

Algemene aspecten van het virusonderzoek

door

T. H. THUNG

Wanneer wij de revue laten passeren wat over de virusvermeerdering in het algemeen bekend is, dan zijn 3 critische stadia te onderscheiden:

- 1e. het *aanslaan* (in de literatuur o.a. aangeduid met attachment): het virus pakt aan het substraat en dringt hier binnen.
- 2e. de *latente periode* (vaak aangeduid met: dark phase): het in het substraat binnengedrongen virus of virusdeeltje is op geen enkele wijze aan te tonen.
3. de *vermenigvuldiging*: de verschijning van infectievrije partikels, die identiek zijn aan het in de cel gebrachte of gedrongen virusdeeltje.

Het aanslaan.

Dit is het meest demonstratief waar te nemen bij de bacteriophagen: onder de electronenmicroscop is het al of niet pakken te zien. Van de stoffen, die in bouillon voorkomen, bleek vooral l-tryptophaan het aanslaan of de adsorptie te bevorderen (RUTTEN, 1950).

Hierbij is de vraag of de invloed van de bewuste stoffen een beïnvloeding is van de phaag of van de bacterie. Een feit is, dat de toestand van de bacterie, bijv. het verouderen, het adsorberen bemoeilijkt. Verder kan een bepaalde phaag de toestand van de bacterie dusdanig beïnvloeden, dat een 2e ongelijksoortige phaag verhinderd wordt aan te slaan en tot vermeerdering in de bacterie te komen.

Wat betreft het aanslaan van plantenviren in de plantencel zijn geen directe bewijzen voorhanden. In het volgende is dit alleen als de waarschijnlijke gang van zaken voor te stellen. Het werk van KASSANIS te Rothamsted (KASSANIS, 1950) heeft aangetoond, dat de temperatuur van 36° C, aangewend op de planten vóór de inoculatie, de vermeerdering van verschillende viren in deze planten verhoogt en dat aanwending van deze temperatuur na de inoculatie de vermeerdering bemoeilijkt of vermindert. Dit is op te vatten als het bevorderen tegenover het geheel of gedeeltelijk verhinderen van het aanslaan van de virusdeeltjes op de ervoor geschikte plaatsen in de cel. Deze gedachte wordt ons door de volgende proef van BAWDEN & KLECZKOWSKI (1952) gesuggereerd: Bepaalde viren kunnen door ultra-violet licht worden geïnactiveerd, zodat ze in de plant gebracht geen zichtbare invloed uitoefenen. Mengt men deze geïnactiveerde viren met de overeenkomstige actieve viren en worden planten met dit mengsel geïnoculeerd, dan komt minder virusvermeerdering tot stand dan bij inoculatie met dezelfde hoeveelheid virus zonder toevoeging van geïnactiveerd virus.

De mogelijkheid is niet uitgesloten, dat dit laatste virus nog kan aanslaan op de juiste plaatsen in de cel (aangeduid als „sites”), waardoor het pakken van actieve virusdeeltjes op deze plaatsen onmogelijk wordt. Vermoedelijk pakken deze geïnactiveerde viruspartikels ook bij antilichamen in het homologe antiserum.

Het werk van KASSANIS verder vervolgende, blijkt dat men het tijdstip van het aanslaan van het virus kan bepalen. Door het blootstellen van de planten aan de temperatuur van 36° C op verschillende tijden na de inoculatie kan men nagaan, na welk tijdstip de vermeerdering niet meer wordt belemmerd. Dit zal dan het

tijdstip zijn, dat het aanslaan of de vestiging van het virus heeft bepaald. Van enkele viren van de mens en het dier heeft men meer gegevens verkregen betreffende het mechanisme van de virusvestiging. Men neemt hierbij de aanwezigheid van virusreceptoren aan de celwand aan. Onderzoekingen van o.a. DE BAAN (1950) rechtvaardigen de opvatting, dat specifieke factoren bij deze receptoren het al of niet aanslaan van een gegeven virus aan de celwand bepalen.

De latente periode.

In de literatuur wordt behalve van de „dark phase” hierbij ook wel gesproken van de „vegetative period”. Omdat ten onrechte hierbij onwillekeurig aan de tegenstelling van generatieve periode zou kunnen worden gedacht, zou men in plaats van „vegetative period” beter kunnen spreken van „vegeterende” periode.

Voor bepaalde viren, zoals enkele phagen, voor het tabaksmozaïek, voor het ROUS' sarkoom staat het vast, dat een zekere tijd na de inoculatie geen virus in het geïnoculeerde weefsel is aan te tonen.

BAWDEN en GENDRON hebben het verloop van de infectie met tabaksmozaïekvirus gedurende de eerste dagen nagegaan. Tabaksplanten werden geïnoculeerd met een suspensie, die overeenkomt met 5 mg virus per liter. De bladeren werden 1u, 6u, 24u en 48u na de inoculatie afgeplukt en het perssap serologisch op virus onderzocht. Na 1 uur was het nog aantoonbaar; na 24u niet meer. Daarna was het weer wel terug te vinden en in steeds grotere hoeveelheden naarmate de bladeren langer geleden geïnoculeerd waren.

CARR (Anonymus 1952) heeft in proeven met ROUS' sarkoom bewezen, dat het virus te herwinnen is van de poot van een kip, wanneer het spierweefsel kort na de injectie geëxtraheerd wordt.

Na 6 uur kan het niet meer worden teruggevonden, maar na 66 uur kan het in grotere hoeveelheid worden verkregen dan waarmee werd ingespoten. Bij de phaag bestaat deze latente periode uit het overgaan van het nucleïnezuurdeel van het virusdeeltje in het bacterie-lichaam kort na het hechten van de phaag, terwijl het proteïnedeel als een huidje aan de buitenkant van de bacterie achterblijft.

De vermenigvuldiging.

Voor de phaag T2 van *Escherichia coli* is vastgesteld, dat het bovenvermelde nucleïnezuurdeel in andere perioden tot vermeerdering komt dan de proteïnen, die later de omhullende laag zullen vormen.

Twee phagen, die door ultraviolet licht gedeeltelijk geïnactiveerd werden, kunnen, in een bacteriecel gebracht, het aanschijn geven van een nieuwe phaag die een combinatie van eigenschappen van de twee oorspronkelijke phagen bezit. De veronderstelling is, dat een phaag uit verschillende genetische eenheden is opgebouwd. Door het ultraviolet licht kan een deel dezer eenheden geïnactiveerd worden en komen de resterende eenheden tot recombinatie.

Wat de plantenviren betreft, hiervan is het mechanisme van de opbouw nageenog niet bekend. Wel kan men waarnemen, dat bij het tabaksmozaïekvirus een deel van de gevormde viruspartikels vastgelegd wordt in de vorm van celinsluitels, zoals de kristallen, die reeds bij zwakke vergroting zijn waar te nemen. Zeer waarschijnlijk blijft een ander deel in circulatie, waarbij vermoedelijk naast opbouw ook afbraak plaats vindt. Deze afbraak zou o.a. bij verouderende weefsels in belangrijker mate kunnen plaats hebben dan de opbouw aangezien „the general level

of infectivity" in het oude weefsel lager is dan die van het weefsel in krachtige groei.

Nu moet men in dit verband onderscheid maken tussen de stabiele en de onstabiele viren, waaronder men respectievelijk verstaat de viren, die lange tijd hun activiteit bewaren en die, welke spoedig hun activiteit verliezen. Voor de stabiele viren is vastgesteld, dat er na een aanvankelijke periode van toeneming van virusdeeltjes een tijd aanbreekt, waarin de concentratie aan actieve virusdeeltjes nagenoeg constant blijft, totdat door bepaalde factoren zoals reeds is vermeld bij het verouderen van de betreffende weefsels andere omstandigheden zoals afbraak gaan overwegen. De onstabiele viren gaan, wat de concentratie van de actieve deeltjes betreft, na het bereiken van een maximum achteruit, waarbij uiteindelijk slechts zeer geringe hoeveelheden actief virus meer in de cel zijn aan te tonen.

Berust deze achteruitgang van de hoeveelheid actief virus ook hier op afbraak, d.w.z. een vernietiging van virusdeeltjes, waarbij kleinere bouwstenen vrijkomen, of gaat de activiteit van een groot aantal viruspartikels verloren omdat bepaalde actieve groepen aan het virusdeeltje op de één of andere wijze geblokkeerd worden, zonder dat er eigenlijk veel aan het deeltje zelf verandert?

Dit laatste is een belangrijk punt, omdat men hierbij kan denken aan het ontstaan van inactiverende stoffen in de geïnfecteerde plant. Er zijn in de laatste tijd gegevens verzameld, o.a. door GILPATRICK & WEINTRAUB (1952), die wijzen op het optreden van dergelijke stoffen.

De verschijning van grotere hoeveelheden virus in de plantencellen enige tijd na de inoculatie, dient nader besproken te worden. De normale stofwisselingsprocessen worden, nadat het virus aangeslagen is, meer of minder sterk omgebogen in de richting van de vorming van het abnormale virus-eiwit.

MARKHAM & SMITH (1949) vonden, dat er bij de vorming van het „turnip yellow mosaic" virus een eiwitbestanddeel ontstaat, dat in vele opzichten op het virus lijkt, echter niet infectieus is. Dit eiwit komt niet in gezonde planten voor. TAKAHASHI & ISHII (1953) toonden de aanwezigheid van een ander eiwit naast het virus aan in de electrophorese-diagrammen van het sap van mozaiekzieke tabaksplanten. Na isolatie bleek dit eiwit ook geen infectieusiteit te bezitten. De vraag komt op of wij in deze gevallen te maken hebben met nog niet voltooide virusdeeltjes. Of zouden we juist te doen hebben met afbraakstoffen ontstaan uit de afbrokking van viruspartikels?

In deze opvatting van het ontstaan van viren als product van bepaalde enzymatische processen van de cel, passen verschillende waarnemingen, die wijzen op de mogelijkheid van de beïnvloeding van dusdanige processen door de toestand van de cel te veranderen. Ze heeft YARWOOD (1952) aangetoond, dat meer of mindere waterrijkdom, waar te nemen als meer of mindere turgescentie, direct de hoeveelheid van het ontstane virus beïnvloedt. Frisse bladeren doen minder virus ontstaan dan iets slappere bladeren. Dezelfde auteur (1953) vermeldt, dat hij bladeren gemakkelijk kon infecteren wanneer hij ze van te voren aan hoge druk had blootgesteld.

JANSSEN (1940) heeft op de regelmatige bouw van de virusdeeltjes de aandacht gevestigd. Hij heeft een hypothese opgesteld, die het schlabloonmatige in de reproductie van de bouwstoffen van elk deeltje tot basis heeft. De gelijke

onderdelen zouden als het ware aan de lopende band ontstaan; deze matrijzen-hypothese zou volgens JANSSEN ook gelden voor het ontstaan van normale eiwitten. Door een discolatie in de kern, die als fabriek voor de matrijzen fungeert, zijn bij virusinfecties afwijkende matrijzen ontstaan; deze vormen nu viruseiwitten in plaats van normale eiwitten.

De matrijzen-theorie is in de laatste tijd voor het ontstaan van plantenviren nog al eens ter sprake gekomen (template-hypothesis).

Het meeste is thans bekend over de synthese van bacteriophagen; men zie hiervoor het artikel van HERSHEY (1953). De gegevens, die men verkregen heeft, wijzen sterk in de richting van een opbouw van nucleïnezuur naast een synthese van het proteïne-deel van het bacterievirus. Het ziet er naar uit, dat kort voor het ontstaan van actieve virusdeeltjes een combinatie van nucleïnezuur en proteïne optreedt.

Merkwaardig is, dat de kern van de phaagdeeltjes geheel of overwegend uit nucleïnezuur bestaat en dat slechts dit deel na adsorptie van de phaag aan de bacterie de bacteriecel binnendringt. Het proteïne-huidje van de phaag blijft buiten de cel, doch bij de productie van phaagdeeltjes wordt dit proteïne toch in de bacteriecel gesynthetiseerd.

Literatuur

1. Anonymous: Progress of Cancer Research, Nature, 170: 515—518, 1952.
2. BAAN, P. DE: Haemagglutinatie door neurotrope virussoorten, Diss. Leiden, 1950.
3. BAWDEN, F. C. and A. KLECZKOWSKI: The behaviour of some plant viruses after exposure to ultraviolet radiation, J. Gen. Microb., 8: 145—156, 1952.
4. GILPATRICK, J. D. and M. WEINTRAUB: An unusual type of protection with the carnation mosaic virus, Science, 115: 701—702, 1952.
5. HERSHEY, A. D.: Intracellular phases in the reproductive cycle of bacteriophage T₂, Ann. Inst. Pasteur, 84: 99—112, 1953.
6. JANSSEN, L. W.: Viruseiwitten en hun productie door de cel, Nederl. Tijdschr. Geneesk. 84: 3220—3234, 1940.
7. KASSANIS, B.: Some effects of high temperature on the susceptibility of plants to infection with viruses, Ann. appl. Biol. 39: 358—369, 1952.
8. MARKHAM, R. and K. M. SMITH: Studies on the virus of turnip yellow mosaic, Parasitology 39: 330—342, 1949.
9. RUTTEN, F. J.: De invloed van sulfanilamide op de vermenigvuldiging van bacteriophagen, Diss. Utrecht, 1950.
10. TAKAHASHI, W. N. and M. ISHII: A macro molecular protein associated with tobacco mosaic virus infection: its isolation and properties, Am. J. Bot. 40: 85—90, 1953.
11. YARWOOD, C. E.: Deleterious action of water in plant virus inoculations, Nature, 169: 502, 1952.
12. YARWOOD, C. E.: Pressure effects in fungus and virus infections, Phytopathology, 43: 70—72, 1953.

Summary

Three critical stages are pointed out during the virus multiplication.

1. The attachment: The virus becomes attached to the substrate. Most data on this point are obtained from studies of the bacteriophages and of several animal viruses. This attachment is influenced by several substances in the bacterial medium, e.g. l-tryptophane. The penetration of the content of the bacteriophage into the bacterium occurs soon after attachment is demonstrated.

Although there is no direct evidence of attachment of plant viruses to the plant cell still the probability deduced from several data is great.

2. The dark phase, also called the vegetative period: The virus or virus part that has penetrated the cell for a short period can not be demonstrated. With tobacco mosaic virus this occurs after about 24 h after inoculation; with ROUS' sarcoma after about 6 h.
3. The multiplication: The appearance of many infective particles identical to those introduced. With tobacco mosaic virus this is the case after about 2 days and with ROUS' sarcoma after about 66 h after inoculation.

With plant viruses 2 types are demonstrated: the stable and the unstable group. In the last case the concentration in the plant decreases after a certain time.

The multiplication of viruses is thought to be the result of enzymatic processes of the living cell. Thus anything influencing these processes will effect the quantity of new virus particles as also the appearance of mutations and the possibility of inactivating the virus in the cells.

Wageningen, Binnenhaven 4A.

Virusziekten bij Insecten

door

A. D. VOÛTE (ITBON)

Tijdens het IXe Internationale Entomologische Congres in Amsterdam bleek, zeer tegen de verwachting, onder de Canadese entomologen een groot enthousiasme te bestaan voor de virologische bestrijding van insectenplagen. Men bleek aldaar belangrijke resultaten te hebben bereikt en men was bezig met het bouwen van een laboratorium, speciaal voor de bosbouwsector, waarin het onderzoek naar de insectendodende viren krachtadig ter hand zou worden genomen.

Een dergelijke enthousiasme is er meer geweest, wanneer het er om ging insecten te bestrijden met behulp van ziekteverwekkende organismen. Wij denken daarbij o.m. aan de grote verwachtingen destijds gewekt door het werk van D'HERELLE met de bacterie *Coccobacillus acridiorum*, die in staat was sprinkhanen te doden. Maar al te vaak is het enthousiasme gevolgd door een teleurstelling, omdat het niet mogelijk bleek onder de in het veld heersende omstandigheden voldoende zekerheid te hebben, dat de desbetreffende organismen met succes zouden kunnen worden gebruikt. Wanneer wij denken aan de biologische bestrijding van insectenplagen, dan is eigenlijk slechts bij het gebruik van parasitoiden — sluipwespen en sluipvliegen — en van predatoren sprake van een groot aantal goed geslaagde bestrijdingsgevallen, terwijl wij mogen verwachten, dat dit aantal zeker nog zal worden vergroot, wanneer meer fundamenteel onderzoek zal kunnen worden uitgevoerd. Bij schimmels en bacteriën zijn de resultaten tot dusverre mager. Klimaat, virulentie van de ziekteverwekker, toestand en weerstandsvermogen van de gastheer en de relaties hiertussen blijken de werking te bepalen en onze kennis hiervan is in den regel niet voldoende om met succes het