

PROEFSTATION VOOR DE GROENTEN- EN FRUITTEELT ONDER GLAS,  
TE NAALDWIJK.

db

Bibliotheek  
Proefstation  
Naaldwijk

$\frac{A}{3}$   
C  
13

Verslag over enkele bezoeken aan het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek  
in Lisse, 1948.

door:

Mej. Jannetje Camfferman.

Naaldwijk, 1949.

2243101

Verslag over enkele bezoeken aan het laboratorium voor bloembollen-  
onderzoek te Lisse.

a. Doel.

Het doel van deze bezoeken was, de techniek en de toepassing van de serologie in het onderzoek van plantenviren te leren. Daartoe ben ik eerst één week in Lisse geweest van 11 tot 16 October, daarna in November een dag (11 November), om reeds enkele reacties te doen.

24 Januari werd weer een bezoek gebracht aan het laboratorium te Lisse, nu speciaal i.v.m. het zuiveren van virus.

b. Principe van de serologie.

Tegen het einde van de 19e eeuw ontdekten enkele onderzoekers, dat het bloedserum van dieren, welke ingespoten waren met een niet dodelijke dosis van een bepaalde ziekte verwekkende bacterie, de eigenschap bezat, deze bacteriën te vernietigen. Men gaf hieraan de naam immuun serum of anti-serum.

Het doormaken van een ziekte gaat gepaard met het ontstaan of toenemen van stoffen in het bloed van de patiënt, die of de verwekker van de ziekte of zijn producten in hun pathologische werking remmen. Deze stoffen noemt men anti-stoffen of anti-bodies <sup>antistoffen</sup>

De stoffen, die deze anti-bodies doen ontstaan noemt men antigenen <sup>immuun stoffen</sup> <sup>immuunstoffen</sup>. d.i. dus de ziekteverwekker of zijn product. De vereniging van anti-bodies en antigenen wordt gevolgd door een aantal reacties, die in vitro kunnen worden waargenomen en op deze reacties berust de betekenis van de serologie, ook voor het virusonderzoek. Deze reacties zijn namelijk uiterst specifiek.

Ze kunnen ook in het onderzoek van plantenviren worden toegepast, sinds ontdekt is, dat dieren, meestal konijnen, welke ingespoten worden met sap van viruszieke planten, in hun bloedserum specifiek tegen deze virus gerichte anti-bodies produceren.

In dit onderzoek worden v.n.l. twee reacties gebruikt:

1<sup>o</sup>. de precipitatie reactie,

2<sup>o</sup>. de agglutinatie reactie,

terwijl een enkele keer de complementsbinding reactie gebruikt wordt.

c. Het verkrijgen van het serum.

De planten worden uitgeperst en het sap daarna 10 minuten gecentrifugeerd bij 5000 omwentelingen. Meestal is het sap dan voldoende helder. Slechts bij enkele planten moet langer gecentrifugeerd worden.

Het sap wordt intraveneus ingespoten in het oor van een konijn. Met een tussenruimte van enkele dagen wordt een toenemende hoeveelheid vloeistof ingespoten. Dit wordt + 9 maal herhaald. Na de laatste 3 inspuitingen wordt een bloedmonster afgenomen en de titer hierin bepaald (zie e). Is de titer niet gestegen de laatste keren, dan wordt het bloed afgenomen. Dit geschiedt onder narcose.

Het bloed wordt in de ijskast bij 0° C. bewaard. De volgende dag wordt het serum afgeschonken, terwijl de bloedkoek achterblijft.

#### d. Verzadigingsreactie van Castellani.

In ziek sap zijn zowel zieke als gezonde antigenen aanwezig. Er worden dus in het serum van het konijn anti-bodies tegen zieke en tegen gezonde antigenen gevormd.

Laat men nu het verkregen serum reageren met sap, dan zal altijd een reactie plaats vinden, of de plant nu ziek was of niet.

Het is echter de bedoeling, alleen een reactie te krijgen met sap, dat die virus antigenen bevat, waartegen het anti-serum is gemaakt. Om dit te bereiken maken we gebruik van de verzadigingsreactie van Castellani.

Het principe hiervan is de niet gewenste anti-bodies van te voren neer te slaan met het homologe antigeen (uit het gezonde sap) en het neerslag uit te centrifugeren. Dit moet gebeuren voordat één of andere reactie kan worden ingezet.

Bij een  $\frac{1}{2}$  cc gezond sap pipetteert men  $\frac{1}{20}$  cc van het te verzadigen serum. De inhoud wordt gemengd, 2 uur bij 37° C. bewaard en daarna één nacht op 0° C. gehouden. Om na te gaan of alles werkelijk verzadigd is wordt eveneens anti-gezond serum verzadigd. Nu worden met deze verzadigde sera reacties gedaan bij sap van verdachte planten volgens de methodes, beschreven onder e en f. Het verzadigde anti-gezond serum mag nu in geen enkel geval reacties geven, daar alle anti-bodies neergeslagen zijn.

#### e. De microprecipitatie reactie.

Toen de serologie pas gebezigd werd in de phytopathologie, gebruikte men de z.g.n. "macropraecipitatie reactie".

De precipitatie reactie is een reactie tussen precipitinogeen, d.i. antigeen en precipitine, de anti-bodie. Het precipitinogeen bevindt zich in helder gecentrifugeerd sap.

Ze geven samen een vlokkig neerslag.

De macroprecipitatie reactie geschiedde in buisjes van  $\frac{1}{2}$  cm doorsnede. Het nadeel van deze methode is, dat zoveel serum en sap tegelijkertijd verbruikt wordt.

Men is toen begonnen, de microprecipitatie reactie toe te passen, kortweg de "micro" genaamd. Hier wordt per proef ongeveer 40 x minder serum gebruikt. In 't kort komt de "micro" hierop neer.

Het verzadigde serum wordt gecentrifugeerd. Daarna wordt hiervan op een dekglasje een druppeltje gepipetteerd en hiernaast een druppeltje van het te onderzoeken sap. Met een klein roerstaafje worden deze druppeltjes gemengd. Daarna wordt het dekglasje met behulp van een paraffine-vaseline mengsel op een ringetje geplakt, dat met "velpon" of "forticol" op een objectglas is gekit.



Het voordeel van deze opstelling is, dat de eventueel gevormde vlokken naar het midden zakken en dus vrij snel te zien zijn. De objectglazen worden op rekken in de thermostaat bij  $37^{\circ}$  C. gezet en na verloop van een zekere tijd gecontroleerd. Deze tijdsduur is voor elk sap verschillend en wordt eerst nagegaan, door ieder uur te controleren, tot b.v. na 5 uur toe.

Deze controle geschiedt met een donkerveld microscoop. Als de reactie positief is ziet men een vlokking, welke aan wolken herinnert. Van te onderzoeken sap of serum worden meestal bepaalde verdunningen ingezet om te zien, hoe de concentratie van het precipitinoëen of precipitine is. Deze concentratie wordt uitgedrukt in de titer.

De titer is de grootste verdunning, waarbij nog juist een positieve reactie wordt verkregen. Er wordt precies opgetekend, of de reactie sterk of zwak is.

Soms lijkt het of bij sterkere verdunning de titer hoger wordt. Zonder verdunning verkrijgt men dan geen reactie en bij toenemende verdunning wel. Dit noemt men het pro-zône effect. Er is dan een verkeerde verhouding antigeen:antibody.

Is bij de verdunning  $1/640$  nog juist een reactie verkregen, dan noemt men dat de titer. Ze ligt dan echter tussen  $1/640$  en  $1/1280$ . Door andere verdunningen kan ze nauwkeuriger vastgesteld worden.

Soms komen z.g.n. spontane uitvlokkingen voor, vooral als het

plantermateriaal, waarvan uitgegaan is, oud is. Er treedt dan een vlokking op, welke niet het gevolg is van een reactie.

Er wordt dan ook altijd een reactie ingezet met een z.g.n. physiologische zoutoplossing, en het sap. De physiologische zoutoplossing wordt gebruikt in plaats van serum. Als hierin een vlokking optreedt is dit zeker een "spontane uitvlokking". De uitkomsten van de overige reacties zijn dan niet betrouwbaar. Na lange ervaring zijn deze vlokkingen wel te onderscheiden.

Zie voor de uitgewerkte methode recept

#### f. Agglutinatie reactie.

Deze reactie berust op een binding tussen het agglutinogeen en de agglutinine. De agglutinine doet b.v. in het bloed de rode bloedlichaampjes samenklonteren, in de plant de chlorophylkorrels.

Vermoedelijk zijn de agglutininen en precipitinen identiek en treden de laatste op, indien de stoffen zich in oplossing bevinden en de eerste, wanneer ze zich als een emulsie vertonen.

Voor deze reactie moet het serum een hoge titer tegen virus en een lage tegen gezonde planteneiwitten hebben, daar anders licht aangetaste planten geen reactie geven. Men kan dit verkrijgen door gezuiverd virus te gebruiken.

Deze reactie wordt uitgevoerd op objectglazen. Wat ziek of verdacht plantenmateriaal wordt uitgepers (niet gecentrifugeerd, omdat dan het bladgroen verloren gaat) en op het objectglas wordt hiervan een flinke druppel aangebracht. Hierbij wordt het serum in de bepaalde verdunningen gepipetteerd, de druppels worden door elkaar geroerd.

Hierna kan de reactie worden afgelezen, vaak met het blote oog en in ieder geval onder het microscoop (zie verder recept

Men ziet bij een positieve reactie de bladgroenkorrels samenklonteren.

#### g. Algemene opmerkingen over de methode en toepassing.

1°. Bij de microprecipitatie moeten alle te gebruiken ingrediënten volkomen helder zijn. Dit wordt door doelmatig verdunnen en centrifugeren verkregen.

2°. Daar bij de verzadigingsreactie van Castellani het volume toeneemt en de vaak toch al lage titer tegen het virus nog lager wordt, wordt deze wel ontlopen. Dit kan door het virus, waarmee men wenst te werken te inoculeren op planten, welke niet verwant zijn. Bij inspuiting worden dan geen anti-bodies tegen de eiwitten aan de planten, waarmee gereageerd moet worden

van deze planten gevormd.

Een andere methode is, het virus chemisch te zuiveren van de normale planteneiwitten. Er dient wel op gelet te worden, dat de verkregen virussuspensie geen zouten bevat, daar konijnen hierniet tegen kunnen.

3°. Met de micromethodes kan zowel de titer van plantensap als van serum nagegaan worden, terwijl bij de agglutinatie reactie voornamelijk het serumtiter kan worden bepaald, omdat bij verdunning van het sap de bladgroenkorrels te veel uit elkaar liggen.

#### Naschrift.

Voorlopig zal op de Proeftuin met de agglutinatie reactie moeten worden volstaan, daar voor de meer gevoelige precipitatie reactie een thermostaat van 37° C. en een centrifuge nodig zijn. Hiervoor zal getracht worden, tomaatmozaïekvirus op tabak over te brengen en daarna te zuiveren, zodat na inspuiting in het konijn een serum verkregen wordt, dat een hoge titer tegen zieke en een lage titer tegen gezonde antigenen heeft.

Januari 1949.

J. Camfferman.

CH.