

LINNAEUS EN DE PLANTEVIROLOGIE

door L. BOS

(Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek te Wageningen)

Inleiding

In de land- en tuinbouw bestaat een toenemende belangstelling voor virussen gezien hun betekenis als verwekkers van ernstige planteziekten (en dierziekten, die hier echter buiten beschouwing blijven). Ook in de biologische wetenschap neemt de belangstelling snel toe. Dit is eensdeels gevolg van het feit dat virussen een zeer ingrijpend en veelzijdig effect op de groei en ontwikkeling van de plant kunnen hebben (zie bijv. Bos, 1963).

Anderdeels vindt de snel toenemende belangstelling haar verklaring in het feit dat het moderne biochemisch onderzoek heeft aangetoond dat er grote overeenkomst bestaat tussen virussen en normale celbestanddelen, te weten de centra van eiwitsynthese en de dragers der erfelijke informatie. Daardoor helpt het virusonderzoek het inzicht te verdiepen in eiwitsynthese en genetica.

Door het steeds intensiever landbouwkundig en biologisch onderzoek worden in snel toenemende mate nieuwe virusziekten en virussen beschreven. Zo bekruipt thans herhaaldelijk vooral de boer en tuinder, maar ook de gespecialiseerde „plantedokter”, een gevoel van duizeling, wanneer hij wordt gesteld voor de vraag welke virusziekte een gegeven plant of gewas heeft aangetast. Vaak luidt de diagnose slechts: „virus”, of „waarschijnlijk virus”. Het is meestal moeilijk en in veel gevallen onmogelijk na te gaan om welk virus het precies gaat. Bovendien heerst er een toenemende spraakverwar- ring wat betreft de juiste naam van de virusziekten of van de onderhavige virussen.

Wij dienen ons echter te realiseren dat het hier niet gaat om een nieuw probleem. Een geheel gelijksoortige situatie heeft immers gegolden voor de onderscheiding van planten en dieren en later eveneens voor schimmels en bacteriën, ook die welke verantwoordelijk zijn voor een groot aantal besmettelijke (plante)ziekten. Het is LINNAEUS geweest, die voor het eerst doelbewust bij planten en dieren orde is gaan scheppen in deze schijnbaar chaotische toestand. Ook voor de studie van virussen en virusziekten, hoewel van nature gecompliceerder, zal zijn werkwijze van grote betekenis zijn. Het is de bedoeling van deze bijdrage dit aan te tonen en tevens inzicht te geven in enige interessante en tevens belangrijke ontwikkelingen op het gebied van het moderne (plante)virologisch onderzoek. Daar tot dusver in de Neder-

landse biologische vakliteratuur nog weinig aandacht aan virussen is geschonken, is een nadere toelichting van de principes der technieken hier en daar wellicht onvermijdelijk.

De Linnaeaanse werkwijze en haar consequenties voor de plantevirologie

In 1735 verscheen het welbekende „Systema Naturae” van LINNAEUS, waarin hij orde op zaken begint te stellen door een volledig systeem of overzicht te geven van de planten- en dierenwereld op een geheel nieuwe grondslag. Vooral als gevolg van de vele ontdekkingsreizen waren tal van nieuwe vormen gevonden, zodat een systematische indeling urgent werd. In aansluiting op dit werk verscheen in 1753 het klassieke „Species Plantarum”, waarin hij de toen bekende vormen of eenheden als soorten aanduidt en kort beschrijft en rangschikt. Bovendien past hij de op deze indeling gebaseerde, sindsdien als „binaire nomenclatuur” bekende naamgeving toe. Met behulp van een klapper op de beschrijvingen van LINNAEUS kon men de plaats, en daarmee de naam, van een op het eerste gezicht onbekende plant in het systeem terugvinden. Tegenwoordig wordt dit werk gedaan met een praktisch ingerichte „Flora”. Daarom voldeed ook deze indeling niet. De moeilijkheden, die zo lang hadden bestaan bij de onderscheiding en herkenning van planten en dieren, herhaalden zich echter bij de studie der besmettelijke planteziekten. PASTEUR had er reeds op gewezen dat afbraak en omzetting van organische stof het gevolg zijn van de activiteit van specifieke micro-organismen, microscopisch kleine plantjes of diertjes. In 1853, dus precies 100 jaar na de uitgave van „Species Plantarum” door LINNAEUS, toonde de Duitser DE BARY onomstotelijk aan, dat bepaalde besmettelijke planteziekten door zeer bepaalde schimmels worden teweeggebracht. Hij werkte aan de roest- en brandziekten der granen. De eerste schimmels waren door LINNAEUS reeds in het z.g. binomiale systeem opgenomen. Een analoge ontwikkeling in de medische wetenschap leidde in 1882 tot de opstelling van de welbekende postulaten van KOCH. Deze stellingen zijn later ook van grote betekenis gebleken voor de planteziektenkunde. Ze houden in, dat met de ziekteverschijnselen het voorkomen van micro-organismen moet samengaan, dat deze laatste te isoleren moeten zijn en dan in dat stadium geïdentificeerd, herkend, moeten kunnen worden. Wanneer daarna oorspronkelijk gezonde planten na kunstmatige besmetting de verschijnselen van de uitgangsplant gaan vertonen is daarmee aangetoond dat de onderhavige ziekte door het geïdentificeerde micro-organisme is veroorzaakt.

Op deze wijze heeft het werk van PASTEUR, DE BARY en KOCH de mogelijkheid geschapen orde te brengen in de baaiert van besmettelijke ziekten, waaronder die van planten, en ze te rangschikken en te herkennen, niet op grond van de veelal zeer veranderlijke ziekteverschijnselen van het aange-taste organisme, maar op grond van de eigenschappen der verwekkers (*etiologische diagnostiek*). Deze Linnaeaanse benadering betekende het eigenlijke begin van de wetenschappelijke planteziektenkunde, althans wat de door organismen veroorzaakte ziekten betreft. Het gaf immers voor het eerst de mogelijkheid de verkregen gegevens te ordenen en te overzien. Voor de

praktijk is dit van onschatbare waarde gebleken omdat het de mogelijkheid biedt de verschillende ziekten te onderscheiden, als zodanig te herkennen, en elke ziekte te bestrijden, afgaande op de specifieke (soorts-karakteristieke) eigenschappen, en dus ook zwakheden, van de onderhavige verwekker. Reeds spoedig bleek echter, dat de door het werk van MAYER (1886), IWANOWSKI (1892) en BEIJERINCK (1898) voor het eerst bij planten ontdekte virussen (eerst alleen tabaksmozaïekvirus) zich niet gedroegen volgens de bovengenoemde regels van KOCH. Ze waren namelijk niet te isoleren en niet in reincultuur buiten de levende plant te kweken. Ook waren ze niet met het blote oog, noch met het microscoop te zien en aldus te identificeren. Het waren ziekteverwekkers van totaal andere aard dan de tot dusver bekende micro-organismen. De smetstof was zo klein dat ze zelfs in staat was bacteriefilters te passeren.

Het aantal ziekten dat men aan virus leerde toeschrijven nam echter, vooral na 1920, snel toe, hoewel het virus zelf „ongrijpbaar” bleef. Daarom poogde men lange tijd enige orde te brengen door de ziekten te rangschikken naar de planten waarin ze voorkwamen. Spoedig bleek echter dat één virus soms talrijke en uiteenlopende plantesoorten kan aantasten. Het gevolg was een rangschikking van virusziekten op grond van de aard der ziekteverschijnselen, bijv. mozaïekziekten, kringvlekkenziekten, vergelingsziekten enz. De reactie van waardplanten bleek al spoedig zeer veranderlijk en afhankelijk van vele omstandigheden.

In 1927 werd door JOHNSON voor het eerst gepoogd bij de karakterisering der ziekten „langs een omweg” het virus zelf te betrekken, door de houdbaarheid van het infectievermogen van sap van besmette planten te bepalen. Dit gebeurde bij bewaren van het uitgeperste sap *in vitro*, bij trapsgewijze verdunning met water, bij een trapsgewijze warmtebehandeling gedurende 10 minuten en eventueel ook na toediening van bepaalde chemicaliën. Lange tijd stonden de aldus bepaalde „houdbaarheid *in vitro*”, het „verdunnings-eindpunt”, het „thermale inactiveringspunt” en de „resistentie tegen chemicaliën” bekend als de „fysisch-chemische eigenschappen van het virus *in vitro*”. (In het licht van het moderne fysisch-chemische virusonderzoek is deze naam niet houdbaar meer.)

Later werd nog een ander criterium aan de onderscheiding van virusziekten toegevoegd, een criterium dat „wijst op” verschillen in virus, namelijk een onderscheiding naar de wijze van overdracht. De besmetting van planten kan namelijk plaats vinden door verschillende insecten en soms mijten, via het zaad, vanuit de grond en soms zelfs door contact. Vele virussen zijn kunstmatig over te brengen met uitgeperst sap, door insecten, met warkruidsoorten en door enting. Hoewel de op deze wijze verkregen gegevens hebben geleid tot de conclusie dat er behalve het tabaksmozaïekvirus nog vele andere virussen bestaan, zijn ze echter toch van relatieve waarde gebleken voor de nauwkeurige onderscheiding van de verschillende virussen.

Vooral toen na de tweede wereldoorlog steeds meer afwijkingen aan virus werden toegeschreven, het aantal beschreven virusziekten snel toenam en door het steeds intensiever wordende handelsverkeer ook de internationale

verspreiding van virusziekten toenam, bleek in toenemende mate de ontoreikendheid der „afgeleide” viruseigenschappen ter vaststelling van de identiteit van virussen en virusziekten.

Al deze problemen zijn te herleiden tot moeilijkheden rond het vaststellen van de werkelijke identiteit der onderhavige virussen, en de onmogelijkheid de regels van KOCH toe te passen op virusziekten. Een eerste teken dat in deze verwarrende situatie verandering zou komen, was de welbekende isolering en zuivering van het tabaksmozaïekvirus door STANLEY in 1935. Dit was hem langs scheikundige weg gelukt door het z.g. „uitzouten”, waarbij de infectieuze stof uit sap van zieke planten neersloeg. Na verdergaande zuivering was een soort kristallijne stof verkregen, die het daaropvolgende jaar door BAWDEN et al. als een nucleoproteïne werd geanalyseerd. Met het werk van STANLEY was voor het eerst virus „grijpbaar” gemaakt en toegankelijk voor nauwkeurige beschrijving. Interessant is dat het tijdstip van deze vondst valt precies 200 jaar na de publikatie van het reeds genoemde „Systema Naturae” door LINNAEUS in 1735 en ongeveer 100 jaar nadat DE BARY er voor het eerst in slaagde een schimmel als verwekker van een plantenziekte te identificeren.

Na 1935 nam onze kennis omtrent „het virus” zelf eerst nog maar langzaam toe. In 1939 werden door KAUSCHE, PFANKUCH en RUSKA met de inmiddels geconstrueerde elektronenmicroscop voor het eerst virusdeeltjes, ook weer van het tabaksmozaïekvirus, in de vorm van korte staafjes „gezien”. Vooral na de laatste wereldoorlog namen echter, dank zij vele nieuwe technische hulpmiddelen, de mogelijkheden van virusonderzoek snel toe en daarmee ook die van het Linnaeaanse virusonderzoek. Uit het hier geschetste mag reeds duidelijk blijken hoe de technische uitvoering van dit onderzoek totaal verschilt van die bij de studie der door organismen veroorzaakte besmettelijke ziekten. Gezien de moeilijkheden maar ook de mogelijkheden van dit onderzoek is het van belang ook de moderne technische aspecten van dit onderzoek eens toe te lichten.

De belangrijkste doelstelling van het Linnaeaanse virusonderzoek is de nauwkeurige virusidentificatie, waaronder wordt verstaan zowel de virusbeschrijving en -karakterisering als de virusherkenning, een virusidentificatie gebaseerd op de intrinsieke eigenschappen der virussen zelve.

Het eerste probleem dat zich voordoet is dat van de *virusisolering*. Pas daarna volgt de *viruskarakterisering*. Eerst na groepering of *classificering* van de beschreven virussen is er de mogelijkheid voor het opstellen van een aanvaardbare naamsaanduiding of *nomenclatuur* van de beschreven en onderscheidde eenheden. Pas dan zal het mogelijk zijn op het eerste gezicht onbekende virussen te herkennen en aldus voor virusziekten aan betrouwbare *diagnostiek* te doen.

Virusisolering en -zuivering

Vooropgesteld moet worden dat virussen niet buiten de levende cellen van het waardorganisme te „kweken” zijn. Daarom zijn de isolatietechnieken voor virussen totaal verschillend van die voor bacteriën en schimmels. Deze

zijn immers meestal te kweken op een kunstmatige voedingsbodem in petri-schaal of reageerbuis en te zuiveren en van elkaar te scheiden (in rein-cultuur te brengen) door gebruik te maken van selectieve voedingsbodems, daarbij afgaand op de specifieke eisen die de verschillende organismen stellen ten aanzien van hun voeding.

Voor virusvermeerdering moet daarom gebruik worden gemaakt van levende waardorganismen, in ons geval dus van planten. Het van deze planten door uitpersen of grondig fijnmaken (homogeniseren) van bijv. de bladeren verkregen plantesap is nu het uitgangsmateriaal waaruit virus moet worden geïsoleerd.

Het afzonderen van virus uit dit plantesap van normale celbestanddelen en van niet zelden gelijktijdig aanwezige andere virussen, berust op verschillen in fysische en fysisch-chemische eigenschappen tussen virus en normale celbestanddelen en tussen virussen onderling. Het is echter nog niet zo eenvoudig een dergelijke scheiding tot stand te brengen, omdat in genoemde eigenschappen virussen veel overeenkomst vertonen met allerlei macromoleculaire celbestanddelen. Al deze stoffen gedragen zich als colloïdale stoffen. Dit gedrag wordt voornamelijk bepaald door een viertal krachten, nl. de zwaartekracht, de Brownse bewegingskracht, de algemene aantrekkingskracht volgens LONDON en VAN DER WAALS en de elektrische afstotingskracht. Op onderlinge verschillen in grootte van deze krachten berusten de methoden van *selectieve uitvlokking* door „uitzouten”, „aanzuren” of verwarming, maar ook de meer moderne werkwijzen als *elektroforese*, *ultra-centrifugering* en sinds kort ook de *chromatografie*. De voor dit artikel slechts beperkte ruimte laat niet toe deze methoden hier verder toe te lichten. Wel moet erop worden gewezen dat voor deze viruszuiveringen nog steeds geen algemeen toegepaste regels bestaan. Wij hebben nog onvoldoende inzicht in de factoren die de stabiliteit en het gedrag van het virus in de plant zowel als *in vitro* bepalen. Ter verruiming van onze kennis hierover is nog veel fundamenteel biofysisch en biochemisch onderzoek nodig. Wel worden snel vorderingen gemaakt.

Tot voor kort leenden zich voor isolering alleen die *virussen welke met sap overgebracht kunnen worden*, zoals dat heet in de plantevirologie ter onderscheiding van de virussen welke alleen maar door bijv. insecten, of door middel van enting kunnen worden overgebracht. Dit is gevolg van het feit dat de virussen het uitpersen of homogeniseren moeten kunnen doorstaan. Of dit het geval is, kunnen wij aantonen in een infectieproef, waarin het perssap of homogenaat wordt gebruikt als inoculum. Daarbij vertonen z.g. toetsplanten na inoculatie of inenting (inwrijving op de bladeren met een poedervormig slijpmiddel dat uiterst kleine verwondingen veroorzaakt) na verloop van tijd karakteristieke symptomen. Infectieproeven zijn verder nodig bij alle stadia van viruszuivering om na te gaan waar het virus is gebleven. Wel beschikken wij thans over enige moderne methoden om virus aan te tonen, zoals elektronenmicroscopie, serologie en ultraviolet-absorptie, maar meestal is het infectie-experiment het eenvoudigst, het zekerst en het goedkoopst.

Verder onderzoek heeft inmiddels uitgewezen dat de mogelijkheid van virus-
overbrenging betrekkelijk is en afhankelijk is van vele factoren, zoals virus-
concentratie, aanwezigheid van remstoffen en oxyderende stoffen, het slechts
voorkomen in bepaalde weefsels enz. Door de toename van onze kennis van
bovengenoemde factoren neemt het aantal met sap over te brengen virussen
geleidelijk toe, zij het veelal met ingewikkeld kunst- en vliegwerk. Zo ge-
lukte het aan BLACK (1940) om het bij planten niet met sap over te brengen
„aster yellows”-virus bij de insekten, die het virus in de natuur verspreiden,
wel met lichaamsvocht van deze dieren over te brengen door middel van
injectie. Deze techniek werd de basis voor het zuiveren van enkele virussen,
die verwant zijn aan het zojuist genoemde.

Het bespreken van al dit overigens zeer interessante en belangrijke virus-
zuiveringswerk zou alleen al een artikel vragen. Volstaan moet worden met
erop te wijzen dat met al dit grotendeels zich nog in het pioniersstadium
bevindende werk de weg is geopend tot de isolering en zuivering van de
meest uiteenlopende plantevirussen. Dat deze pas geopende weg nog verre
van geëffend is behoeft geen nader betoog. Het bewandelen van deze weg
en daarbij het voortdurend beter plaveien ervan is echter gebiedende eis,
wil de virologische planteziektenkunde evenals de botanie en de mycologi-
sche en bacteriologische planteziektenkunde op wetenschappelijke wijze wor-
den bedreven, met als einddoel het scheppen van orde in de thans nog
bestaande chaos.

Viruskarakterisering

Na de virusisolatie begint pas het eigenlijke Linnaeaanse werk, namelijk dat
van de definitieve beschrijving der geïsoleerde virussen. Er bestaan thans
een aantal mogelijkheden om virussen in vele eigenschappen te bestuderen
en te beschrijven.

Reeds bij isolering van virussen verkrijgt men inzicht in een aantal *fysisch-
chemische eigenschappen*. Het waren immers onderlinge verschillen hierin
die zuivering mogelijk maakten. Genoemd moet worden de sedimentatiecon-
stante en het isoëlektrische punt, maar ook het moleculairgewicht. Verder-
gaand fysisch-chemisch en biochemisch onderzoek leidt tot gegevens over
het nucleïnezuurgehalte en over de chemische bouw van eiwit en nucleïne-
zuur, de twee belangrijke componenten van het virus. Dit laatste onderzoek
neemt tegenwoordig een grote vlucht. Het zal duidelijk zijn dat de thans
in de biochemie bestaande belangstelling voor problemen van eiwitsynthese,
nucleïnezuurmetabolisme en de rol van macromoleculen in het algemeen in
het metabolisme van de cel, stimulerend werkt op de biochemische karakter-
isering der macromoleculaire stoffen, waaronder de virussen. Ter beschrij-
ving van de intrinsieke viruseigenschappen wordt thans dan ook veel hulp
verwacht van de biofysica en van de biochemie, evenals dit in het voor-
gaande reeds het geval was met de viruszuivering. De betekenis van *beide*
takken van onderzoek voor de Linnaeaanse virologie kan dan ook niet ge-
makkelijk worden overschat.

Vervolgens komt de studie van de *morfologische eigenschappen* der virus-

deeltjes door middel van de elektronenmicroscop. Dit thans onmisbare hulpmiddel bij het virusonderzoek werd voor het eerst toegepast op tabaks-mozaïekvirus in 1939 door KAUSCHE et al.

Daar het doordringingsvermogen der elektronenstralen erg gering is, moet worden gewerkt met zeer dunne preparaten. Meestal bestaan deze uit opgedroogde virushoudende vloeistof aangebracht op een zeer dun vliesje van bijv. collodion op een uiterst fijn gaasje of een plaatje met een nauwe spleet. In de microscoop worden slechts waargenomen de verschillen in doorlatendheid van het preparaat voor de elektronen. Deze zijn in een onbehandeld preparaat slechts gering. In 1945 werd voor het eerst een methode toegepast om dit contrast te vergroten. Hierbij worden gedroogde preparaten in vacuüm zijdelings bestoven met uiterst fijne metaaldeeltjes, die een zeer geringe doorlatendheid voor elektronen hebben. Het ligt voor de hand dat deze „schaduwing” slechts effect heeft bij preparaten met reliëf, zoals bij virusdeeltjes op een overigens vlakke ondergrond. Van recenter datum is de z.g. negatieve kleuring met fosforwolframzuur, een stof met eveneens een geringe doorlatendheid voor elektronenstralen die zich niet hecht aan het eiwit der virusdeeltjes.

Het virus kan op verschillende wijzen op het vlies van de preparaathouder worden gebracht. Eerst meende men hiervoor de beschikking te moeten hebben over een gezuiverde virussuspensie om hiervan een klein druppeltje op het vlies te kunnen brengen. Tegenwoordig gaat men ook wel uit van verdund plantesap, dat bijv. met een vernevelaar in kleine druppeltjes kan worden verdeeld: „sproeimethode”. Op deze wijze komen echter ook normale korrelvormige bestanddelen in het preparaat terecht en deze methode leent zich dan ook doorgaans slechts voor staaf- of draadvormige virussen. Zeer eenvoudig is de „indoopmethode” van BRANDES (1957), waarbij het aangesneden zieke plantedeel gedurende enkele seconden met het snijvlak wordt gedoopt in een fijne druppel gedestilleerd water op het vlies van de preparaathouder. Gebleken is dat in veel gevallen bij het indopen juist de virusdeeltjes in de waterdruppel diffunderen. Voor bolvormige virussen is het nog steeds gewenst uit te gaan van gezuiverde suspensies, omdat deze tussen korrelvormige normale celbestanddelen meestal niet opvallen.

Met het oog op de beschadiging der virusdeeltjes, welke kan optreden bij indrogen en blootstellen aan vacuüm en elektronenbestraling, wordt nog steeds gezocht naar verfijning der technieken: bijv. de droogvriesmethode en de replicatechniek. Beide technieken hebben waardevolle gegevens opgeleverd over de uitwendige structuur van virusdeeltjes en aangetoond dat althans een deel der bolvormige virussen veelkantig is.

Ook kan men tegenwoordig met een ultramicrotoom uiterst fijne sneetjes planteweefsel maken en deze met de elektronenmicroscop bestuderen. Het weefsel moet echter vooraf snel gedood en gefixeerd worden. Ter verhoging van het contrast „kleurt” men de coupes wel met zuren van zware metalen, bijv. osmiumzuur en fosforwolframzuur. Zo is reeds virus in bepaalde cellen en weefsels aangetoond.

Inmiddels zijn, vooral dank zij de mogelijkheid van viruszuivering, talrijke

virussen met de elektronenmicroscopie bestudeerd. Daarbij is gebleken dat de vorm en grootte der deeltjes karakteristieke eigenschappen van het virus zijn en dat deze eigenschappen onafhankelijk zijn van de plantesoort waaruit de virusdeeltjes zijn gewonnen. Bovendien bleek er grote variatie in vorm en grootte al naar de virussoort te bestaan. Zo kennen wij tegenwoordig bolvormige of veelkantige virusdeeltjes, in grootte variërend van 16 tot ongeveer 110 $m\mu$, stugge staafvormige deeltjes van 55 tot 300 $m\mu$ lang bij 20—30 $m\mu$ dik, en zwak gebogen tot bochtige draadvormige deeltjes van 475 tot 1250 $m\mu$ lang en 10 tot 15 $m\mu$ dik.

Door de vooruitgang der techniek worden niet alleen bestaande methoden vergemakkelijkt, maar ook verfijnd. Tevens openen nieuwe technieken geheel nieuwe mogelijkheden. Zo neemt het aantal met de elektronenmicroscopie waarneembare morfologische eigenschappen steeds toe. Werden de kleine virussen oorspronkelijk alle als bolvormig opgevat, sinds 1953 blijkt bij een toenemende scherpte der elektronenmicroscopische beelden dat steeds meer virussen veelkantig zijn. Op deze wijze opende zich de mogelijkheid „bolvormige” virussen op grond van hun vorm te onderscheiden. Tevens doen zich reeds nieuwe mogelijkheden voor om structurele eigenaardigheden in het oppervlak der virusdeeltjes waar te nemen. Aldus verkregen gegevens blijken aan te sluiten bij die welke verkregen worden door röntgenonderzoek en chemisch onderzoek over de inwendige structuur van virusdeeltjes (zie bijv. KLUG en CASPAR, 1960).

Van onschatbare betekenis voor de virusonderscheiding is de *serologie* gebleken. Deze betekenis werd, nog voordat men erin geslaagd was virus zelf te isoleren, voor het eerst ontdekt in de Verenigde Staten (1927). Een onderzoekster spoot toen proefdieren met sap van mozaïekzieke tabaksplanten in. Deze bleken een serologisch actieve stof te bevatten welke ontbrak in gezonde tabaksplanten. Met het verkregen „antiserum” kon dus een zieke van een gezonde plant worden onderscheiden. Sindsdien is men er in geslaagd van allerlei plantevirussen antisera te bereiden. (Voor details moet worden verwezen naar VAN SLOGTEREN en VAN SLOGTEREN (1957) en naar MATTHEWS (1957).)

Het is begrijpelijk dat de antiserumbereiding eerst alleen maar gelukte voor die virussen welke met sap zijn over te brengen, dus die welke in uitgeperst plantensap nog actief zijn. Nadat men door moderne zuiveringstechnieken zuiverder viruspreparaten kon inspuiten, verkreeg men niet alleen sterkere antisera, maar slaagde men er tevens in antisera te bereiden van labiele virussen of van virussen die in de plant in te lange concentratie voorkomen. Zo wint met de verbetering van de virusisolering de serologie snel veld.

Daarnaast ondergaat echter ook de serologie als zodanig een ontwikkeling dank zij fundamenteel onderzoek. Het principe van de serologie is wel zeer eenvoudig, maar de praktische toepassing ervan stuit vaak op allerlei moeilijkheden. Dit geldt dan zowel de bereiding der antisera, dat wil zeggen de immunisering van het proefdier, als het *in vitro* aantonen van de serologische reactie. Zowel bij de *in vivo* als bij de *in vitro* reacties spelen weer talrijke factoren een rol, factoren die het gedrag der virusdeeltjes beïnvloeden. Ook

dit zijn weer factoren van fysisch-chemische (colloïdchemische) aard. Men spreekt dan ook wel van *immuno-chemie*. Het zal niet moeilijk zijn in te zien dat voor het zoeken naar nieuwe technieken op dit gebied veel specialistische kennis vereist is. Dank zij dit onderzoek krijgt de virologie echter voortdurend de beschikking over verfijndere, gevoeliger technieken, waardoor de serologie wint aan betrouwbaarheid en steeds geringer virusconcentraties kunnen worden aangetoond. Het zou te ver voeren nieuwe methodieken hier in detail te vermelden. Gewezen moet worden op de in 1954 te Lisse door VAN SLOCHTEREN Jr. (1955) ontwikkelde „micro-precipitatie-methode onder paraffine-olie” en de „gel-diffusie-methode”.

In de loop der jaren is de serologie één der belangrijkste hulpmiddelen gebleken bij de vaststelling der identiteit van plantevirussen. De bereiding van een specifiek antiserum wordt dan ook in steeds toenemende mate beschouwd als een essentieel onderdeel van de viruskarakterisering.

In ons land speelt het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek te Lisse bij de bereiding van antisera tegen virussen van bloembollen en aardappelen een zeer belangrijke rol. Het gebruik van de op grote schaal geproduceerde antisera bij de onderscheiding en herkenning van virusziekten voor de Nederlandse bloembollen- en pootaardappelteelt is reeds van grote betekenis geweest (zie bijv. VAN SLOGTEREN Sr., 1950).

Een nieuwe belangrijke stap is in Duitsland gemaakt door de bereiding van zeer geconcentreerde antisera. Hiermee bleek het (voor het eerst aan WETTER en QUANTZ, 1958) mogelijk niet alleen overeenkomst aan te tonen tussen stammen van één en hetzelfde virus, maar ook verre serologische verwantschap tussen virussen welke op grond van vorm en grootte van hun deeltjes enige overeenkomst doen vermoeden. Hiermee begint de serologie een nieuwe dimensie te krijgen. Over deze betekenis voor de virusclassificatie straks meer.

Virusclassificatie

Uit een oogpunt van overzichtelijkheid en naamgeving bestond reeds spoedig na 1920, toen snel het aantal bekende virusziekten begon toe te nemen, de behoefte aan een overzichtelijke indeling van de virusziekten. Uiteraard waren de eerste systemen gebaseerd op ziektebeelden, met alle verwarrende gevolgen van dien. Ze zullen hier niet worden opgesomd.

Nu echter steeds meer de mogelijkheid blijkt de virussen zelf naar hun z.g. intrinsieke eigenschappen te beschrijven is het mogelijk na te gaan wat de onderlinge overeenkomsten en verschillen zijn tussen de beschreven virussen. Dit maakt het mogelijk, evenals LINNAEUS 200 jaar geleden deed met zijn planten en dieren, de virussen systematisch te rangschikken naar de mate van hun verwantschap in vorm, grootte, bouw, chemische structuur en daarmee samenhangende eigenschappen (zoals de serologische). Nu nog slechts een gering aantal virussen is beschreven, weten wij nog niet precies welke eigenschappen of combinaties van eigenschappen de belangrijkste zijn bij de virusgroepering. Het „soortsbegrip” in de virologie is nog niet nauwkeurig te omschrijven. Dat wil zeggen dat we nog niet precies weten welke

criteria moeten gelden ter onderscheiding en begrenzing der systematische eenheden. Het is daarom allereerst noodzakelijk de virusinventarisatie voort te zetten. Geleidelijk zal daarbij ons inzicht verdiepen in de betekenis der waar te nemen eigenschappen voor de virussystematiek.

Inmiddels is reeds een eerste voorlopige indeling gemaakt van de bekende langwerpige virussen op grond van hun morfologie door BRANDES en WETTER (1959). Daarbij bleek dat virussen met bepaalde overeenkomsten in vorm en grootte tevens overeenkomsten vertoonden in andere eigenschappen, zoals hun bestendigheid tegen hitte of de wijze van overdracht. Op deze wijze was zelfs door een combinatie van eigenschappen een verdere indeling en opsplitsing mogelijk. Onlangs werd door toepassing van zeer geconcentreerde antisera gevonden dat vele, voorlopig in bepaalde groepen van het bovengenoemde systeem ondergebrachte virussen eveneens een, zij het zwakke maar toch duidelijk waarneembare, serologische verwantschap vertoonden (voor een recent overzicht zie bijgaande tabel van BRANDES, 1961). Door deze laatste vindingen wint het voorlopige systeem reeds aanmerkelijk aan waarde.

Deze serologische verwantschappen trekken bij het onderzoek thans veel aandacht. Zo werd van het door BOS en VAN DER WANT (1962) ontdekte vroeger-verbruiningsvirus van erwt (210 $m\mu$ lang), dat biologisch en morfologisch naast enige duidelijke verschillen veel overeenkomst vertoont met het ratelvirus van tabak (180 $m\mu$ lang), de verwekker van stengelbont bij aardappel, onlangs in ons instituut door MAAT gevonden dat het ook serologisch met het ratelvirus verwant is.

Op de hier geschetste wijze begint voor het eerst in de tot voor kort steeds toenemende wanorde zich een omlijning van orde af te tekenen, een orde die bij toenemend onderzoek zeker verder zal worden geperfectioneerd. Hierbij zal ongetwijfeld in de nabije toekomst tevens meer inzicht worden verkregen in de mogelijkheid tot een nadere definiëring van het „soortsbegrip” bij de virussen.

In hoeverre uit de morfologische verwantschap, waarop het voorlopige virus-systeem is gebouwd, het bestaan van een biologische verwantschap in de zin van afstamming kan worden geconcludeerd is nog een open vraag.

Bij de opsomming van de voor virusclassificatie belangrijke eigenschappen werd aan het begin van deze paragraaf reeds gewezen op de betekenis van de chemische structuur. Vooruitstrevende biochemici veronderstellen wel eens dat in de nabije toekomst, gezien de snelle vorderingen van het biochemisch virusonderzoek, bovenstaand, voornamelijk op morfologie en serologie gebaseerde schema, wellicht vervangen zal kunnen worden door een louter chemische classificatie. Om consequent te zijn zou ditzelfde dan, zij het met een toepassing in misschien iets verder verschiet, moeten worden geconcludeerd voor de plantaardige en dierlijke organismen. Deze zouden dan moeten worden ingedeeld naar de chemische bouw van hun erfelijke apparaat. Met een dergelijk systeem zou echter niet meer praktisch te werken zijn. Hetzelfde geldt voor de virussen. Herkenning gaat veelal gemakkelijker met behulp van morfologie en serologie of van biologische eigenschappen

dan aan de hand van de chemische structuur en samenstelling. Het biochemisch onderzoek zal echter wel een vervolmaking brengen van de reeds bestaande systemen en inzicht geven in de achtergrond van op andere gronden reeds geconcludeerde verwantschappen. Ook zal het ongetwijfeld nieuw licht kunnen werpen op het reeds genoemde probleem van de virusfylogenie.

Virusnomenclatuur

Nauw verband met de virusbeschrijving en de virussystematiek houdt het probleem van de nomenclatuur. Naamgeving zonder een omschrijving der desbetreffende eenheden en een onderlinge onderscheiding is immers niet mogelijk. Zolang in de plantevirologie geen afdoende en algemeen aanvaarde virusclassificatie bestaat, is er geen aanvaardbare oplossing mogelijk voor een afdoende systeem van virusbenamingen. Alle reeds ingevoerde of nog in te voeren andere wijzen van naamgeving voor virussen en virusziekten kunnen slechts de verwarring doen toenemen.

Niet alleen met een omschrijving en een onderscheiding der pathologisch actieve eenheden, maar eerst met een daarop gebaseerde vaste naamsaanduiding der omschreven eenheden, zal een einde kunnen worden gemaakt aan de thans heersende chaotische spraakverwarring.

Virusdiagnostiek

In de inleiding werd erop gewezen hoe moeilijk het is en hoe het vaak zelfs onmogelijk is om virusziekten te herkennen. Wanneer wij een overzichtelijk systeem van alle plantevirussen tot onze beschikking zullen hebben, zal het niet moeilijk meer zijn met behulp van een sleutel op dit systeem, namelijk een determinatietabel, de plaats van het onderhavige virus in dit systeem en daarmee ook de naam te bepalen. Ditzelfde wordt reeds 200 jaar lang gedaan voor planten en ruim 100 jaar voor de ziekteverwekkende organismen. Toepassing van deze Linnaeaanse werkwijze op virussen als verwekkers van ziekten betekent „etiologische diagnostiek”, diagnostiek van deze ziekten op grond van een herkenning van de verwekkers.

Ongetwijfeld zal het voortschrijden van de techniek in het algemeen en de verdere uitbouw van het virologisch onderzoek de wegen doen vinden tot vereenvoudiging van het isoleren, aantonen en waarnemen van het virus. Dit zal dan tevens de toepassing van virusisolering, biochemische bepalingen, elektronenmicroscopie, serologie en dergelijke mogelijk maken voor praktische diagnostiek. Ziehier één der belangrijkste doeleinden van veel thans nog fundamenteel virusonderzoek.

Literatuur

- Bary, A. de*, 1853: Untersuchungen über die Brandpilze und die durch sie verursachten Krankheiten der Pflanzen mit Rücksicht auf das Getreide und andere Nutzpflanzen. Berlin.
- Bawden, F. C., N. W. Pirie, J. D. Bernal en I. Fankuchen*, 1936: Liquid crystalline substances from virus-infected plants. *Nature* 138, p. 1051—1052.
- Beijerinck, M. W.*, 1898: Ueber ein Contagium Vivum Fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabakblätter. *Verh. Kon. Akad. Wetensch. A'dam* 65, p. 3—21.

- Black, L. M.*, 1940: Mechanical transmission of aster yellows virus to leafhoppers. *Phytopathology* 30, p. 2.
- Bos, L.*, 1963: Symptoms of virus diseases in plants. Pudoc, Wageningen.
- Bos, L. en J. P. H. van der Want*, 1962: Early browning of pea, a soil- and seedborne virus disease. *Tijdschr. Pl. ziekten* 68.
- Brandes, J.*, 1957: Eine elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis faden- und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelheimen. *Nachrichtenbl. dtshn. Pflanzenschutzd. (Braunsch.)* 9, p. 151—152.
- Brandes, J.*, 1961: Einige Bemerkungen über den Nachweis von Kartoffelviren mit Hilfe des Elektronenmikroskops. *Proc. 4th Conf. Potato Virus Diseases Braunschweig 1960*, p. 170—175.
- Brandes, J. en C. Wetter*, 1959: Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology* 8, p. 99—115.
- Iwanowski, D.*, 1892: Ueber die Mosaikkrankheit der Tabakpflanze. *Bull. Acad. Imp. Sci. St. Petersb. N.S.* III 35, p. 67—70.
- Johnson, J.*, 1927: The classification of plant viruses. *Agric. Exp. Sta. Univ. Wisconsin Res. Bull.* 76.
- Kausche, G. A., E. Pfankuch en H. Ruska*, 1939: Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Uebermikroskop. *Naturwissenschaften* 27, p. 292—299.
- Klug, A. en D. L. D. Caspar*, 1960: The structure of small viruses. *Rec. Adv. Virus Res.* 7, p. 225—325.
- Matthews, R. E. F.*, 1957: *Plant virus serology*. Univ. Press, Cambridge.
- Mayer, A.*, 1886: Ueber die Mosaikkrankheit der Tabak. *Landw. Versuchsstationen* 32, p. 450—467.
- Slogteren, D. H. M. van*, 1955: Serological analysis of some plant viruses with the gel-diffusion method. *Proc. 2nd. Conf. Potato Virus Dis. Lisse-Wageningen 1954*, p. 45—50.
- Slogteren, D. H. M. van*, 1955: Serological micro-reactions with plant viruses under paraffin oil. *Proc. 2nd. Conf. Potato Virus Dis. Lisse-Wageningen*, p. 51—54.
- Slogteren, E. van*, 1950: Serologie ter dienste van het virusonderzoek bij planten. *Meded. Dir. Tuinb.* 8, p. 688—702.
- Slogteren, E. van en D. H. M. van Slogteren*, 1957: Serological identification of plant viruses and serological diagnosis of virus diseases of plants. *Ann. Rev. Microbiol.* 11, p. 149—164.
- Stanley, W. M.*, 1935: Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco mosaic virus. *Science* 81, p. 644—645.
- Wetter, C. en L. Quantz*, 1958: Serologische Verwandtschaft zwischen Steinkleevirus, Stauchevirus der Erbsen und Wisconsin pea streak-Virus. *Phytopath. Z.* 33 p. 430—432.

Summary

LINNAEUS AND PLANT VIROLOGY

The number of virus diseases in plants is rapidly increasing. One of the first problems in controlling these diseases is their diagnosis. This is often an impossible task because of the confusion existing in their distinction. To solve this problem much can be learned from a similar confusion which existed some centuries ago in distinguishing plants and animals. The same difficulties were also encountered later in distinguishing contagious diseases caused by micro-organisms.

Credit is due to LINNAEUS who about 200 years ago began to create order out of the chaos of facts about plants and animals by purposefully sampling, describing, classifying and naming these organisms. Some 100 years ago fungi and bacteria were discovered as incitants of plant diseases. Thanks to the pioneering work of PASTEUR and KOCH it soon proved possible to apply the Linnaean procedure to the study of these plant diseases, thereby putting an end to the disorder and paving the way for *etiological diagnosis*. This diagnosis was based on characters of the incitants themselves instead of their variable effects on the hosts. Virus diseases were not discovered until the end of the 19th century, and the Linnaean

procedure did not seem suitable for distinguishing them. A clinical diagnosis based on symptoms is even more unreliable for virus diseases than for diseases caused by micro-organisms. Thus soon after 1920 an urgent need was felt for including facts about the viruses themselves in the characterization and distinction of virus diseases, although at that time these facts were obtained indirectly. This development led to the determination of virus infectivity in plant sap after dilution, ageing *in vitro*, and after treatment at different temperatures and with certain chemicals (the term physio-chemical properties should not be used in this connection). Facts about how the viruses are transmitted naturally and experimentally were soon added in order to draw a distinction between virus diseases.

Fortunately, the opinion is now slowly gaining ground that the intrinsic virus properties will be the only reliable basis for virus identification and classification. The first proof that these properties can be studied was the isolation of tobacco mosaic virus by STANLEY (1935) and its subsequent physical and chemical characterization. This breakthrough marked the beginning of the Linnaean period in plant virology. Application of the Linnaean procedures to viruses and virus diseases, however, creates special problems. They are due to the very special nature of viruses as compared to micro-organisms.

First comes *virus isolation*. This separation of viruses from normal cell components and from other viruses is based on physical and chemical differences. Hence the application of isolation techniques and the search for new methods requires specialized biophysical and biochemical knowledge. Sufficient information on the factors influencing the activity and stability of virus particles *in vivo* as well as *in vitro* is still lacking. Nevertheless the number of viruses that can be isolated with present methods is rapidly increasing. Among them are also viruses that are not normally sap-transmissible. Even with persistent insectborne viruses promising results have been obtained.

Virus isolation is followed by *virus description*. This characterization is based on morphological (size and shape), "true" physico-chemical, and serological properties.

Present day technological developments greatly facilitate a rapid increase of information on viruses. In the near future this will undoubtedly permit the grouping or *classification of viruses* in a Linnaean system according to the degrees of resemblance or "relationship" in the above-mentioned properties. Such a preliminary or tentative grouping will simultaneously help to define the *species concept*, a definition of which is essential for any classification. A promising tentative classification of elongated plant viruses was recently published by German workers (see table).

Virus nomenclature can be tackled only after a system of classification has been generally accepted. This will be the final step in the solution of one of the most important and intriguing problems in (plant) virology.

For practical application of these Linnaean procedures (etiological diagnosis) further improvement and simplification of existing techniques is wanted. To meet this need and for the invention of new techniques for the study of intrinsic virus properties still more fundamental research is required. The practical as well as scientific importance of this type of research can hardly be overestimated.