt hierom wel plausibel aan te nemen, dat, in de gevallen waarin D-tryptofaan het aantal virusvlekjes verlaagde, uit deze verbinding in de plant IAZ is ontstaan. In de gevallen waarin tryptofaan geen effect had, zou de omzetting in IAZ niet of met te geringe snelheid hebben plaats gehad. Toegegeven moet echter worden, dat het feit, dat ook van andere aminozuren dan tryptofaan wel een verminderende werking op het aantal virusvlekjes geconstateerd is (RYZHKOV, 1952; VAN RAALTE & VAN DER WANT, 1952), een werking van tryptofaan langs een reactieketen waarin IAZ niet voorkomt, niet uitsluit.

Uit 2.2.3 blijkt verder, dat IAZ, wanneer het met het virus wordt gemengd, geen invloed heeft op het aantal vlekjes. Om effect te hebben, moet de auxine tevoren aan de plant zijn toegediend. Hieruit volgt, dat het effect tot stand komt door inwerking van de auxine op de plant.

3 PROEVEN OVER HET MECHANISME VAN DE WERKING VAN β -INDOLYLAZIJNZUUR OP DE INFECTIE

3.1 INLEIDING

De in hoofdstuk 2 beschreven resultaten leiden tot de conclusie dat IAZ het virus niet rechtstreeks inactieveert, doch dat het de plant in een toestand brengt, waarin deze minder necrotische vlekjes vormt.

Om enig inzicht te krijgen in de aard van deze invloed van IAZ op de virusinfectie kan men verschillende wegen inslaan. Zo kan men zich afvragen in welk stadium van de virusinfectie het IAZ zijn werking uitoefent. Proeven hierover zijn beschreven in 3.2.

Een andere wijze om inzicht te krijgen in het verband tussen IAZ en virus is, te zoeken naar andere effecten van de groeistof in de plant en na te gaan of deze veranderingen invloed hebben op de virusinfectie. Een dergelijk effect van IAZ is een verandering van de osmotische druk van de cellen. Proeven hierover zijn beschreven in 3.3, 3.4 en 3.5.

3.2 HET TIJDSTIP VAN INWERKING VAN IAZ

Om te onderzoeken op welk tijdstip de auxine moet worden toegediend, werden met bladeren van *N. glutinosa*-planten, die in zwak licht hadden gestaan, twee series proeven ingezet, die onder I en II worden behandeld.

I. Een behandeling met IAZ voor de inoculatie met TMV. Hierbij werd het blad in twee helften verdeeld. Een bladhelft werd op een IAZ-oplossing en de andere gedurende 1 nacht op water gelegd. De volgende dag werden beide bladhelften uit de oplossingen gehaald en met TMV geïnoculeerd. Direct hierna werden ze op water gelegd, waarop ze wederom 1 nacht bleven liggen. Na deze twee nachten werden ze in een petrischaal op vochtig filtreerpapier overgebracht voor de vorming van necrotische vlekjes. Het behandelingsschema is dus als volgt:

Bladhelft a: 1 nacht IAZ; inoculatie met TMV; 1 nacht water; filtreerpapier.

Bladhelft b: 1 nacht water; inoculatie met TMV; 1 nacht water; filtreerpapier.

II. Een behandeling met IAZ na de inoculatie met TMV. Hierbij werden de beide bladhelften van hetzelfde blad 1 nacht op water gelegd, waarna zij de volgende dag met virus werden geïnoculeerd. Na de inoculatie werden ze gedurende een tweede nacht op respectievelijk IAZ-oplossing en water gelegd. Daarna werden ze evenals in

serie I op nat filtreerpapier in een petrischaal gebracht voor de vorming van vlekjes. In het kort is deze behandeling dus als volgt:

Bladhelft a: 1 nacht water; inoculatie met TMV; 1 nacht IAZ; filtreerpapier.

Bladhelft b: 1 nacht water; inoculatie met TMV; 1 nacht water; filtreerpapier.

De resultaten van deze proeven zijn in tabel 4 verwerkt. Het effect in beide behandelingen (I en II) is ook hier weergegeven als het gemiddelde verschil van de logaritmen van het aantal vlekjes op de met water en de met IAZ behandelde bladhelften, dus tussen b en a. Voor de statistische verwerking van de aantallen vlekjes wordt verwezen naar 2.1.

Uit tabel 4 blijkt, dat in 3 van de 5 proeven bij een voorbehandeling IAZ een significant of zeer significant reducerend effect op het aantal vlekjes van TMV heeft gehad (serie I, proeven 25, 26 en 27). Bij een nabehandeling had het in 4 van de 5 proeven ook een significant reducerende invloed op het aantal necrotische vlekjes (serie II, proeven 23, 24, 25 en 27).

De resultaten leiden tot de conclusie, dat ook een behandeling met IAZ na de inoculatie reducerend kan werken op het aantal necrotische vlekjes van TMV. Verder laten de verkregen resultaten geen conclusie toe omtrent het stadium van de virusinfectie, waarop IAZ inwerkt. Het blijkt immers dat auxine na het tijdstip van inoculatie toegediend eveneens vermindering van het aantal vlekjes kan geven. Dit betekent dat het effect van auxine, die voor de inoculatie is gegeven, tot stand kan zijn gekomen door inwerking, zowel op het eerste als op het tweede stadium van de infectie (vergelijk blz. 3). Op de vraag op welk tijdstip na de inoculatie een behandeling met IAZ het aantal vlekken niet meer beïnvloedt, zou het antwoord gevonden kunnen worden in tijdsproeven. De grote variabiliteit van het materiaal vereist voor het vastleggen van dit tijdstip echter zoveel proeven, dat het onderzoek praktisch onuitvoerbaar blijkt te zijn. Enige pogingen in die richting zijn verricht, maar zij brachten niet veel aan het licht.

3.3 DE OSMOTISCHE DRUK VAN PERSAP UIT BLADEREN VAN *Nicotiana glutinosa*

3.3.1 Inleiding

Door PANZER (1957) werd gevonden, dat de osmotische waarde van cellen de virusinfectie beïnvloedt. Hij plaatste 'Pinto'-bonen in oplossingen van glucose, rietsuiker of calciumchloride van verschillende concentraties en inoculeerde de bladeren twee dagen later met een stam van TMV. Het kleinste aantal vlekjes ontstond op de bladeren van de planten die op de oplossingen met de hoogste concentratie hadden gestaan. Persap uit deze bladeren had ook de hoogste osmotische druk. PANZER concludeerde hieruit, dat een hoge osmotische druk in de cellen de virusinfectie tegengaat. Een bevestiging

hiervan zag hij in het feit, dat perssap uit de pulvini van de 'Pinto'-boon, welke volgens YARWOOD (1954a) resistent tegen TMV zijn, een hogere osmotische druk had dan perssap uit de bladschijven, welke niet resistent bleken.

PANZER brengt zijn resultaten in verband met de invloed die licht op de virus-infectie uitoefent. In 1947 vonden BAWDEN & ROBERTS, dat een vermindering van de lichtintensiteit, waaronder de planten groeien, de gevoeligheid voor infectie door het virus verhoogt. MATTHEWS (1953) vond, dat na inoculatie in de middag meer vlekjes en na inoculatie tegen het einde van de nacht minder vlekjes ontstaan. Wanneer boneplanten gedurende 1 uur voor of 1 uur na de inoculatie met tabaksnecrosevirus bij verschillende temperaturen variërende van 55–82°F (circa 13–28°C) werden gezet, werd het aantal necrotische vlekjes verhoogd. Het licht scheen bij de dagelijkse veranderingen van de gevoeligheid voor het virus een belangrijker rol te spelen dan de temperatuur. Deze lichtinvloed bleef bestaan, zelfs wanneer de planten voor en na de inoculatie onder constante omstandigheden werden geplaatst. Ook WEINTRAUB & KEMP (1958) vonden, dat *N. glutinosa*-planten in het donker een verhoogde vatbaarheid voor TMV verkregen.

PANZER oppert nu de mogelijkheid, dat de door bovengenoemde onderzoekers gevonden verhoging van de vatbaarheid van de planten voor het virus bij verminderde belichting tot stand zou komen, doordat in zwak licht de osmotische druk van de cellen gedaald was.

De resultaten van PANZER waren aanleiding om te onderzoeken of de door IAZ verminderde vatbaarheid voor TMV gepaard gaat met een verhoogde osmotische druk.

3.3.2 Materiaal en methode

Evenals in de proeven van hoofdstuk 2 werden de planten van *N. glutinosa* gedurende 6–7 dagen in een lichtkast in sterk of in zwak licht geplaatst. Van deze planten werden de bladeren geplukt en in twee helften geknipt. Gedurende 1 nacht werden de ene bladhelte met de onderkant op een oplossing en de andere als controle op water gelegd. Dan werden ze tussen filtreerpapier gedroogd en in een Dewarvat met vast koolzuur gedurende 1 minuut, of bij –20°C gedurende 1 nacht, bevroren. Daarna waren ze gereed voor de bepaling van de osmotische waarde, waarbij gebruik werd gemaakt van een kryoscopische methode (gewijzigd naar RICHARDS & CAMPBELL, 1949). Hiertoe werden de bevroren bladeren na ontdooien met een tang uitgeperst. Als dit voorzichtig gebeurde, kwam er een kleine hoeveelheid heldergeel sap uit. Dit werd opgevangen in een klein reageerbuisje. In dit buisje werd een N.T.C.-weerstand, een zogenaamde thermistor, geplaatst. De weerstand van een thermistor neemt toe, naarmate de temperatuur daalt, en is dus een maat voor de temperatuur. De grootte van de N.T.C.-weerstand werd gemeten met een brug van Wheatstone van de firma Bleeker

in Zeist, waarvan de gevoeligheid vergroot kon worden door in plaats van de ingebouwde galvanometer een A-75 van de firma Kipp in te schakelen.

Een koudmakend mengsel met een temperatuur van ongeveer -10°C werd gemaakt van NaCl en fijngemaakt ijs. Het buisje met de oplossing werd nu in dit ijs-zoutmengsel geplaatst tot de onderkoelde vloeistof plotseling bevroor. Op dat moment werd het buisje snel overgebracht naar een Dewarvat met een 5% glycerine-oplossing, waaraan ijs was toegevoegd. De temperatuur hiervan was ongeveer -2°C . De temperatuursveranderingen werden als weerstandsveranderingen gemeten. De weerstand veranderde als volgt: Als de vloeistof werd onderkoeld, daalde de temperatuur en de weerstand steeg. Bij het bevriezen, dat plotseling gebeurde, daalde de weerstand snel, dat wil zeggen, dat de temperatuur steeg tengevolge van het vrijkomen van de bevroeringswarmte. Aan het eind van het bevroeringsproces ging de temperatuursstijging over in een langzame temperatuursdaling. De temperatuur, die het perssap bij deze overgang had, werd als vriespunt aangenomen. Dit is niet geheel juist. Voor deze proeven was het echter niet nodig het vriespunt precies vast te leggen, omdat het bij het proefobject en bij de saccharose-standaard op dezelfde wijze werd benaderd.

Voor het vaststellen van een ijkcurve werden op bovenstaande manier van 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 en 0,5 Mol saccharose-oplossingen het vriespunt bepaald. Als de weerstand werd uitgezet tegen de concentratie van de saccharose-oplossingen werd een rechte lijn verkregen. Door interpolatie van de voor het vriespunt van het perssap gevonden waarde op deze lijn kon de osmotische druk van het perssap worden uitgedrukt als equivalent met die van een saccharose-oplossing van een bepaalde concentratie (fig. 5).

Het is niet waarschijnlijk, dat het perssap dezelfde samenstelling heeft als het celvocht. De samenstelling van dit laatste is het resultaat van actieve accumulatie-processen, waarbij de ademhalingsenergie gebruikt wordt om ionen tegen een concentratieverval in te verplaatsen (vgl. ARISZ, 1960). Na het ontdooien van de bevroren cellen stelt zich onmiddellijk een evenwicht in tussen de aan de macromoleculen geadsorbeerde ionen en de omgevende oplossing. Indien na een auxinebehandeling het perssap een andere concentratie heeft, behoeft dit niet te betekenen, dat het celvocht in concentratie verlaagd was. Dit laatste is echter wel waarschijnlijk, daar in volwassen cellen de vacuole een zeer groot deel van het celvolume omvat en het protoplasma een relatief klein volume van de cel inneemt.

3.3.3 Resultaten

a. Het effect van plantegroeistoffen op de osmotische druk van het perssap

Een proef waarin de invloed van IAZ op de osmotische druk van het perssap van bladhelften van *N. glutinosa*, die 1 nacht op IAZ gedreven hadden, werd nagegaan, is in tabel 5 weergegeven. De proef werd gedaan met 10 bladeren van *N. glutinosa*-planten, die in zwak licht hadden gestaan. De gemeten waarden, uitgedrukt in Mol

saccharose, van de met IAZ behandelde bladhelften zijn in de tweede kolom en die van de met water behandelde in de derde kolom van tabel 5 geplaatst. Het verschil tussen een met water en een met IAZ behandelde bladhelft is in kolom 4 weergegeven. Onderaan de tabel staat het gemiddelde verschil.

Uit de tabel blijkt nu, dat de osmotische waarde van het perssap van bladeren, behandeld met IAZ, kleiner is dan die van perssap van bladeren behandeld met water. Het verschil is zeer significant ($5 \times$ de middelbare fout).

Om de invloed na te gaan van andere groeistoffen werd de osmotische waarde bepaald aan bladeren, die behandeld waren met NAZ en 2,4-D. De resultaten van deze proeven en die met IAZ zijn in tabel 6 samengevat. De tabel bevat het gemiddelde verschil tussen de osmotische waarden van de controle en van de met plantegroeistof behandelde bladhelften. In alle 5 proeven met IAZ verlaagt het de osmotische waarde van het perssap. Ook de andere groeistoffen, NAZ en 2,4-D, vertonen deze verlagende werking.

b. De osmotische druk van perssap uit bladeren welke niet met IAZ of met water waren behandeld

In de inleiding van deze paragraaf werd de hypothese van PANZER over het verband tussen lichtsterkte, gevoeligheid voor virusinfectie en de osmotische druk vermeld. PANZER zegt hierover: 'Osmotic pressure could be the explanation for the observations of BAWDEN & ROBERTS who found a smaller number of lesions on test plants kept in the sun prior to inoculation as opposed to the number on those kept in the shade. They postulated that photosynthetic products of the assay hosts were in some way inhibitory to lesion formation; this could be due to the osmotic effects of this 'photosynthetic product'. In a like manner, the effect of time of day of inoculation reported by MATTHEWS and YARWOOD could be explained on the basis of osmotic pressure, as could the small number of lesions on inoculated detached bean leaves floated on 10 per cent sucrose that was reported by YARWOOD'.

Het is duidelijk dat de verklaring van PANZER niet geldt voor het effect van IAZ op de vatbaarheid van de bladeren voor TMV. Immers uit de in dit hoofdstuk vermelde resultaten blijkt, dat IAZ de osmotische druk van het perssap verlaagt, terwijl ook de vatbaarheid voor de virusinfectie door de groeistof verlaagd wordt, want er ontstaan minder vlekjes. De hypothese van PANZER vereist, dat een verlaagde osmotische druk juist met een grotere vatbaarheid samengaat.

Een verschil tussen mijn proeven en die van PANZER is, dat de bladeren voor het uitpersen gedurende 1 nacht op vloeistof gedreven hadden, terwijl PANZER het perssap direct na het plukken won. Het leek gewenst, te onderzoeken of het verschil tussen PANZERS resultaten en de mijne het gevolg was van deze voorbehandeling op vloeistof.

Hiertoe werden bladeren van planten, die gedurende een week in licht van 6400 Lux of in licht van 183 Lux hadden gestaan, direct na het afplukken bevroren en uitgeperst.

Tabel 7 geeft de osmotische druk van het perssap. In verreweg de meeste proeven bleek deze bij perssap van bladeren uit sterk licht hoger. Dit bevestigt dus de uitkomsten van de proeven van PANZER.

In de proeven van tabel 7 waren de bladeren direct na het plukken uitgeperst. Om de invloed van IAZ te kunnen onderzoeken, moeten bladeren echter enige tijd op een oplossing hiervan drijven en de controles op water. Het is dus deze voorbehandeling, die een invloed moet hebben op de osmotische druk van het perssap. Tabel 8 toont aan, dat dit inderdaad zo is: door het drijven op water verdwijnt het verschil in osmotische druk tussen uit sterk licht en uit zwak licht afkomstige bladeren. Zelfs heeft in deze proef het perssap van de bladeren uit sterk licht in twee gevallen een lagere osmotische druk.

Het verschil tussen de resultaten van PANZER en de mijne is dus waarschijnlijk het gevolg van het feit, dat PANZER de osmotische druk van de bladeren direct bepaalde, terwijl in mijn proeven de bladeren eerst op vloeistof dreven.

3.4 DE OORZAAK VAN DE VERLAGING VAN DE OSMOTISCHE DRUK DOOR IAZ

Uit de resultaten van 3.3 blijkt, dat bladhelften, die op een oplossing van IAZ gedreven hebben, perssap met een lagere osmotische druk geven dan de corresponderende bladhelften, die op water hebben gedreven. Men kan zich afvragen, hoe dit verschil tot stand komt. Een of meer van de volgende processen kunnen als oorzaak in aanmerking komen:

1. verhoogde waterabsorptie door de bladcellen;
2. exosmose van de opgeloste stoffen;
3. katatonose, d.w.z. het omzetten van osmotisch actieve moleculen in osmotisch minder werkzame;
4. verdwijnen van organische moleculen door ademhaling of gisting.

Een invloed van IAZ op de waterabsorptie werd reeds gevonden door REINDERS (1938, 1942). Zij constateerde, dat schijfjes uit aardappelknollen, aardpeer of andere reserveorganen uit IAZ-oplossingen meer water opnamen, dan uit water alleen. VAN OVERBEEK (1944) bevestigde dit effect van IAZ op de hoeveelheid water die aardappelweefsel opneemt. Hij vond tevens, dat de osmotische druk van het perssap uit weefsels die met IAZ waren behandeld, lager was dan van overeenkomstige controles. KETELAPPER (1953) vond eveneens een verlaging van de osmotische waarde onder invloed van IAZ bij cellen van het *Avena*-coleoptiel. Deze daling hield verband met de volumevergroting tijdens de groei.

3.4.1 De invloed van IAZ op de waterabsorptie van de bladeren

Om na te gaan, wat voor invloed IAZ op de waterabsorptie van de bladcellen van

N. glutinosa heeft, werd de methode gebruikt, die REINDERS bij aardappelschijfjes toepaste, namelijk door bepaling van het vergewicht. Bladeren van *N. glutinosa*-planten, die in sterk of in zwak licht hadden gestaan, werden hiertoe in twee helften verdeeld. Dan werden deze bladhalften gewogen. Het wegen geschiedde in een gesloten weegflesje, waarin op de bodem een vochtig filtreerpapier werd gelegd, opdat het blad gedurende het wegen geen water zou verliezen door verdamping. Het blad zelf lag op een horlogeglasje, opdat het niet in aanraking zou komen met het vochtige filtreerpapier. Na het wegen werden de bladhalften met hun onderkant gedurende 1 nacht op respectievelijk 0,01 % IAZ en gedistilleerd water gelegd. De volgende dag werd het oppervlak der blaadjes met filtreerpapier goed gedroogd en vervolgens werd het vergewicht van de bladeren opnieuw bepaald.

Het bleek nu, dat het laten drijven van de bladeren op IAZ en op gedistilleerd water in alle proeven een verhoging van het vergewicht veroorzaakte. Dat wil dus zeggen, dat tijdens beide behandelingen een waterabsorptie heeft plaats gehad. Daar de helften van een blad voor de behandeling geen gelijk gewicht bleken te hebben, werd de waterabsorptie uitgedrukt in het quotiënt van de gewichtsvermeerdering en het oorspronkelijke gewicht van de bladheft. In het geheel zijn 5 proeven gedaan, elk met 15 bladeren van planten uit zwak licht en met 15 bladeren van planten uit sterk licht. De resultaten van deze proeven werden in grafiek gebracht (fig. 6). De waterabsorptie van bladeren van *N. glutinosa* uit sterk licht is met ● en die van bladeren uit zwak licht met ○ aangegeven. De ordinaat van ieder punt in figuur 6 geeft het per gram vergewicht opgenomen water van de bladheft die op IAZ-oplossing heeft gedreven, de abscis de overeenkomstige waarde van de helft, die op water heeft gedreven. Indien beide helften evenveel water geabsorbeerd hebben ligt het punt op de lijn, die onder een hoek van 45° met beide coördinaten door de oorsprong gaat.

Van de planten uit sterk licht geven 62 stuks een punt dat boven deze lijn ligt en 13 een punt eronder. Bij deze bladeren bevorderde IAZ dus de waterabsorptie. Van de bladeren uit zwak licht geven 32 een punt boven de lijn en 42 eronder. Bij deze bladeren werd door IAZ de waterabsorptie dus niet vergroot.

3.4.2 Het effect van IAZ op het geleidingsvermogen van het perssap

a. Inleiding

In 3.4.1 werd getracht voor de reducerende invloed van IAZ op de osmotische druk van het perssap een verklaring te vinden in de waterabsorptie van het blad. Deze werd echter niet gevonden. Wel verhoogde IAZ bij bladeren van planten uit sterk licht de hoeveelheid opgenomen water aanzienlijk, doch bij bladeren uit zwak licht had het nauwelijks invloed. Toch werd ook bij deze bladeren de osmotische druk van het perssap door een behandeling met IAZ verlaagd. Deze verlaging kan dus niet aan een verhoogde waterabsorptie worden toegeschreven.

Het antwoord op de vraag, waar de werking van IAZ dan wel op zou berusten, werd nu gezocht in de tweede mogelijkheid, genoemd onder 3.4 nl. exosmose van opgeloste stoffen. In het volgende worden proeven beschreven, waarin dit werd onderzocht.

b. Materiaal en methode

Evenals in de vorige proeven werden bladeren gebruikt, die afkomstig waren van *N. glutinosa*-planten, afkomstig uit sterke, respectievelijk zwakke lichtintensiteit. De bladeren werden in twee helften verdeeld. Een helft dreef gedurende 1 nacht op een 0,01 % IAZ-oplossing en de andere als controle op water. De volgende dag werden de bladhalften goed met behulp van filtreerpapier gedroogd en bij -20°C of in vast koolzuur bevroren.

Na de bladeren eerst ontdooid te hebben, werd met een perstang sap uit het blad verkregen. Het geleidingsvermogen van het perssap werd dan bepaald met een geleidbaarheidsmeter van het merk Radiometer, Copenhagen, type C D M 2 d.

In 1958 werd bij deze proeven steeds 100 μl van het perssap in een micropipet opgezogen. In een maatcilinder van 5 ml met een geslepen stop werd deze 100 μl met gedistilleerd water tot een volume van 3,5 ml aangevuld. Na goed schudden werd deze hoeveelheid vloeistof gegoten in een dompelcel van het type Radiometer C D C 104, waarvan de gaten aan de zijkanten waren dichtgestopt. Dan werd het geleidingsvermogen van het perssap bepaald en weergegeven in micromho/cm bij 20°C .

In 1960 werden de metingen verricht met een micro-dompelcel van het type Radiometer C D C 114. Bij het gebruik hiervan werd 0,2 ml perssap genomen dat met gedistilleerd water tot 1 : 10 werd verdund. Hier werd het geleidingsvermogen eveneens in micromho/cm bij 20°C uitgedrukt.

c. Resultaten

De resultaten van deze proeven zijn in tabel 9 verwerkt. In enige proeven (proef 73 B, 77 B, 79 B en 81 B) dreven de bladhalften op 5 ml en in de overige proeven op 15 ml vloeistof. Het effect van IAZ op het geleidingsvermogen van het perssap is weergegeven als het gemiddelde verschil tussen de water- en de IAZ-behandeling, uitgedrukt in micromho/cm bij 20°C . De betrouwbaarheid van deze effecten werd nagegaan volgens de tekentoets.

Bij de bladeren uit zwak licht heeft IAZ in 6 van de 11 proeven het geleidingsvermogen van het perssap verlaagd ten opzichte van de controles; bij de bladeren uit sterk licht in 6 van de 10 proeven. Het volume van de vloeistof waarop de bladeren dreven heeft blijkbaar invloed op het effect van IAZ. Dit blijkt als we op de betrouwbaarheid van de afzonderlijke proeven letten. Van de 14 resultaten, verkregen met bladeren die op 15 ml hadden gedreven, waren volgens de gebruikte toets 11 betrouwbaar. Van de 7 resultaten verkregen met bladeren, die op 5 ml hadden gedreven was slechts 1 betrouwbaar.

3.4.3 Het geleidingsvermogen van de vloeistof waarop de bladeren hebben gedreven

Indien de verlaging van het geleidingsvermogen van het perssap onder invloed van IAZ, die in de voorgaande proeven bij bladeren van planten uit zwak licht werd gevonden, door exosmose tot stand is gekomen, moet het geleidingsvermogen van de vloeistof waarop de bladeren dreven, zijn gestegen. Dit werd onderzocht door overeenkomstige bladhelften gedurende 1 nacht te laten drijven op water en op 0,01% IAZ-oplossing en daarna het geleidingsvermogen van de vloeistoffen te meten. Teneinde de eventueel uit de bladeren diffunderende stoffen niet te veel te verdunnen werden in deze proef de bladeren op 5 ml vloeistof in plaats van op 15 ml gelegd. De volgende dag werd het volume zo nodig weer tot 5 ml aangevuld voordat het geleidingsvermogen werd bepaald. Een extra foutenbron in deze proeven was, dat de IAZ-oplossing uit zichzelf al een hoger geleidingsvermogen heeft (circa 25–34 micromho) dan het water waarop de controle helften dreven (circa 3 micromho) en dat niet bekend was hoeveel het geleidingsvermogen van de IAZ-oplossing door opneming van auxine in de bladeren achteruitging. Om hiervan een indruk te krijgen werd aan 20 bladeren uit sterk licht en 20 bladeren uit zwak licht volgens de methode van TANG & BONNER (1947) colorimetrisch bepaald hoeveel IAZ onder de omstandigheden van de proef was opgenomen. Bladeren uit sterk licht namen ongeveer 11,5% van het IAZ uit de oplossing op, bladeren uit zwak licht ongeveer 19,0%. Het meeste IAZ bleef dus in de oplossing achter. Bij de eigenlijke proeven werd het geleidingsvermogen dat werd gevonden, verminderd met het geleidingsvermogen van het IAZ, dat de 20 bladeren gemiddeld in de oplossing hadden overgelaten.

De resultaten, vermeld in tabel 10, komen overeen met die van tabel 9: bij bladeren uit zwak licht bevordert IAZ de exosmose van electrolyten; bij bladeren uit sterk licht laten de resultaten deze conclusie niet toe.

3.4.4 De invloed van het volume van de oplossingen waarop de bladeren dreven, op het aantal necrotische vlekjes

Tabel 9 gaf de indruk, dat het effect van IAZ op het geleidingsvermogen van het perssap in meer gevallen betrouwbaar is bij 15 ml drijfvloeistof dan bij 5 ml. Als de verandering van het geleidingsvermogen in verband staat met de vorming van virus-vlekjes zou ook op het aantal hiervan het volume van de drijfvloeistof invloed moeten hebben. Tabel 11 geeft het resultaat van 16 proeven waarbij dit werd nagegaan. In 14 hiervan was de verlaging van het aantal vlekken onder invloed van IAZ groter bij bladeren die met 15 ml vloeistof waren voorbehandeld dan bij bladeren die met 5 ml waren voorbehandeld. Volgens de tekentoets is de betrouwbaarheid van dit verschil 5%. Men kan nog opperen, dat niet de verschillen in volume, doch het feit, dat 15 ml vloeistof meer IAZ bevat dan 5 ml de oorzaak van de grotere invloed van het grootste

vloeistofvolume is. Uit de vorige paragraaf bleek echter, dat het IAZ maar zeer ten dele uit de oplossing verdween, zodat deze veronderstelling niet zeer waarschijnlijk lijkt.

3.5 DISCUSSIE

Het onderzoek van de osmotische druk van het perssap bevestigde de resultaten van PANZER, dat perssap van de uit sterk licht afkomstige bladeren een hogere osmotische druk heeft dan van de bladeren uit zwak licht. Dit verschil bleek te verdwijnen wanneer de bladeren enige tijd op water gedreven hadden (tabel 8). Toch vertonen in dat geval de aan sterk licht blootgestelde bladeren, na inoculatie met TMV nog een lager aantal necrotische vlekjes. PANZER's conclusie, dat er een correlatie bestaat tussen de osmotische waarde van de cellen en de vatbaarheid voor TMV is dus in zijn algemeenheid niet juist.

Dit maakt het tevens onwaarschijnlijk, dat de verandering van de osmotische druk tengevolge van een behandeling met IAZ de directe oorzaak is van de vermindering van het aantal necrotische vlekken.

In 3.4.1 bleek reeds, dat een verhoging van de waterabsorptie evenmin de directe oorzaak kan zijn van de IAZ-invloed. In mijn proeven werd niet nagegaan of misschien katatonose of het verdwijnen van ademhalingssubstraat een rol speelt bij de verandering van de osmotische druk van het celvocht. Wel is gebleken dat, althans bij de bladeren uit zwak licht, de exosmose van electrolyten onder invloed van IAZ verhoogd wordt (tabel 9 en 10). Deze exosmose behoeft geen verband te houden met het lager aantal virusvlekjes. Doch het feit, dat een groter volume drijfvloeistof zowel de invloed van IAZ op het geleidingsvermogen van het perssap, als de invloed van IAZ op het aantal virusvlekjes duidelijker doet uitkomen vormt wel een aanwijzing, dat tussen het electrolytgehalte van het blad en het aantal TMV-vlekken een verband bestaat. Hierbij behoeft niet het totale gehalte aan electrolyten van belang te zijn. Het is zeer wel denkbaar, dat door IAZ de exosmose van bepaalde electrolyten wordt bevorderd, die een specifieke werking, hetzij remmend hetzij bevorderend, op de vorming van de necrotische vlekken hebben.

4 DE SPECIFIEKE INVLOED VAN ENIGE ANORGANISCHE IONEN

4.1 DE INVLOED VAN EEN MENGSEL VAN ANORGANISCHE IONEN

4.1.1 Inleiding en methodiek

Tegelijk met de in het vorige hoofdstuk beschreven proeven werd ook nog op een andere wijze onderzocht of de vatbaarheid voor infectie met TMV samenhangt met de concentratie van het perssap, namelijk door te trachten deze concentratie te verhogen. Hiertoe werden helften van bladeren gedurende 1 nacht voor de inoculatie met TMV op een zoutoplossing gelegd, de controlehelften dreven op gedistilleerd water. In een aantal proeven werd tevens het effect van de toevoeging van 0,01 % IAZ aan de zoutoplossing, respectievelijk het gedistilleerde water onderzocht. De zoutoplossing bevatte 0,033 Mol $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,06 Mol KNO_3 en 0,02 Mol MgSO_4 ; kryoscopisch bepaald is de osmotische druk ervan equivalent met een oplossing van 0,184 Mol saccharose. Bepaling van de osmotische druk van het perssap uit de bladhelften geschiedde op de in 3.3.2 beschreven wijze.

De directe invloed van een zoutoplossing op het virus werd onderzocht door niet voorbehandelde bladeren te inoculeren met een mengsel van virus en zoutoplossing, in gelijke delen. Omdat in deze tijd de schimmel *Peronospora tabacina* Adam de *N. glutinosa*-planten vernietigd had, werden deze laatste proeven ten dele ook gedaan met TMV op *Phaseolus vulgaris* var. 'Pinto', die uit de Verenigde Staten van Amerika werd verkregen.

4.1.2 Resultaten

a. De invloed van de zoutoplossing op de osmotische druk van het perssap

Uit tabel 12 blijkt dat als bladhelften op een zoutoplossing dreven, de osmotische druk van het perssap steeg. De zoutoplossing evenals de controle-oplossing bevatte bij deze proeven 0,01 % IAZ. De hogere osmotische druk van het perssap van bladeren die op de zoutoplossing hadden gedreven, kan het gevolg zijn van het onttrekken van water aan de bladcellen. Uit de literatuur zijn echter gevallen bekend waarin de osmotische waarde van cellen die in een oplossing met een hoge osmotische druk waren gelegd, ging stijgen, hetzij door het opnemen van ionen uit de buitenoplossing, hetzij door anatonose (BURSTRÖM, 1953; THIMANN, LOOS & SAMUEL, 1960).

b. De invloed van een oplossing van zouten op het aantal virusvlekjes

Nagegaan werd de invloed van een behandeling van *N. glutinosa*-bladeren met een zoutoplossing op het aantal necrotische vlekjes van TMV. Bij een deel van de objecten werd 0,01 % IAZ aan de zoutoplossing toegevoegd. Ook waren als objecten gedistilleerd water en 0,01 % IAZ in gedistilleerd water in de proef opgenomen. Op bladhelftenparen werden nu de behandelingen in bepaalde combinaties uitgevoerd. Bijvoorbeeld werd de linkerbladhelft gelegd op een IAZ-zoutoplossing en de rechterbladhelft op gedistilleerd water. Zo zijn er vier series proeven ingezet volgens het volgende schema:

<i>Combinatie</i>	<i>Linkerbladhelft</i>	<i>Rechterbladhelft</i>
I	IAZ-zoutoplossing	Zoutoplossing
II	Zoutoplossing	Water
III	IAZ-zoutoplossing	IAZ-oplossing
IV	IAZ-zoutoplossing	Water

Na deze behandelingen werden de bladhelften met TMV geïnoculeerd. In tabel 13 zijn de resultaten van deze proeven verwerkt. Deze resultaten kunnen als volgt worden samengevat. Drijven op een zoutoplossing voor inoculatie met TMV verhoogt het aantal necrotische vlekjes (Combinatie II). Dit effect wordt niet gewijzigd, indien zowel de zoutoplossing als de vloeistof, waarop de controlehelften drijven, IAZ bevatten (Combinatie III). Omgekeerd blijft de verlagende invloed van IAZ, die in de vorige hoofdstukken werd beschreven, bestaan bij aanwezigheid van het zoutmengsel (Combinatie I). Indien echter de invloed van de combinatie IAZ-zoutmengsel vergeleken wordt met de invloed van water dan blijkt de verhoging van het aantal virusvlekjes door het zout te overheersen over de verlaging door het IAZ (Combinatie IV).

c. Discussie

De in dit hoofdstuk beschreven proeven werden begonnen naar aanleiding van de hypothese, dat IAZ de vorming van de virusvlekjes beïnvloedt via een verlaging van de osmotische druk van het perssap. Verwacht werd, dat indien de bladeren op een zoutoplossing werden gelegd, de osmotische druk van de cellen zou stijgen en de vatbaarheid voor het virus zou toenemen. Beide verwachtingen kwamen uit.

Het is echter uiterst twijfelachtig, of we hierin een bewijs mogen zien voor de gestelde hypothese. In het vorige hoofdstuk werd aangetoond, dat tussen de vatbaarheid van de bladeren voor TMV en de osmotische druk van het perssap geen algemeen verband bestaat. Ook uit de proeven van dit hoofdstuk blijkt dit. We zien namelijk, dat wanneer de osmotische druk door de zoutoplossing wordt verhoogd, het aantal virusvlekjes groter is, terwijl PANZER aantoonde, dat de hogere osmotische druk van het perssap van in sterk licht gekweekte planten gepaard gaat met een kleiner aantal vlekjes.

De invloed van een zoutoplossing is veel sterker dan die van IAZ. Merkwaardig is, dat deze verbinding ook bij aanwezigheid van het zoutmengsel haar werking blijft uitoefenen, ook al is zij niet in staat de door zouten veroorzaakte verhoging van de vatbaarheid geheel te compenseren. Dit maakt het zeer onwaarschijnlijk, dat de in het vorige hoofdstuk beschreven verhoogde exosmose van ionen onder invloed van IAZ iets te maken heeft met de verlaging van het aantal virusvlekjes door die verbinding. In de hier toegediende zoutoplossing zullen de bladeren niet licht calcium, kalium of magnesium door exosmose verliezen. Wel is het denkbaar, dat het blad een ander ion met een specifieke werking op de vlekvorming verliest onder invloed van de voorbehandeling met IAZ. Voor het bestaan van zo'n ion met specifieke werking hebben wij echter nog geen aanwijzing; de veronderstelling heeft daarom thans weinig zin.

4.2 DE INVLOED VAN DRIE KATIONEN AFZONDERLIJK

4.2.1 Inleiding en methode

De vermindering van het aantal virusvlekjes, door IAZ teweeggebracht, wordt dus gecompenseerd door een mengsel van calciumnitraat, kaliumnitraat en magnesiumsulfaat. Een behandeling met een oplossing van deze drie zouten voor de inoculatie met TMV had zelfs een hoger aantal vlekjes tengevolge. Men kan zich nu afvragen of het gevonden effect het gevolg is van een van de ionen in het zoutmengsel.

Om dit na te gaan, werden *N. glutinosa*-planten gedurende ongeveer een week in de lichtkast onder sterk of zwak licht geplaatst. Daarna werden de bladeren afgeplukt en overlans in twee helften gedeeld. Een bladhelft werd vervolgens op een zoutoplossing en de andere als controle op water gelegd. Voor de proeven, waarin de invloed van Ca^{++} werd nagegaan, werd dit toegediend in de vorm van CaCl_2 en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ in verschillende concentraties. Voor K^+ werd KCl en KNO_3 gebruikt en voor Mg^{++} , MgSO_4 en MgCl_2 . Na 1 nacht op deze oplossingen te hebben gelegen, werden de bladhelften met TMV geïnoculeerd en in petrischalen op vochtig filtreerpapier onder fluorescentielicht geplaatst voor de vorming van necrotische vlekjes.

Naast de bovenbeschreven proeven werd ook nagegaan, hoe de directe invloed van de verbindingen is op de activiteit van TMV. Hiertoe werd het virus met de verbindingen gemengd en het mengsel werd dan geïnoculeerd op bladeren van *N. glutinosa* of *Phaseolus vulgaris* var. 'Pinto'.

4.2.2 Resultaten

a. Effect van een behandeling met calcium voor de inoculatie

De resultaten van de proeven met $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ zijn vermeld in tabel 14, die van de proeven met CaCl_2 in tabel 15. Het effect van de behandeling is uitgedrukt als het

verschil van de logaritme van het aantal vlekjes op de bladhelte, die voor inoculatie met virus op een Ca-oplossing heeft gedreven, en de logaritme van het aantal virusvlekjes op de corresponderende helte, die voor inoculatie met het virus op water heeft gedreven. De betrouwbaarheid van het resultaat werd berekend zoals werd beschreven in 2.1.

Behandeling met calciumnitraat had meestal een hoger aantal virusvlekjes tot gevolg, behalve in de proeven 155 B, 158 B en 159 B. Behandeling met calciumchloride verhoogde eveneens meestal het aantal vlekjes behalve in de proeven 163 A en 164. De verhoging van het aantal vlekjes ten opzichte van de controle kon zeer aanzienlijk zijn: tot meer dan 500% (proef 124 B). In de proeven, waarin geen verhoogd aantal vlekjes optrad, of waarin de verhoging niet significant bleek, was het calcium in lagere concentraties gegeven. Het is echter niet zeker, dat hieraan het geringe effect kan worden toegeschreven. Deze proeven werden namelijk alle uitgevoerd in dezelfde tijd: maart en april 1959. Men moet bij deze proeven altijd op een invloed van het seizoen bedacht zijn; een dergelijke invloed zou hier een rol gespeeld kunnen hebben.

b. Effect van een behandeling met kalium en magnesium voor de inoculatie

De invloed van een behandeling met kalium-ionen is weergegeven in tabel 16 en van een behandeling met magnesium-ionen in tabel 17. Beide ionen blijken een verlaging van het aantal virusvlekjes tot gevolg te hebben.

c. Effect van het toevoegen van calcium, kalium of magnesium aan het virus

De hiervoor beschreven invloeden van de drie ionen waren het gevolg van een behandeling van de bladeren voor de inoculatie met TMV. Evenals dit bij de groeistoffen het geval is, kan men zich afvragen of de ionen de plant beïnvloeden, of het virus, of beide. Om hiervan een indruk te verkrijgen, werden bladhelten van *N. glutinosa* geïnoculeerd met virus, dat met een van de drie ionen gemengd was. Als controle dienden de corresponderende bladhelten, welke alleen met de virusoplossing geïnoculeerd waren. Voor deze proeven werden behalve *N. glutinosa*-bladeren ook bladeren van *Phaseolus vulgaris* var. 'Pinto' gebruikt, omdat de *N. glutinosa*-planten in die tijd door *Peronospora tabacina* Adam waren aangetast.

De resultaten zijn weergegeven in tabel 18. Kalium en magnesium hadden, met het virus gemengd, geen invloed; evenmin was er sprake van een invloed tegengesteld aan het effect van een voorbehandeling met deze ionen. Calcium had daarentegen in zes van de tien proeven een effect, dat kwalitatief gelijk was aan dat van een voorbehandeling met dit ion, namelijk een verhoging van het aantal virusvlekjes.

Uit deze resultaten kunnen we afleiden, dat in de plant het aangrijpingspunt van kalium en magnesium verschilt van het aangrijpingspunt van calcium, aannemende dat al deze ionen een bepaald effect op de plant uitoefenen. Voor het calcium kan echter ook gelden, dat het op het virus zelf inwerkt, hetzij bij toevoeging aan het

inoculum, hetzij – wanneer het voor de inoculatie is toegediend – in de plant. Hierbij dient te worden opgemerkt, dat CHESIN & SCOTT (1955) vonden dat op de bladeren van *N. glutinosa*-planten die aan Ca^{++} -deficientie leden, minder necrotische vlekjes ontstonden na inoculatie met TMV dan op planten, die een normale Ca^{++} -gift hadden ontvangen. Deze schrijvers vermoedden op grond van het feit, dat zij deze verschillen constateerden zowel met als zonder toevoeging van een schuurmiddel aan het inoculum, dat 'calcium deficiency affects intrinsic cell susceptibility to infection rather than mechanical resistance to virus entry'. Ook YARWOOD (1954b) constateerde, dat enkele Ca^{++} -verbindingen, naast een aantal andere anorganische zouten, de vorming van lokale vlekjes op bonebladeren na inoculatie met TMV stimuleerden. In dit geval werden de bladeren na de inoculatie op de betrokken oplossingen te drijven gelegd dan wel in deze oplossingen gedoopt.

4.3 DE INVLOED VAN FOSFAAT-IONEN

4.3.1 Inleiding en methode

Bij de in het voorgaande beschreven proeven over de invloed van IAZ werd deze verbinding opgelost in gedistilleerd water. De pH van zulke oplossingen verandert gedurende de proef. Dit zou invloed op het resultaat kunnen hebben en daarom werden enige proeven gedaan waarbij de pH constant werd gehouden door toevoeging van een fosfaatbuffer. Hierbij bleek, dat de buffer een sterke invloed had op het aantal vlekjes, dat na inoculatie met TMV werd gevormd.

Vergeleken werd het effect van de fosfaatbuffer volgens SÖRENSEN met de citroenzuur-fosfaatbuffer volgens McILVAINE. Deze buffers hebben de volgende samenstelling:

SÖRENSEN: mengsels van 0,067 Mol Na_2HPO_4 en 0,067 Mol KH_2PO_4 .

McILVAINE: mengsels van 0,1 Mol citroenzuur en 0,2 Mol Na_2HPO_4 .

Ook in deze proeven werden de bladhelften van *N. glutinosa* voor de inoculatie op fosfaathoudende oplossingen te drijven gelegd.

Voorts werd het effect onderzocht van drijven op SÖRENSEN-buffer in vergelijking met drijven op water. Ook werden combinaties van buffers volgens SÖRENSEN respectievelijk volgens McILVAINE en IAZ onderzocht. Tenslotte werd de osmotische druk van het perssap van *N. glutinosa*-bladeren, die gedurende 1 nacht op SÖRENSEN-buffer hadden gedreven, bepaald.

4.3.2 Resultaten

Uit tabel 19 blijkt, dat het effect van een behandeling met fosfaatbuffer van verschil-

lende zuurgraad volgens SÖRENSEN en met de citroenzuur-fosfaatbuffer volgens McILVAINE van overeenkomstige zuurgraad meestal gelijk is.

Tabel 20 toont de invloed van fosfaatbuffer in vergelijking met water als controle. In alle proeven op een na verlaagde de fosfaatbuffer het aantal virusvlekken bij bladeren uit zwak licht. Bij bladeren uit sterk licht is het verschil echter slechts in twee gevallen significant.

Bij bladeren uit zwak licht is de verlagende invloed in 3 proeven zeer significant, in 2 proeven significant en in 1 proef niet betrouwbaar. Daar ook een voorbehandeling met IAZ vaak meer significante resultaten geeft bij in zwak licht gekweekte bladeren, werd nu de invloed van deze verbinding met die van fosfaat vergeleken. Uit tabel 21 blijkt, dat een behandeling met buffer en IAZ niet minder vlekjes geeft dan een behandeling met SÖRENSEN-buffer alleen. Daarentegen blijkt uit tabel 22, dat na een behandeling met IAZ en SÖRENSEN-buffer inoculatie met TMV veel minder necrotische vlekken veroorzaakt dan na een behandeling met IAZ alleen. Tabel 23 laat zien, dat bij gebruik van McILVAINE-buffer dezelfde resultaten worden verkregen als met SÖRENSEN-buffer: een voorbehandeling met fosfaat + IAZ verlaagt het effect van de inoculatie met virus veel sterker dan behandeling met IAZ alleen, doch heeft dezelfde invloed als behandeling met een fosfaatoplossing.

4.3.3 Discussie

Het feit dat bij aanwezigheid van fosfaat-ionen IAZ op de vorming van vlekken geen invloed heeft, zou veroorzaakt kunnen worden doordat de pH van de bufferoplossingen (5–6,5) niet gunstig is voor een optimale groeistofwerking. Fosfaat zou dan een veel sterkere invloed op het ontstaan van de virusvlekken uitoefenen dan IAZ. Een andere mogelijkheid is, dat fosfaat invloed heeft op de vorming van auxine in de plant en hierdoor de invloed van de uitwendig toegediende auxine maskeert. Door toedienen van fosfaat wordt het auxinegehalte van worteltoppen aanzienlijk verhoogd (VAN RAALTE, 1937) en het is niet uitgesloten, dat dit verschijnsel ook in de hier beschreven proeven een rol speelt.

5 NABESPREKING

Het resultaat van de inoculatie met TMV werd in de voorgaande proeven bepaald aan het aantal vlekken op de bladeren van *N. glutinosa*. Er zijn geen proeven gedaan om na te gaan of een groot aantal vlekjes samengaat met een hoog virusgehalte in het blad. In een publikatie van KRYLOV, SMIRNOVA & TARAKANOVA (1960) werd de invloed van auxinen op de virusvorming van TMV in 'Mamont'-tabak onderzocht. Hierbij werd het virusgehalte van de bladeren bepaald door monsters van de bladeren fijn te malen, elektronenfoto's van de suspensie te maken en hierin het aantal virusdeeltjes te tellen. In deze proeven bleek IAZ in niet te jonge bladeren de virusvorming te remmen. Daar in de in dit proefschrift beschreven proeven IAZ het aantal virusvlekken verminderde, lijkt de veronderstelling gewettigd, dat ook hier IAZ een verminderde virusvorming heeft veroorzaakt.

De voornaamste door mij verkregen resultaten zijn: IAZ (en ook NAZ) verlaagt het aantal virusvlekken van TMV op *N. glutinosa*. Hierbij werkt het IAZ door middel van een invloed op het blad (Hoofdstuk 2). Onder invloed van IAZ heeft een afgifte van elektrolyt uit de bladcellen plaats aan de vloeistof, waarop de bladeren voor de inoculatie drijven (Hoofdstuk 3). Calcium-ionen doen het aantal virusvlekken toenemen, kalium en magnesium verlagen het (Hoofdstuk 4).

In alle proeven is steeds onderzocht de reactie van uit sterk licht zowel als die van uit zwak licht afkomstige bladeren. De aanleiding hiertoe was, dat het effect van IAZ veel duidelijker bleek bij bladeren van planten uit zwak licht dan bij bladeren van planten uit sterk licht. Dit berust waarschijnlijk niet op een essentieel verschil in de wijze waarop IAZ op beide soorten bladeren inwerkt. Vergelijking van de figuren 1 en 2 laat zien dat gemiddeld het effect van gelijke concentraties IAZ op bladeren uit sterk licht en op bladeren uit zwak licht even groot is. Het aantal afzonderlijke proeven, waarbij dit effect significant is, is bij bladeren uit zwak licht echter aanmerkelijk groter, vermoedelijk als gevolg van het feit dat het absolute aantal vlekken op bladeren uit sterk licht kleiner is.

Er zijn dus drie soorten invloeden gevonden, nl.:

1. de invloed van IAZ op de vorming van de virusvlekken,
2. de invloed van IAZ op de ionen in de bladcellen,
3. de invloed van ionen op de vorming van virusvlekken.

De vraag is nu of er verband is tussen deze invloeden en, zo ja, van welke aard dat verband is.

Een eenvoudige veronderstelling over de samenhang van de gevonden verschijnselen is, dat IAZ een specifieke afgifte van calcium door het blad veroorzaakt. Daar calcium-

ionen het aantal virusvlekken doen toenemen, moet een verlies van Ca-ionen het aantal vlekken doen dalen.

Deze veronderstelling is echter bij nadere overweging niet waarschijnlijk. Uit tabel 12 blijkt namelijk, dat de verlagende invloed van IAZ blijft bestaan in een oplossing van calcium-, kalium- en magnesium-ionen, die op zichzelf een verhoging van het aantal vlekken veroorzaakt (Combinatie I). Derhalve is het waarschijnlijk, dat IAZ enerzijds en de ionen anderzijds onafhankelijk van elkaar het proces van de vorming van virusvlekken beïnvloeden.

De invloed van IAZ en van bepaalde kationen op de viruswerking heeft een treffende parallel in hun invloed op de celstrekking. THIMANN & SCHNEIDER (1938) vonden reeds, dat de groei van cylindertjes uit *Avena*-coleoptielen in 1 mg IAZ per liter werd geremd door calciumchloride in concentraties van 0,01 molair en hoger. Daarentegen bevorderde kaliumchloride de groei, terwijl de werking van natrium-, rubidium- en lithiumchloride van hun concentraties afhing. Lage concentraties van deze ionen bevorderden de groei, hoge (0,1 molair) remden. Tussen calcium en kalium was dus een duidelijk antagonisme. BURSTRÖM (1954) vond bij wortels een invloed van calcium op de groei. In de proeven van COOIL & BONNER (1957) verminderde calcium de auxinewerking zowel in de eerste als in de tweede fase van het celstrekkingproces.

De invloed van auxine op de celstrekking komt tot stand doordat de celwand plastischer gemaakt wordt door veranderingen in de stofwisseling van de cellen. Het parallellisme tussen de inwerking van auxine, kalium en calcium op de vorming van virusvlekken en op de celstrekking noopt er toe te overwegen of de auxine-involed op de viruswerking het rechtstreekse gevolg is van veranderingen in de celwand. Het lijkt begrijpelijk, dat de eigenschappen van de celwand invloed hebben op het slagen van een inoculatie met TMV, waarbij immers met carborundumpoeder in de celwand microscopisch fijne krasjes worden aangebracht, teneinde het binnendringen van het virus mogelijk te maken. Men zou echter verwachten, dat deze krasjes in een door auxine verzwakte celwand gemakkelijker kunnen worden gemaakt, zodat de auxine hierdoor de viruswerking zou bevorderen. In werkelijkheid vermindert auxine het aantal virusvlekken. Het effect van auxine op het aantal virusvlekjes komt dus waarschijnlijk niet tot stand door een werking van auxine op de celwand.

Samenvattend kunnen we zeggen dat het in het voorgaande beschreven onderzoek ons geen aanleiding geeft om een van de reeds bekende effecten van auxine verantwoordelijk te stellen voor de remming van de vorming van virusvlekken. Een van de voornaamste problemen van het auxine-onderzoek is de vraag, hoe een verbinding verschillende processen als celstrekking, wortelvorming, parthenocarpie enz. kan veroorzaken of bevorderen. Men heeft lang gezocht naar de zgn. 'master reaction', d.w.z. een gemeenschappelijk stofwisselingsproces, dat aan de verschillende effecten van auxine ten grondslag zou liggen. Deze 'master reaction' is niet gevonden en het is de vraag of zij bestaat.

Het feit echter, dat de invloed van auxine op de vorming van virusvlekken en die

op de lengtegroei beide door calcium worden geremd en door kalium worden bevorderd is een aanwijzing, dat in deze gevallen een zelfde reeks stofwisselingsprocessen wordt veranderd. In nog onvolwassen cellen kan deze verandering tot celstrekking leiden, een proces dat met versnelling van bepaalde stofwisselingsprocessen gepaard gaat. De volwassen bladcellen van *N. glutinosa* kunnen niet meer groeien, doch de stimulatie van de stofwisseling zou hier zeer wel plaats kunnen vinden. Zo'n stimulatie kan synthese van enzymen en misschien van specifiek nucleïnezuur met zich meebrengen. Het lijkt niet onaannemelijk, dat door deze synthese voor virusvorming nodige verbindingen worden verbruikt en dat hierdoor de virusvorming zal worden beperkt.

Eenzelfde verklaring voor de invloed van auxine op de virusvorming wordt bedoeld door KRYLOV, SMIRNOVA & TARAKANOVA (1960) wanneer ze uit hun proeven concluderen dat 'IAZ de normale nucleïnezuurvorming bevordert'. Deze verklaring berust op het principe waarvan in de inleiding de formulering door CASPERSSON werd vermeld, nl. dat de stofwisselingsprocessen die tot virusvorming leiden, met de normale stofwisseling concurreren. Dit principe verklaart ook het feit, dat meristeemcellen waarin uiteraard de normale stofwisseling zeer intensief is, vaak vrij zijn van virus.

6 SAMENVATTING

1. Uit proeven waarin helften van afgeplukte bladeren van uit zwak licht afkomstige *Nicotiana glutinosa*-planten gedurende 16 uur voor de inoculatie met tabaksmozaïek-virus (TMV) op een oplossing van β -indolylazijnzuur (IAZ) dreven, bleek IAZ het aantal necrotische vlekken te verminderen in vergelijking met het aantal vlekken, dat ontstond op de bijbehorende bladhalften, die op water hadden gedreven. Op bladeren van in sterk licht gekweekte planten heeft het IAZ echter niet altijd dit remmend effect. Werden *N. glutinosa*-bladeren op dezelfde manier met andere groeistoffen behandeld, nl. met α -naftylazijnzuur (NAZ) en 2,4-dichloorfenoxiazijnzuur (2,4-D), dan reduceerde NAZ eveneens het aantal virusvlekken en was de invloed van 2,4-D onduidelijk (tabel 1). In een groot aantal andere proeven hadden alle drie genoemde groeistoffen in de concentraties van $10^{-2}\%$, $2 \times 10^{-3}\%$ en $10^{-3}\%$ een reducerende werking (fig. 1-4).

In proeven waarbij de drie isomeren van tryptofaan, nl. de D-, L- en DL-vormen, gebruikt werden, bleek dat D-tryptofaan in de helft van het aantal proeven reducerend werkte, terwijl DL- en L-tryptofaan geen invloed hadden op het aantal virusvlekken (tabel 2).

IAZ bleek in vitro het virus niet te inactiveren (tabel 3).

De werking van IAZ en NAZ berust vermoedelijk op hun auxinekarakter.

2. Bij bladeren uit zwak licht bleek IAZ, toegediend na de inoculatie met het virus, evenals een behandeling voor de inoculatie, reducerend te werken op het aantal virusvlekken (tabel 4). Een behandeling van deze bladeren met IAZ verlaagde de osmotische druk van het perssap van de bladeren (tabel 5). NAZ en 2,4-D verlaagden eveneens de osmotische druk van het perssap (tabel 6).

Volgens PANZER (1957) zou echter een verhoging van resistentie tegen het virus – resulterend in minder necrotische vlekjes – gepaard gaan met een verhoging van osmotische druk. Wel vond ik dat de osmotische druk van perssap van bladeren uit sterk licht hoger was dan de osmotische druk van perssap van bladeren uit zwak licht, maar nadat de bladeren op water hadden gedreven bleek het verschil in osmotische druk tussen bladeren uit sterk en zwak licht verdwenen te zijn (tabel 8).

3. Bij het zoeken naar een verklaring van de verlaging van de osmotische druk door IAZ werd gevonden, dat de waterabsorptie hier geen direct verband mee heeft (fig. 6). Bij in zwak licht gegroeide bladeren verlaagde een behandeling met IAZ het geleidingsvermogen van het perssap; bij bladeren uit sterk licht werd dit effect echter niet gevonden (tabel 9). Werd het geleidingsvermogen bepaald van de vloeistof, waarop de

bladeren hadden gedreven, dan bleek dat IAZ de exosmose van electrolyten bij bladeren uit zwak licht bevorderde; bij bladeren uit sterk licht laten de resultaten deze conclusie niet toe (tabel 10).

4. Er werd onderzocht of de vatbaarheid voor infectie met TMV zou kunnen worden verhoogd door de concentratie van het perssap te verhogen. De bladeren werden daartoe op een oplossing, samengesteld uit $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 , MgSO_4 en IAZ te drijven gelegd. Het perssap van bladeren die op deze zoutoplossing hadden gedreven, vertoonde een verhoogde osmotische druk in vergelijking tot het perssap van bladeren die met een IAZ-oplossing in aanraking waren geweest (tabel 12). Het aantal virusvlekjes kon ik door deze behandeling ook sterk verhogen (tabel 13: combinatie II). In aanwezigheid van IAZ, zowel in de zoutoplossing als in de controle, werd dit effect niet veranderd (tabel 13: combinatie III). De verlagende werking van IAZ bleef evenwel bij de aanwezigheid van het zoutmengsel bestaan (tabel 13: combinatie I). Werd de combinatie IAZ – zoutoplossing vergeleken met water, dan bleek de verhogende werking van het zout te overheersen over de verlagende invloed van het IAZ (tabel 13: combinatie IV).

Om na te gaan of de verhogende werking op het aantal virusvlekken door een behandeling met het zoutmengsel zou afhangen van de invloed van een der ionen in het mengsel, werden behandelingen toegepast met de drie kationen Ca^{++} , K^+ en Mg^{++} afzonderlijk. De resultaten geven aan, dat calcium het aantal vlekken verhoogde (tabellen 14 en 15); kalium en magnesium bleken beide het aantal necrotische vlekjes te verlagen (tabellen 17 en 18). Door de ionen aan het virus toe te voegen werd aangetoond dat het kalium en magnesium met het virus gemengd geen invloed op de infectie hadden; calcium had echter, evenals bij een voorbehandeling, een verhogende werking op het aantal virusvlekken (tabel 18).

5. In verschillende proeven werden fosfaatbuffers volgens SÖRENSEN of MCILVAINE gebruikt om de pH van de oplossingen constant te houden. De invloed van beide buffers (van gelijke zuurgraad) was meestal gelijk (tabel 19). Werd de invloed van een fosfaatbufferoplossing volgens SÖRENSEN vergeleken met die van water dan bleek, dat bij bladeren van planten uit zwak licht het fosfaat het aantal vlekken sterk verlaagd had (tabel 20). Een behandeling met een mengsel van SÖRENSEN-buffer en IAZ gaf niet meer vlekjes dan een behandeling met SÖRENSEN-buffer alleen (tabel 21). Daarentegen veroorzaakte een behandeling met IAZ en SÖRENSEN-buffer een vermindering van het aantal necrotische vlekken in vergelijking met een behandeling met IAZ alleen (tabel 22). Bij het gebruik van MCILVAINE-buffer werden dezelfde resultaten verkregen als met SÖRENSEN-buffer (tabel 23). Op grond van deze gegevens wordt het niet uitgesloten geacht, dat fosfaat invloed heeft op de vorming van auxine in de plant en dat hierdoor de invloed van het uitwendig toegediende IAZ wordt gemaskeerd.

6. Het voorgaande onderzoek is geen aanleiding, een van de reeds bekende effecten

van auxine verantwoordelijk te stellen voor de remming van de vorming van virusvlekken. De hypothese wordt gesteld, dat IAZ de stofwisseling van de bladcellen van *N. glutinosa* stimuleert met gevolg de synthese van enzymen en specifiek nucleïnezuur; hierdoor worden de voor virusvorming nodige verbindingen verbruikt, als gevolg waarvan de virussyntese zal worden beperkt.

7 SUMMARY

CHAPTER 1 INTRODUCTION

From 1951 to 1953 Mrs M. RAVEN-LUCARDIE carried out experiments concerned with the influence of amino acids and of β -indole acetic acid (IAA) on the necrotic lesions that are caused by the infection of *Nicotiana glutinosa* with tobacco mosaic virus (TMV). She found that IAA, and to a lesser degree D-tryptophane, had a decreasing effect on the number of lesions on leaves of *N. glutinosa* plants that had been kept in dim artificial light for one or two weeks before inoculation. Owing to circumstances the work of Mrs RAVEN has not been published.

The experiments described are a continuation of the work of Mrs RAVEN. The inhibition by IAA of the effect of an inoculation with TMV has been confirmed. The effect of tryptophane was variable, and for this reason no further research was carried out with this compound, but the mode of action of IAA was investigated further. This led to experiments on the effect of IAA on the osmotic pressure of the expressed juice of *N. glutinosa* leaves. In this connection, the effect of an alteration of the concentration of the juice by means of the addition of inorganic salts, on the susceptibility of *N. glutinosa* to TMV was also studied.

Some of the data from the literature concerning this subject have also been discussed in this chapter.

CHAPTER 2 THE EFFECT OF AUXINS AND TRYPTOPHANE

The following methods were used in the experiments. *N. glutinosa* plants approximately two months old were brought under constant light one week before initiation of the experiments. They were kept in two light intensities in a low case under four parallel fluorescent lamps (Philips). The higher light intensity was approximately 6400 Lux measured about 30 cm below the lamps, that is 10 cm above the pot at the height of the middle of the plant ('plants kept in bright light'). The low light intensity that was obtained by placing a cheese cloth on the glass plate that separated the lamps from the plants, was 183 Lux when measured at the same height as described for the high light intensity ('plants kept in dim light').

Leaves of the same age were picked and were divided into two equal halves by cutting along the midvein. One half-leaf was kept in a Petri dish on a solution of the compound and the other was placed as control on distilled water. The half-leaves, during the time that they were floating on the solutions and also after inoculation,

were always kept in the same light intensity under five continually lit fluorescent lamps (Philips) of 60 Watt, colour 33, that were placed 30 cm above the Petri dishes, 15 cm apart. After one night (16 hours) the half-leaves were rinsed with tap water, and dried with filter paper as well as possible. 500 mesh carborundum powder was dusted onto the leaves before inoculating them with TMV. Subsequently the half-leaves were placed on moist filter paper in closed Petri dishes. The Petri dishes were placed under fluorescent lamps. The light intensity in which the leaves were kept after inoculation was the same for all leaves, whether they were grown in bright or in dim light. When the lesions had developed they were counted.

In the calculation of the results, the transformation formula of KLECZKOWSKI (1949) was used, i.e. $y = \log(x + c)$, in which x is the number of lesions and c a constant; c was taken as 1. The difference between the logarithms of the number of lesions on the treated half-leaf and the number of lesions on the control half was calculated. This difference may also be expressed as the logarithm of the quotient:

$$\frac{\text{number of lesions on the treated half-leaf} + 1}{\text{number of lesions on the control half-leaf} + 1}$$

The mean of these differences, the number of which agreed with the number of leaves used, yields the result of the experiment.

The standard error has not been mentioned in the tables. In the tables Δ and $\square$ denote a positive effect if the quotient $\frac{\text{mean difference}}{\text{standard error}}$ is greater than the value from the t-table of FISHER at $P = 0.01$ and $P = 0.05$ respectively; $\circ$ denotes no effect. In a number of tables, the significance of the differences which were found, was calculated with a test without a parameter, i.e. with the sign test or the WILCOXON test.

Table 1 shows the results of the experiments concerning the influence of a treatment with IAA, α -naphthalene acetic acid (NAA), and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). IAA caused a marked decrease in the number of virus lesions on the plants kept in dim light. The influence of IAA on plants kept in bright light was variable. NAA decreased the number of local lesions on leaves from plants kept in dim light in 3 of the 5 experiments. 2,4-D caused an increase in 2 experiments and a decrease of the number of lesions in 3 experiments.

The absence or presence of hormonal activity other than of IAA is important for the interpretation of the results obtained, and for this reason the effects of a pretreatment with several concentrations of the three hormones were again studied in another series of experiments. Figures 1-4 show the results of these experiments. Each point is the average difference between the log of the number of lesions on the half-leaf treated with the plant hormone and the log of the number of lesions on the control half. In the concentrations of $10^{-2}\%$, $2 \times 10^{-3}\%$, and $10^{-3}\%$ (W/V) each plant hormone studied reduced the number of lesions. The influence seems to be dependent on the concentration except in the experiments with NAA. It is possible that NAA causes a maximum decrease at a concentration of $10^{-3}\%$. Higher concentrations than $10^{-2}\%$

were toxic and could not be used. There was some evidence that IAA and 2,4-D in concentrations lower than $10^{-3}\%$ increased the number of lesions. IAA and NAA in most cases have a reducing effect at a concentration of $10^{-2}\%$, whereas 2,4-D in the same concentration has a variable effect.

The difference between plants kept in bright light and plants kept in dim light is not immediately obvious from the graphs. However, calculations show a significant reduction in the number of lesions in 60% of the experiments with plants kept in dim light and in 38% of the experiments with plants kept in bright light.

The effect of the three isomers of tryptophane (D-, L-, and DL-) were also investigated. Table 2 shows the number of experiments where an increase or decrease of the number of lesions was observed, in which the quotient $\frac{\text{mean difference}}{\text{standard error}}$ was larger than the value for $P = 0.01$ and $P = 0.05$ from the t-table of FISHER. In the column 'no effect' the number of experiments is indicated in which the mentioned quotient is less than the value for $P = 0.05$ in this t-table. The three isomers of tryptophane in most cases had no effect on plants kept in bright light. L- and DL-tryptophane had no effect on plants kept in dim light. However, D-tryptophane caused a decrease in 5 of the 12 experiments but had no effect in the remaining 7 experiments. To determine whether the IAA affects the activity of TMV directly, the virus was mixed with a 0.01% IAA solution in a ratio of 1 : 1, after which this mixture was inoculated on *N. glutinosa* leaves. As a control the virus was mixed with distilled water. The results are summarized in table 3. It is evident that the IAA-virus mixture caused a significant decrease in the number of lesions in 3 of the 9 experiments with plants from bright light and in 2 of the 9 experiments with plants from dim light, when compared to their controls. When these results are considered together with the data from the experiments in which half-leaves were pretreated with IAA (table 1), it seems probable that the contact between hormone and virus does not inactivate the latter. It follows that the effects noted are due to the action of the auxin on the plant itself.

The above results show that NAA and IAA exert the same decreasing effect on the development of TMV lesions. It is possible, therefore, that the action of these compounds is caused by their hormonal property.

CHAPTER 3 EXPERIMENTS CONCERNED WITH THE MECHANISM OF ACTION OF β -INDOLE ACETIC ACID ON THE INFECTION OBSERVED

In order to obtain information about the nature of the influence of IAA on the virus infection, the question could be asked in which stage of the infection process the IAA exerts its effect, and thus at which time the IAA should be administered. Two series of experiments were carried out for this purpose.

1. A treatment of *N. glutinosa* leaves from dim light with IAA before inoculation with TMV.
2. Similar leaves were treated with IAA after inoculation with the virus.

The results of these experiments are shown in table 4. It may be noted that a pre-treatment with IAA caused a significant or highly significant reduction in the number of TMV lesions in 3 out of 5 cases (Series I, experiments 25, 26, and 27). The after-treatments also had a significant reducing effect on the number of necrotic lesions in 4 of the 5 experiments (Series II, experiments 23, 24, 25, and 27). These results suggest that a treatment with IAA after inoculation may also cause a reduction in the number of TMV lesions, but no conclusion concerning the stage of the virus infection in which IAA acts, may be drawn.

PANZER (1957) found that the osmotic pressure in the cells influences the virus infection: a high osmotic content of the cells opposes the infective process. This observation was the cause of further investigation to determine if the reduced susceptibility to TMV caused by IAA was correlated with an increased osmotic pressure. For this purpose, leaves of *N. glutinosa* plants that had been kept 6–7 days in bright or in dim light were divided into two halves, after which one half was floated on a solution, and the other put on water as control. These were then dried with filter paper and frozen in a Dewar vessel with dry ice for one minute or at -20°C for one night. The leaves were then ready for the determination of their osmotic pressure by the cryoscopic method of RICHARDS & CAMPBELL (1949) modified as follows. After thawing, a small amount of clear yellow fluid was expressed from the leaves with a suitable pair of tongs and caught in a small test tube. In this tube was placed a thermistor, the resistance of which increases as the temperature decreases. The resistance was monitored with a Wheatstone bridge. The resistance was thus a measure of the temperature. The expressed juice was frozen in a mixture of NaCl and ice at a temperature of approximately -10°C . At the moment of freezing, the tube containing juice was transferred to a 5% glycerine solution with a temperature of -2°C and the freezing point was determined. The temperature changes were measured as changes in resistance.

The freezing points of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.5 Molar solutions of sucrose were determined in order to establish a standard curve. A straight line was obtained when the resistance was plotted against the concentration of the sucrose solutions (fig. 5). By means of this curve, the osmotic pressure of the juice could be read in terms of an equivalent concentration of a sucrose solution, and expressed as such.

The example of such an experiment is given in table 5. The osmotic pressure of the expressed juice from leaves treated with IAA is lower than that of the control leaves treated with water. The osmotic pressures of leaves treated with NAA and 2,4-D were also determined. The results of these experiments are summarized in table 6. Not only IAA, but also NAA and 2,4-D caused a reduction in the number of lesions.

It is evident that the hypothesis of PANZER about the susceptibility of the leaves for TMV does not hold true in the case of IAA. A difference between my experiments

and those of PANZER is that the leaves before expressing the juice had floated one night on a solution, while PANZER extruded the juice directly after picking the leaves. To investigate the effects of this difference, leaves of plants that had been kept one week in bright light or in dim light were frozen immediately after picking and the juice expressed. Table 7 shows the osmotic pressures found in these experiments. The juice of leaves kept in bright light proved to be higher in the majority of the experiments. This would tend to corroborate the results found by PANZER.

It may be seen from table 8 that when the leaves were floated on water the difference in osmotic pressure between plants kept in bright light and in dim light disappeared.

The above results prove that half-leaves that have been floated on a IAA solution have a lower osmotic pressure than the corresponding half-leaves that have floated on water. One could ask how this difference is caused. One or more of the following processes could be the cause:

1. Increased water absorption by the leaf's cells.
2. Exosmosis of substances in solution.
3. Catatonosis, i.e. the transformation of osmotically active molecules into osmotically less active molecules.
4. Disappearance of organic molecules by respiration or fermentation.

To investigate the influence of IAA on the water absorption of leaf cells of *N. glutinosa*, the method that REINDERS (1938, 1942) used with potato slices was employed. The change in fresh weight after floating on the solution was determined by weighing. It became apparent that the floating of the leaves on IAA or on distilled water caused an increase in the fresh weight in all cases. Thus, during both treatments, an absorption of water, shown in the quotient of the weight increase and the original weight of the half-leaf, had taken place (fig. 6). The water absorption of leaves from *N. glutinosa* plants kept in bright light is indicated with ●, while the absorption of leaves from dim light is indicated with ○. The ordinate of each point on the graph expresses the water absorbed per gram by the half-leaf that had floated on IAA solution. The abscissa gives the corresponding observation of the half that floated on water. If both halves absorbed equal amounts of water the point lies on the line that runs 45° from the abscissa through the origin. Of the plants that had been kept in bright light 62 have their point above the line and 13 below, so IAA increased the water absorption of the leaves. On the contrary, 32 plants grown in dim light give points above, and 42 plants points below the line. In this case IAA did not increase the water absorption.

It was attempted to determine if the mode of action of IAA was by way of the second possibility mentioned, i.e. the exosmosis of dissolved substances. The conductivity of the juice in micromho/cm at 20°C from leaves treated at the above described manner, was therefore determined with the aid of a conductivity meter. Table 9 shows the results of these experiments. In several experiments the leaves were floated on 5 mls (experiment 73 B, 77 B, 79 B, and 81 B) and in the remaining experiments

on 15 mls of the solution. The effect of IAA on the conductivity of the juice is given by the average difference between the water and the IAA treatment, expressed in micromho/cm at 20°C. The significance of these effects was determined with the sign test. In 6 of the 11 experiments the conductivity of the juice of leaves kept in dim light was reduced by a treatment with IAA, whereas the conductivity of the juice of leaves from bright light was reduced in 6 of the 10 experiments. It was evident that the volume of the solution on which the leaves were floated affects the influence of IAA. This becomes apparent, when the significance of the results of the separate experiments was considered. Of the 14 experiments with leaves floated on 15 mls of solution, 11 had a significant result according to the usual test. Of the 7 results obtained with leaves floated on 5 mls of solution, only one was significant.

If the reduction in conductivity of the juice caused by IAA, as found in previous experiments with plants kept in dim light, occurs by exosmosis, then the conductivity of the solution on which the leaves floated should have been increased. Corresponding half-leaves were floated on water and on a 0.01 % IAA solution for one night, after which the conductivity of the solutions was determined. In order to minimize the dilution of the substances which may diffuse out of the leaves, they were floated on a solution of 5 mls instead of 15 mls. In these experiments an experimental error which had to be accounted for was the additional conductivity of the IAA solution which in itself is higher (approximately 25–34 micromho) than the conductivity of water (approximately 3 micromho). Further, it was not known how much the conductivity of the IAA solution declined by auxin absorption by the leaves.

In order to determine the magnitude of the corrections to be made, the colorimetric method of TANG & BONNER (1947) was used to determine how much IAA was absorbed from the solution by 20 leaves from bright light and 20 leaves from dim light. Leaves from bright light absorbed approximately 11.5% of the IAA in the solution and leaves from dim light about 19%. Most of the IAA therefore remained in the solution. In the actual experiments, the conductivity of the IAA that the leaves had left in solution, was subtracted from the conductivity of the 5 mls of solution. The results shown in table 10 agree with those of table 9, i.e. in leaves from dim light IAA favours the exosmosis of electrolytes. However, the results from leaves from bright light are not as conclusive.

Table 9 suggests that the effect of IAA on the conductivity of the juice from leaves obtained from 15 mls solutions is significant in more cases than in experiments with juice from leaves floated on 5 mls solutions. If the changes in conductivity are correlated with the formation of virus lesions, the volume of the solution should also have an effect on the number of lesions. Results of investigations into this question are shown in table 11. In 14 of the 16 experiments the decrease of the number of lesions caused by IAA was greater in leaves pretreated with 15 mls of solution than in leaves pretreated with 5 mls of solution. It could be supposed that these results are not caused by the differences in volume but by the fact that 15 mls of solution contain more IAA

than 5 mls. As has been mentioned, only a fraction of the IAA is removed from the solution, so that this supposition is probably not correct.

The following conclusions may be drawn:

1. The conclusion of PANZER that a correlation exists between the osmotic pressure of cells and the susceptibility to TMV should not be regarded as a general rule. This also makes it improbable that the change in osmotic pressure induced by a treatment with IAA is the direct cause of the decrease in the number of local lesions.

2. The effect of IAA is not brought about by the increased absorption of water.

3. The exosmosis of electrolytes from leaves kept in dim light as caused by IAA is not necessarily related with the lower number of lesions. However, the fact that a greater volume of solution accentuates the effect of IAA on the conductivity of the juice and also on the number of lesions would suggest that there is a relation between the electrolyte content of the leaf and the number of TMV lesions. Nevertheless, the total content of electrolytes may not be the important factor because it is possible that IAA favours an exosmosis of certain electrolytes that have a specific action, either positive or negative, on the formation of necrotic lesions.

CHAPTER 4 THE SPECIFIC EFFECTS OF SOME INORGANIC IONS

Whether the susceptibility for TMV infection is connected with the concentration of the juice was also investigated in another manner, namely, by attempting to raise the concentration of the juice. For this purpose half-leaves were floated on a solution that contained 0.033 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.06 M KNO_3 , and 0.02 M MgSO_4 , and had an osmotic pressure equivalent to a 0.184 M sucrose solution. The control halves were floated on distilled water.

Table 12 lists the results of these experiments. The salts were dissolved in an IAA solution while the IAA solution itself served as control. It was attempted to determine the influence of the salt solution on the osmotic pressure of the plant juice. It was evident that the treatment with this salt solution increased the osmotic pressure of the juice. However, this could also be the result of the extraction of water from the leaf cells.

The influence of the solution of salts on the number of local lesions was also studied. Four series of experiments were conducted to the following plan:

	<i>Left half-leaf</i>	<i>Right half-leaf</i>
Combination I	IAA-salt solution	Salt solution
Combination II	Salt solution	Water
Combination III	IAA-salt solution	IAA solution
Combination IV	IAA-salt solution	Water

After these treatments the half-leaves were inoculated with TMV.

The results of these experiments are summarized in table 13. It may be concluded:

1. Floating on a salt solution increases the number of local lesions (Combination II).
2. This effect is not modified if the solution on which the half-leaves are floated contains IAA (Combination III).
3. Conversely the decreasing influence of IAA that was described in the previous chapters remains also in the presence of the salt mixture (Combination I).
4. If the influence of the IAA-salt mixture solution is compared with the effect of water then the increase of the number of lesions caused by the salt dominates the decrease caused by IAA (Combination IV).

In another series of experiments the influence of each of the three cations was studied separately. The effect of Ca^{++} was determined by the addition of CaCl_2 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. In the case of K^+ , KCl and KNO_3 were used, while Mg^{++} was supplied as MgSO_4 and MgCl_2 .

Tables 14 and 15 give the results of the experiments with $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and CaCl_2 . It is apparent that both salts increased the number of necrotic lesions.

The results of the experiments with the potassium and magnesium salts are given in tables 16 and 17, respectively. Both ions brought about a decrease in the number of TMV lesions. As was the case with the results of the IAA experiments, it could be asked whether the ions affect the plant, the virus, or both. For this purpose the ions were mixed with the TMV solution. For these experiments *Phaseolus vulgaris* var. 'Pinto' was used as well as *N. glutinosa*. The results of these experiments are given in table 18. Potassium and magnesium had no effect, but in 5 of the 8 experiments calcium had an effect that was qualitatively similar to the effect in plants pretreated with this ion, i.e. an increase of the number of lesions.

It may be concluded from these experiments that in the plant the site of action of potassium and magnesium differs from that of calcium, if these ions do indeed have an influence on the plant. However, it is also possible that calcium has an effect on the virus itself, whether it is added to the inoculum or administered to the plant before inoculation with the virus.

In the foregoing experiments the IAA was dissolved in distilled water. The pH of such solutions changes during the experiment, and this may have an effect on the results obtained. For this reason some experiments were carried out in which the pH was kept constant by the addition of phosphate buffers. The effect of the phosphate buffer as described by SÖRENSEN was compared with the influence of citric acid-phosphate buffer as described by MCILVAINE. The results of these experiments, shown in table 19, indicate that the effect is usually similar. Table 20 gives the influence of the phosphate buffer in comparison with water. In all except one of these experiments the phosphate buffer decreased the number of lesions on leaves from dim light. On leaves from bright light this effect could only be noted twice. Also the influence of a treatment with a mixture of SÖRENSEN buffer and IAA was compared with a treatment with SÖRENSEN buffer alone. The results of these experiments shown in table 21, indicate

that the mixture of buffer and IAA does not favour less lesions than the buffer alone. However, that a treatment with IAA and SÖRENSEN buffer lowered the number of virus lesions in comparison with IAA alone is shown in table 22.

From table 23, in which the results of experiments with MCILVAINE buffer are tabulated, it may be observed that these were similar to the results obtained with SÖRENSEN's buffer.

The fact that in the presence of phosphate ions IAA has no effect on the formation of lesions may be due to an unfavourable pH (5-6.5) for optimum hormonal action. Phosphate would then exert a much greater influence on the origination of virus lesions than IAA. Another possibility is that phosphate enhances the formation of auxin in the plant and that thus the effect of externally administered IAA is nullified. VAN RAALTE (1937) found that phosphate increased the auxin content of root tops markedly and it is therefore not impossible that this phenomenon also plays a role in these experiments.

CHAPTER 5 DISCUSSION

KRYLOV, SMIRNOVA & TARAKANOVA (1960) found that IAA had an inhibiting action on reproduction of TMV in 'Mamont' tobacco. Although no experiments were carried out concerning the reproduction of the virus, it could be supposed that also in the present experiments the reduction of the number of local lesions caused by IAA was correlated with a reduced reproduction rate of the virus.

Three kinds of effects were found:

1. The influence of IAA on the formation of virus lesions.
2. The influence of IAA on the ions in the leaf's cells.
3. The influence of the ions on the formation of virus lesions.

It is probable that IAA and cations influence the process of the formation of virus lesions independently of each other, for the decreasing effect of IAA persists in a solution of Ca-, K-, and Mg-ions, that by itself causes an increase in the number of lesions (table 12, combination I).

That IAA acts by weakening the cell wall is not a very probable explanation of its mechanism of action. The carborundum powder that is used with the inoculation would more easily make abrasions in a cell wall weakened by IAA, so that IAA would in this manner favour virus activity. However, opposite results were obtained.

It may be concluded that the experiments conducted give no reason to hold one of the known effects of auxin responsible for the decrease in the formation of virus lesions.

The fact that the influence of auxin on the formation of virus lesions and on cell growth are both inhibited by Ca^{++} and enhanced by K^{+} is an indication that in these cases the same metabolic processes are involved. In immature cells this change may

lead to a lengthening of the cells, a process that is accompanied with an acceleration of certain metabolic processes. Adult leaf cells of *N. glutinosa* are unable to grow, but the stimulation of metabolism would certainly be able to occur. Such a stimulation may affect synthesis of enzymes and perhaps of specific nucleic acids. It seems reasonable to assume that this synthesis may consume compounds necessary for virus reproduction and that in this way virus growth is limited.

VERANTWOORDING

Dit onderzoek, dat op het Laboratorium voor Virologie te Wageningen werd verricht, is mogelijk gemaakt door de financiële steun van het Ministerie van Landbouw en Visserij.

Aan de heer C. VAN DEN ANKER, Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek te Wageningen, betuig ik mijn dank voor zijn medewerking bij de wiskundige verwerking van de resultaten. Mej. S. PEL en Mevr. M. C. L. RAUWERDINK-VAN DER POLL dank ik voor hun toegewijde hulp bij het technische gedeelte van het onderzoek. De heer C. VAN GROENINGEN dank ik voor het vervaardigen van de figuren.

Tenslotte dank ik het Centrum voor Landbouwpublicaties en Landbouwdocumentatie te Wageningen voor de medewerking bij het verschijnen van deze publikatie.

LITERATUUR

- ARISZ, W. H. 1960 Symplassmatischer Salztransport in Vallisneria Blätter. *Protoplasma* 52, 309-343.
- AUGIER DE MONTGREMIER, H. & G. MOREL 1948 Sur la diminution de la teneur en virus (Marmor tabaci HOLMES) de tissus de tabac cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sci.* 227, 688-689.
- BAWDEN, F. C. 1954 Inhibitors and plant viruses. *Advances in virus research* II, 31-57. Academic Press Inc., Publishers, New York, N.Y.
- BAWDEN, F. C. & F. M. ROBERTS 1947 The influence of light intensity on the susceptibility of plants to certain viruses. *Ann. appl. Biol.* 34, 286-296.
- BAWDEN, F. C. & F. M. ROBERTS 1948 Photosynthesis and predisposition of plants to infection with certain viruses. *Ann. appl. Biol.* 35, 418-428.
- BHATT, J. G. & S. S. VERMA 1958 Effect of growth regulating substances on virus affected tomato plants. *Sci. and Cult.* 23, 610-611.
- BURSTRÖM, H. 1953 Growth and water absorption of *Helianthus* tuber tissue. *Physiol. Plant.* 6, 685-691.
- BURSTRÖM, H. 1954 Studies on growth and metabolism of roots. X. Investigations of the calcium effect. *Physiol. Plant.* 7, 332-342.
- CASPERSSON, T. 1947 The relation between nucleic acid and protein synthesis. *Symposia of the Society for experimental Biology* 1, 148.
- CHESSIN, M. & H. A. SCOTT 1955 Calcium deficiency and infection of *Nicotiana glutinosa* by tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 45, 288-289.
- COOIL, B. J. & J. BONNER 1957 The nature of growth inhibition by calcium in the *Avena* coleoptile. *Planta* 48, 696-723.
- FARKAS, G. L., Z. KIRÁLY & F. SOLYMOŠY 1960 Role of oxidative metabolism in the localization of plant viruses. *Virology* 12, 408-421.
- GENDRON, Y. 1950 Action du lait de coco et d'un extrait de coprah sur la multiplication du virus de la mosaïque du tabac et du virus X de la pomme de terre chez le tabac. *C. R. Acad. Sci.* 230, 1974-1975.
- GONDO, M. 1954 Effects of plant hormones on tobacco mosaic symptoms. I, II. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 18, 22-24; 39-41.
- GORDON, S. A. & F. S. SANCHEZ NIEVA 1949 The biosynthesis of auxin in the vegetative pineapple. *Arch. Biochem.* 20, 356-385.
- HOLMES, F. O. 1929 Local lesions in tobacco mosaic. *Bot. Gaz.* 87, 39-55.
- KETELLAPPER, H. J. 1953 The mechanism of the action of indole-3-acetic acid on the water absorption by *Avena* coleoptile sections. *Acta Bot. Neerl.* 2, 387-444.
- KLECZKOWSKI, A. 1949 The transformation of local lesion counts for statistical analysis. *Ann. appl. Biol.* 36, 139-152.
- KRYLOV, A. V., V. A. SMIRNOVA & G. A. TARAKANOVA 1960 Effect of physiologically active substances on the reproduction of tobacco mosaic virus. *Fiziol. Rastenii (Transl.)* 7, 253-258.
- KUTSKY, R. J. 1952 Effects of indole butyric acid and other compounds on virus concentration in plant tissue cultures. *Science* 115, 19-20.

- KUTSKY, R. J. & T. E. RAWLINS 1950 Inhibition of virus multiplication by naphthalene acetic acid in tobacco tissue cultures as revealed by a spectrophotometric method. *J. Bact.* 60, 763-766.
- LIMASSET, P., F. LEVIEL, & M. SECHET 1948 Influence d'une phytohormone de synthèse sur le développement des virus X et Y de la pomme de terre chez le tabac. *C. R. Acad. Sci.* 227, 643-645.
- LOCKE, S. B. 1948 Studies on the chemotherapy of potato virus diseases. *Phytopathology* 38, 916.
- MATTHEWS, R. E. F. 1953 Factors affecting the production of local lesions by plant viruses. I. The effect of time of day of inoculation. II. Some effects of light, darkness and temperature. *Ann. appl. Biol.* 40, 377-383; 556-565.
- NICHOLS, C. W. 1952 The retarding effect of certain plant hormones on tobacco mosaic symptoms. *Phytopathology* 42, 579-580.
- PANZER, J. D. 1957 Osmotic pressure and plant virus local lesions. *Phytopathology* 47, 337-342.
- PAVILLARD, J. 1954 Contribution à l'étude de la croissance des plantes virosées: virus et auxines. *Ann. biol.* 30, 170-181.
- POUND, G. S. & J. B. BANCROFT 1956 Cumulative concentrations of tobacco mosaic virus in tobacco at different photoperiods and light intensities. *Virology* 2, 44-56.
- REINDERS, D. E. 1938 The process of water-intake by discs of potato tuber tissue. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch.* 41, 820-831.
- REINDERS, D. E. 1942 Intake of water by parenchymatic tissue. *Rec. trav. bot. néerl.* 39, 1-136.
- RICHARDS, L. A. & R. B. CAMPBELL 1948 Use of thermistors for measuring the freezing point of solutions and soils. *Soil Science* 65, 429-436.
- RYZHKOV, V. L. 1952 Influence des acides aminés et des composés voisins sur la multiplication du virus de la mosaïque de tabac. *Dokl. Acad. Nauk. S.S.S.R.* 80, 677-679, (1951); *Bull. anal. B II*, 1623.
- TANG, Y. W. & J. BONNER 1947 The enzymatic inactivation of indole acetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. *Arch. Biochem.* 13, 11-25.
- THIMANN, K. V. 1935 On the plant growth hormone produced by *Rhizopus suinus*. *J. biol. Chem.* 109, 279-291.
- THIMANN, K. V., G. M. LOOS, & E. W. SAMUEL 1960 Penetration of mannitol into potato discs. *Plant Physiology* 35, 848-853.
- THIMANN, K. V. & C. L. SCHNEIDER 1938 The role of salts, hydrogen-ion concentration and agar in the response of the *Avena* coleoptile to auxin. *Am. J. Bot.* 25, 270-280.
- VAN ANDEL, O. M. 1958 Investigations on plant chemotherapy. II. Influence of amino acids on the relation plant-pathogen. *Tijdschr. Pl. Ziekten* 64, 307-327.
- VAN OVERBEEK, J. 1944 Anion, water uptake and osmotic pressure in potato tissue. *Am. J. Bot.* 31, 265-269.
- VAN RAALTE, M. H. 1937 On factors determining the auxin content of the root tip. *Rec. trav. bot. néerl.* 34, 278-332.
- VAN RAALTE, M. H. & J. P. H. VAN DER WANT 1952 Effects of amino acids on the number of lesions produced in leaves of *Nicotiana glutinosa* after inoculation with tobacco mosaic virus. Proceedings of the Conference of Potato Virus Diseases Wageningen-Lisse, 66-70.

- | | | |
|--|-------|--|
| WEINTRAUB, M. & W. G. KEMP | 1955 | The inhibiting effect of some heterocyclic and other organic compounds on tobacco mosaic virus. <i>Canad. J. Microbiology</i> 1, 549-559. |
| WEINTRAUB, M. & W. G. KEMP | 1958 | The effect of darkness on lesion production in <i>Nicotiana glutinosa</i> L. <i>Canad. J. Bot.</i> 36, 455-456. |
| WILDMAN, S. G., M. G. FERRI
& J. BONNER | 1947 | The enzymatic conversion of tryptophane to auxin by spinach leaves. <i>Arch. Biochem.</i> 13, 131-144. |
| WILTSHIRE, G. H. | 1956 | The effect of darkening on the susceptibility of plants to infection with viruses. 1. Relation to changes in some organic acids in the french bean. <i>Ann. appl. Biol.</i> 44, 233-248. |
| YARWOOD, C. E. | 1954a | Resistance of bean leaf pulvini to fungi and viruses. <i>Phytopathology</i> 44, 64. |
| YARWOOD, C. E. | 1954b | Zinc increases susceptibility of bean leaves to tobacco mosaic virus. <i>Phytopathology</i> 44, 230-233. |