



# **Het probleem der actieve immunisatie van planten tegen *Pseudomonas tumefaciens* Smith en Town**

<https://hdl.handle.net/1874/321138>

*Ag. 192, 1935.*

HET PROBLEEM DER ACTIEVE  
IMMUNISATIE VAN PLANTEN  
TEGEN PSEUDOMONAS  
TUMEFACIENS SMITH  
EN TOWN.

H. G. P. DUYFJES

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.







HET PROBLEEM DER ACTIEVE IMMUNISATIE  
VAN PLANTEN TEGEN PSEUDOMONAS TUME-  
FACIENS SMITH EN TOWN.



*Diss. Utrecht 1935*

# HET PROBLEEM DER ACTIEVE IMMUNISATIE VAN PLANTEN TEGEN PSEUDOMONAS TUME- FACIENS SMITH EN TOWN.

## PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN  
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE  
AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT  
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS  
Dr. H. BOLKESTEIN, HOOGLEERAAR IN DE  
FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBE-  
GEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN  
SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE  
BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER  
WIS- EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN  
OP MAANDAG 8 JULI 1935, DES  
NAMIDDAGS TE 5 UUR

DOOR

HENDRIK GERARD  
PIETER DUYFJES  
GEBOREN TE FORT DE KOCK

BAARN — HOLLANDIA-DRUKKERIJ N.V. — 1935

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.





## VOORWOORD

Nu ik aan het einde van mijn studie ben, wil ik gaarne allen, die mij daarbij geholpen hebben, danken.

Hooggeleerde *Westerdijk*, Hooggeachte Promotor, dit geldt in de eerste plaats U. De tijd dien ik in Baarn doorbracht, zal mij als een mooie herinnering bijblijven.

Ik stel de groote vrijheid die U mij bij dit onderzoek liet zeer op prijs en in het bijzonder dank ik U voor de tegemoetkomendheid, die ik bij de snelle afwerking van mijn proefschrift van U mocht ondervinden.

Hooggeleerde *Went*, zeer veel heb ik van U geleerd, en daarvoor betuig ik U hier mijn groote dank.

Hooggeleerde *Pulle*, het begrip dat U mij van de plantensystematiek hebt bijgebracht stel ik op hoogen prijs. Zeer genoe-gelijke herinneringen bewaar ik ook aan de excursies naar onze hoogvenen, die ik onder Uw leiding mocht meemaken.

Hooggeleerde *Jordan*, aan Uw onderricht heb ik een helder inzicht te danken in vele algemeene problemen en dit heeft mijn gedachten verdiept, iets waarvoor ik U niet erkentelijk genoeg kan zijn.

Hooggeleerde *Nierstrasz*, Uw colleges blijven mij steeds in de aangenaamste herinnering.

Hooggeleerde *Koningsberger*, tot mijn groote spijt kon ik door omstandigheden niet nader met U kennismaken.

Zeergeachte Heer *van Luyk*, wat U als raadsman in de meest verschillende zaken voor een practicant beteekent, is niet makkelijk uit te drukken. Ik ben U buitengewoon erkentelijk voor Uw kritiek en behulpzaamheid.

Zeergeachte Heer *Florschütz*, het was een prettige tijd, toen U mij in het veenonderzoek inleidde. Ik dank U voor het vele belangwekkende, dat ik van U leerde.

## VI

Hier is het ook de plaats mijn vrienden, in het bijzonder die, waarmee ik zoo veel moois beleefd heb in het huis op de Oude Gracht, mijn warmen dank uit te spreken voor alles wat zij voor mij gedaan hebben.

Liselotte, al zal je het zeker niet goed vinden, toch wil ik je hier bedanken voor den buitengewoon grooten steun, die jij voor mij bent geweest bij het werk!

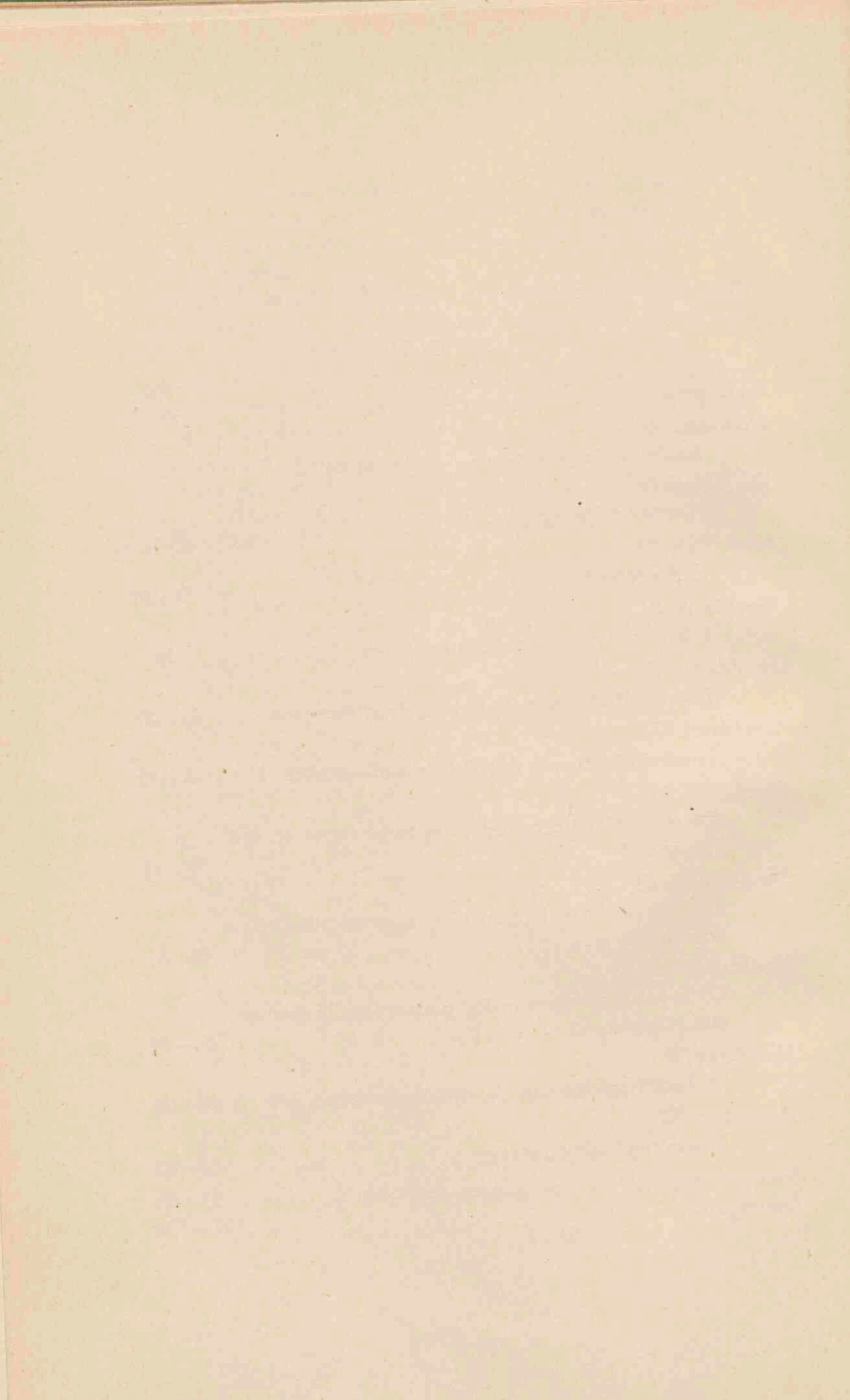
Allen die mij verder nog zoo behulpzaam zijn geweest bij het samenstellen van dit proefschrift zeg ik hier mijn hartelijken dank.

Het laboratoriumpersoneel ben ik zeer erkentelijk voor de bijzondere hulpvaardigheid.

Ten slotte rest mij nog de aangename plicht de Stichting „Willie Commelin Scholten” dank te betuigen voor de gastvrijheid, die zij mij heeft verleend.

## INHOUD

	Pag.
Inleiding . . . . .	1—2
Hoofdstuk I	
Kritische bespreking van de literatuur . . . . .	3—7
Hoofdstuk II	
Materiaal en methodiek . . . . .	8—11
Hoofdstuk III	
Oriënteerende proeven . . . . .	12—19
Hoofdstuk IV	
Inleiding tot de immunisatieproeven . . . . .	20
Hoofdstuk V	
Immunisatieproeven bij <i>Bryophyllum crenatum</i> . . . . .	21—27
Hoofdstuk VI	
Immunisatieproeven met <i>Pelargonium</i> -stekken . . . . .	28—38
Hoofdstuk VII	
De invloed van een reeds aanwezige tumor op een her-infectie . . . . .	39—45
Hoofdstuk VIII	
Invloed van meerdere, gelijktijdig groeiende tumoren op elkaar . . . . .	46—65
Hoofdstuk IX	
Over de localisatie van <i>Ps. tumefaciens</i> in planten met tumoren . . . . .	66—72
Hoofdstuk X	
De bacteriophag van <i>Ps. tumefaciens</i> stam 245 . . . . .	73—88
Hoofdstuk XI	
Algemeene beschouwingen . . . . .	89—92
Samenvatting van de voornaamste resultaten . . . . .	93—96
Literatuurlijst . . . . .	97—100



## INLEIDING

Het probleem van de actieve immuniseering der planten houdt in de laatste jaren de phytopathologen hoe langer hoe meer bezig.

Alvorens ik tot een bespreking van de literatuur en de door mij als bijdrage tot dit probleem verrichte proeven overga, lijkt het mij goed de vraag te beantwoorden of een experimenteele, actieve immuniseering van planten in principe mogelijk te achten is.

Een bezwaar, dat velen zullen aanvoeren is, dat de plant geen gesloten vaatstelsel bezit en ook voor het overige niet als een geheel reageert, zooals een dier.

De tegenstanders van de invoering der immunisatiebegrippen in de botanie verstaan dus onder immunisatie in de eerste plaats een immunisatie van de plant als geheel.

Dit lijkt mij niet juist. Wanneer men bijv. zou kunnen aantonen, dat een plant als reactie op een parasiet, die men er in brengt, op de infectieplaats stoffen vormt, die deze parasiet dooden of in den groei verhinderen, dan is dit m.i. reeds een voorbeeld van een actieve afweerreactie van de cellen, die deze stoffen geproduceerd hebben. En dezen vorm van locale immuniteit bij planten zal men waarschijnlijk vaak vinden, waar een plant een parasiet binnen bepaalde grenzen houdt, zonder dat men mechanische of andere, van te voren reeds aanwezige belemmeringen voor de indringer kan ontdekken.

Zeker aangetoond zijn deze locale afweerreacties bij het „symbiotische” proces, dat zich in orchideeënwortels afspeelt.

Met groote mate van waarschijnlijkheid zijn ze waargenomen in de wortelknolletjes van Leguminosen.

In de tuberkels van de olijf, veroorzaakt door *Bacterium Savastanoi*, wordt een stof gevormd, die deze bacteriën agglutineert.

Hetzelfde wordt aangenomen voor de tumoren, verwekt door *Pseudomonas tumefaciens*.

Natuurlijk moet, indien men in planten „afweerstoffen” meent te

constateeren, de interpretatie van hun ontstaan zeer voorzichtig gebeuren. Het is n.l. bekend, dat stoffen in planten voorkomen, die geheel het karakter van afweerstoffen bezitten maar niet specifiek werken. Deze stoffen, die steeds in die planten optreden en dus niet gevormd zijn tengevolge van het een of andere parasitaire proces, kunnen misschien met soortgelijke stoffen in bloedserum van dieren vergeleken worden.

Gezien bovengenoemde gevallen, die men in de natuur waar kan nemen, is het niet uitgesloten te achten, dat men planten kunstmatig zou kunnen immuniseeren, door er toxinen van de parasieten op in te laten werken. Wellicht kan men het doel beter bereiken door de planten te besmetten met verzwakte cultures van de schimmels of bacteriën.

Het bovenomschreven standpunt tegenover het immuniteitsprobleem, dat wordt ingenomen door Carbone en Arnaudi, G ä u m a n n en anderen, lijkt zeer aannemelijk. De beide eerstgenoemde auteurs zijn echter wel wat snel geneigd, om in de resultaten van proeven of slechts in gering aantal of zonder voldoende controles genomen, de bewijzen van specifiek immunitaire reacties te zien. Verder gaan zij m.i. ook te gauw over tot de conclusie, dat de door hen waargenomen verschijnselen het gevolg zijn van een de geheele plant doortrekkende afweerreactie. De meeste uitkomsten, die zij op dit gebied hebben gepubliceerd, kunnen even goed verklaard worden door aspecifieke invloeden aan te nemen.

Het is dus het doel van dit onderzoek na te gaan, of het mogelijk is, de gevoeligheid van planten voor parasieten experimenteel te verlagen, en of met eenige waarschijnlijkheid aan te toonen is, dat deze resistentieverhoging van de plant berust op de vorming van stoffen, die direct op de parasiet inwerken.

Dat *Pseudomonas tumefaciens* hier als parasiet werd gekozen, geschiedde ten eerste, omdat het mij naar aanleiding van de verschijnselen, die zich voordoen in Leguminosenknolletjes en Olijftuberkels een veelbelovend object leek en ten tweede, omdat dit een parasiet is, die een scherp begrensde, gemakkelijk te meten infectie veroorzaakt.

## HOOFDSTUK I.

### KRITISCHE BESPREKING VAN DE LITERATUUR

Tot beter begrip van de door mij genomen proeven volgt in dit hoofdstuk een kort overzicht van die onderzoeken, welke zich met het immuniteitsprobleem tegen *Pseudomonas tumefaciens* bezighouden.

Reeds E. F. Smith (1911) en Brown (1923) was het opgevallen, dat planten, die al een gezwel droegen, zich verzetten tegen een tweede infectie. De gal zou in dit geval kleiner worden. Smith gaat er echter niet dieper op in, daar hij vermoedt, dat de bacteriestam zijn virulentie verloren had bij de reinoculatie. Soortgelijke proeven zijn ook door Arnaldi (1925) uitgevoerd, waarbij hij constateert, dat reinfecties slecht lukken, vergeleken met infecties op controleplanten. Deze proeven worden echter gedaan met een zeer gering aantal planten. Verder wordt hoegenaamd geen rekening gehouden met factoren, die een schijnimmunitet zouden kunnen wekken en die natuurlijk bij dezen proefopzet aanwezig zijn. Men behoeft alleen maar te denken aan de groeiremmingen, die een plantendeel door de vorming van een gezwel ondergaat.

Later zijn dergelijke proeven gedaan door Redaelli (1934) met *Stapelia*. Ook deze auteur vindt geringeren groei van de gal wanneer geïnfecteerd wordt in de buurt van een reeds aanwezigen tumor. Dit schrijft hij toe aan verworven immuniteit, zonder echter bewezen te hebben, dat hier geen specifieke factoren (dus niet-immunitaire reacties) een rol hebben gespeeld. Overigens is het aantal planten waarmee hij werkte slechts gering.

De tot nu toe vermelde onderzoekers denken voor een verklaring



van hun proefuitkomsten aan actief gevormde afweerstoffen. Israïlsky (1926, 1927), Chester (1933), Gäumann (1933) e.a. zien deze dingen in een ander licht. Israïlsky en Chester n.l. vinden, dat de gebruikte bacteriestam besmet was met een bacteriophage. Deze wordt door hen geïsoleerd uit de gezwellen en door Chester bovendien uit stengelstukken van planten, die tumoren droegen.

Israïlsky (1927) deed inoculatieproeven, waarbij hij de bacteriophage — die hij uit de tumoren had geïsoleerd — al of niet mengde met de bacteriën welke voor de infectie waren bestemd. De bietenkiemplanten, die Israïlsky voor deze proeven gebruikte, kregen inderdaad minder gezwellen, wanneer zij geïnoculeerd werden met bacteriën + phage, dan met bacteriën alleen.

Chester heeft geen experimenteel onderzoek gedaan naar een eventuele rol van de bacteriophage bij de immuniteitsverschijnselen, zooals die door Smith, Carbone en Arnaudi, Redaelli e.a. werden geconstateerd, doch hij acht het niet onwaarschijnlijk, dat deze verschijnselen te verklaren zijn door het diffundeeren van de phage uit de tumoren naar boven of beneden. Deze phage zou de infectie tegengaan. Voor zoover dat uit zijn slotconclusies is op te maken, denkt hij aan een „passieve” immuniteit, waarbij dus de plant geen actieve rol speelt.

Gäumann (1933) geeft een andere interpretatie van Chester's resultaten. Hij vat de phage, welke door Chester werd geïsoleerd op als een product van het parasitaire proces, dat zich in de plant afspeelt. Het schijnt, dat hij de phage wil zien als een door de plant gevormde afweerstof.

Een dergelijke opvatting vindt men bij Israïlsky (1926, pg. 240). „Auf Grund dieses faktischen Materials haben wir demnach einigen Grund zu behaupten, dass im gegebenen Falle der Bakteriophage sich bei der Symbiose der Pflanze und der Bakterien gebildet hat, wobei die letzteren eine parasitische Rolle bei dem Verhältnisse zur Wirtspflanze spielen und dass die Bearbeitung der mit dem Phänomen d'Herelle's verknüpften Fragen eine grosse Bedeutung für das Studium der Immunität der Pflanzen haben kann.”

Israïlsky komt tot deze conclusie, daar hij uit den inoculatiestam van *Pseudomonas tumefaciens*, dien hij gebruikt had, geen

phaag kon isoleeren. Evenwel verliest deze bewijsvoering alle kracht, daar hij later (1927) vindt, dat oude cultures van dezen zelfden stam wel phaag bevatten.

Aangezien dus zoowel bij Chester als bij Israilsky de inoculatiestammen reeds met phaag besmet waren, lijken mij de opvattingen van Israilsky en Gäumann in verband met het ontstaan van de phaag in de tumoren onwaarschijnlijk. Deze is er natuurlijk ingekomen tegelijk met de geïnoculeerde bacteriën.

Hoe zou men zich dan echter het mechanisme van een eventueel beschermende werking van deze phaag moeten voorstellen? Dit zal al naar omstandigheden verschillen. Voor het geval dat een reeds aanwezig gezwel een nieuwe infectie vertraagt of verhindert, moet men of een virulentieverhooging van de phaag of een resistentievermindering van de bacterie aannemen. Beide veranderingen moeten onder invloed van de plant tot stand komen.

Al roept men dus de phaag te hulp, dan nog schijnt het mij onmogelijk een dergelijk proces te verklaren zonder de plant in deze hypothese een actieve rol te laten spelen.

Met deze verklaringsmogelijkheden moet men natuurlijk rekening houden. Evenwel ook de hier volgende factoren dienen onderzocht te worden.

Een tumor remt waarschijnlijk, zoo al niet den groei van de geheele plant, dan toch die van het plantendeel, waarop hij zich bevindt. Een tweede inoculatie in de buurt van de eerste infectie zou dus wel eens minder goede gezwellen kunnen opleveren tengevolge van deze groeibelemmering.

De groeivertraging van het plantendeel zelf moet te constateeren zijn door meting. Waar zij door veroorzaakt wordt, blijft onverklaard. Het kunnen vele oorzaken zijn (tekorten aan auxine, bios, voedingsstoffen enz.).

Het is evenwel duidelijk, dat resultaten, die zich alleen baseeren op metingen der gezwellen, in verband met het bovenstaande weinig zeggen.

Andere factoren, die den schijn van immuniteit kunnen verwekken, zijn geringe verschillen in ouderdom van de geïnoculeerde plantendeelen.

Verder hebben Stapp en Bortels (1931) geconstateerd dat bloeiende of vruchtzettende planten kleinere tumoren geven dan die,

waarvan men steeds de bloemknoppen afsnijdt. Nadere gegevens over deze proeven vindt men op pg. 17. Op het zoo juist genoemde verschijnsel lijkt het gedrag van de bacteriën in wortelknolletjes van Leguminosen. Volgens Cappelletti wordt n.l. de ontwikkeling van deze bacteriën plotseling geremd, wanneer de planten gaan bloeien.

Resumeerende kan men dus ter verklaring van den vertraagden kankergroei bij reinoculatie, geconstateerd o.m. door Arnaud, de volgende mogelijkheden aanvoeren:

I. De 1ste kanker werkt vertragend op den groei van de plant. Hierdoor groeit een herinfectie eveneens langzamer.

II. Er is niet voldoende op gelet, of proef- en contrôleplanten even oud zijn, iets waar men vooral bij klein plantenmateriaal groote fouten mee kan maken.

III. Aangenomen dat punten I en II gecontroleerd zijn en dat proef- resp. contrôleplanten zich wat dat aangaat in gelijke condities bevinden, moet men wel aannemen, dat de 1ste kanker op de een of andere wijze de bacteriën op de tweede inoculatieplaats in hun groei remt (IIIa) of hun uitwerking vermindert (IIIb).

IIIa. Remming van de bacteriën in hun groei kan tot stand komen door diffusie van stoffen uit het kankerweefsel in het aangrenzende gezonde weefsel. Deze stoffen kunnen zijn:

1. Specifieke, door de plant gevormde afweerstoffen.

2. Niet specifieke, dus z.g. pseudo-afweerstoffen.

3. Bacteriophage. Daar deze met de bacteriën bij de 1ste inoculatie in de plant is gekomen, en de bacteriën toen — niettegenstaande deze phaag — groote kankers verwekten, is het niet goed mogelijk, het diffundeeren van phaag alleen voor de remming van de bacteriën bij een herinoculatie verantwoordelijk te stellen. Men moet er wel bij aannemen, dat, of deze phaag in den 1sten kanker zijn virulentie verhoogt, of de bacteriën op de 2de inoculatieplaats verzwakt worden door de stoffen onder 1 en 2 bedoeld, en zodoende gemakkelijker ten prooi vallen aan de phaag, waarmee zij besmet zijn en die eventueel nog quantitatief versterkt wordt door de vanuit het gewel gediffundeerde phaag.

IIIb. Vermindering van de uitwerking der bacteriën bij een herinoculatie door den 1sten kanker. Deze mogelijkheid is zuiver theo-

retisch doch mag bij een analyse van dit „immunitets“-verschijnsel niet buiten beschouwing blijven.

Ook hier moet men m.i. weer aan het diffundeeren van stoffen uit den 1sten kanker denken.

Aangenomen dat de „prikkels“, die de bacteriën op het celdeelingsproces uitoefenen, identiek zijn met de werking van bepaalde stoffen die zij vormen, moet hier gedacht worden aan stoffen, welke de plant vormt en die eerstgenoemde, de celdeeling stimuleerende stoffen op de een of andere wijze neutraliseeren in hun uitwerking.

## HOOFDSTUK II.

### MATERIAAL EN METHODIEK

De in dit onderzoek gebruikte proefplanten waren: *Ricinus communis* var. *major*, *Bryophyllum crenatum*, *Impatiens balsamina* en *Pelargonium zonale* var. *Miss Calvin*.

*Ricinus communis* var. *major*:

*Ricinus* werd gezaaid in steriel zand of niet sterielen turfmoelm. De zaden werden  $\pm 0,5$  uur in  $\frac{1}{8}$  % Ceresan gedesinfecteerd. De kieming verloopt dan zeer goed, vooropgesteld dat het zaad niet te oud is en de kiemingstemperatuur minstens  $25^{\circ}$  C. bedraagt. In koudere omgeving krijgt men gauw last van infecties door *Pythium*-soorten in de wortels. Ook zag ik vaak, dat de hypocotylen blauwzwarte strepen gaan vertoonen, waarna de cotylen afsterven. Dit verschijnsel wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een bacterie in de vaten.

Wanneer alles naar wensch verloopt is het mogelijk om 10 dagen na de kieming de plantjes te verspenen. Bij het verspenen werden steeds planten uitgezocht met roode hypocotylen.

Het zaadmengsel, dat ik gebruikte, bleek zeer heterogeen te zijn. Behalve het bovengenoemde type leverde het verder nog op: Planten met groene hypocotylen en zulke met roode hypocotylen, die bedekt waren met een waslaag. Een meer constant mengsel was niet te krijgen.

Daar deze verschillende types ongelijk gevoelig zijn voor *Pseudomonas tumefaciens*, was het zeer gewenscht één type uit te zoeken.

De roodstammige variëteit werd genomen, omdat deze het meest voorkwam en vrij gevoelig was.

Hier — evenals bij alle andere proefplanten — werd steeds verplant in potten, gevuld met ongesteerdiseerde, gezeefde bladaarde. In dit geval stonden in elken pot 2 *Ricinus*planten. Waar niet anders vermeld wordt, hadden de potten een diameter van 15 cm.

Andere algemeene opmerkingen, geldende voor alle proefplanten, zijn:

De planten stonden in een experimenteerkas, waarvan temperatuur en vochtigheid slechts binnen vrij wijde grenzen te regelen waren. De potten werden ingegraven in turfmoalm, zoodat  $\pm \frac{3}{4}$  van den pot bedekt was.

Bij het begieten van pas geïnfecteerde planten werd steeds zorg gedragen, dat de inoculatieplaatsen niet nat werden.

#### *Bryophyllum crenatum* \*).

Hiervan werden in hoofdzaak planten gebruikt, die ik verkreeg, door enkele groote bladen van een plant af te snijden en ze te laten uitloopen in petrischalen. De jonge plantjes werden voorzichtig van de bladen losgemaakt en overgeplant in de potten.

Hier kwamen telkens 4 planten in elken pot. *Bryophyllum* werd gebruikt omdat verwacht mocht worden, dat de zoo verkregen planten zeer regelmatig zouden reageeren.

#### *Impatiens balsamina*.

Deze planten werden uitgezaaid. Bij het verspenen werden zoo veel mogelijk gelijk groote planten uitgezocht. De jonge planten werden weer direct in de potten overgezet, en wel telkens 4 per pot.

#### *Pelargonium zonale* var. Miss Calvin \*).

Van deze plant werden voornamelijk stekken gebruikt, die ik in de maanden Augustus—October sneed. De planten, die de stekken leverden, stonden buiten in den vollen grond.

Steeds werden niet-bloeiende jonge loten uitgezocht. Ze werden door een snede loodrecht op den stengel vlak onder een blad-

\*) Den heer A. K n o l, hortulanus van Cantonspark, dank ik ten zeerste voor de bereidwilligheid, waarmede hij mij materiaal van *Bryophyllum* en *Pelargonium* beschikbaar stelde.

aanhechting afgesneden. Daarna werd(en) de onderste bladsteel of -stelen langs den stam verwijderd, zoodanig dat een stuk van den bast werd weggesneden. Op die manier verkreeg ik stekken met wigvormig ondereinde. Elke stek droeg 3—4 bladen + vegetatietop. Na  $\pm$  24 uur droog gelegen te hebben — om rotting te voorkomen — kwamen de stekken op erlenmeyers met leidingwater. Door middel van stijf om den stengel heengedraaide watten konden de stekken stevig in den hals van de erlenmeyers bevestigd worden. Na eenigen tijd werd het water vervangen door de proefvloeistoffen, die bij de proefbespreking zelf precies opgegeven zullen worden, en die op hun beurt weer door water werden vervangen. Vervolgens kwamen de stekken in potten met aarde. In elken pot van 10 cm diameter werd een stek geplant. In deze potten had de inoculatie plaats. De tijden, die tusschen al deze manipulaties verliepen, vindt men bij de proefbespreking zelf opgegeven.

#### Bacteriestammen.

Alle definitieve immuniseeringsproeven werden gedaan met *Pseudomonas tumefaciens* stam 245. Deze is geïsoleerd uit *Pirus communis* door Bela Hus en sinds 1932 op het Laboratorium „Willie Commelin Scholten” aanwezig. In het begin van dit onderzoek had ik evenwel de keuze uit verschillende stammen. Behalve de bovengenoemde waren op het laboratorium nog aanwezig: de stammen Pfältzer, III en 261.

De stam Pfältzer werd in 1929 geïsoleerd door Pfältzer uit gezwellen van *Ricinus*. Deze stam gold als zeer virulent. Bij cultuur in vloeibaar mout heeft zich deze stam in 2 componenten gesplitst, die in het vervolg a en b genoemd worden. Deze splitsing bleek bij uitzaaiing van deze vloeibare moutculture op petrischalen met moutagar. Hierbij ontstonden duidelijk 2 types van kolonies.

De stam III werd in 1927 door Van der Veen geïsoleerd uit gezwellen van de spruitbasis van framboos. Deze stam is volgens opgave virulent en wel dateert deze mededeeling van 1932.

Stam 261 werd opgestuurd door Bela Hus en is afkomstig uit *Humulus lupulus*. Datering 1932. Zeer virulent.

Enkele karaktertrekken van bovengenoemde stammen in rein-cultuur en hun tegenwoordige virulentie wat het vormen van

tumoren aangaat worden in het hoofdstuk „oriënteerende proeven” besproken (pg. 13).

### Algemeene inoculatiemethode.

Van de bekende inoculatiemethodes werd de eenvoudigste gekozen, n.l. het prikken met een besmette naald. Ik inoculeerde steeds in stengeldeelen. Meestal werd voor dit doel van te voren een suspensie van de bacteriën in steriel water gemaakt, waarmee dan de naald werd besmet (methode I). Daar het in het geheel niet onverschillig is, welke weefsels van een plant men treft, werd voor de zekerheid de naald steeds door den geheelen stengel heenge-stoken.

Bij sommige proeven werd de naald direct met de bacterie-kolonie besmet, dus werd deze dan niet gesuspendeerd (methode II). Een derde inoculatiemethode is de volgende: Eerst werden met een steriele naald wonden gemaakt, door de naald door het geheele plantendeel heen te steken. Vervolgens werden deze wonden aan beide zijden van den stengel ingesmeerd met de bacterie-suspensie (methode III).

Of de methode I, II dan wel III werd gebruikt, vindt men bij de proeven zelf vermeld.

Ook wordt daar opgegeven, hoe oud de bacteriën waren, bij welke temperatuur zij gegroeid hadden enz.

### Het meten van tumoren en planten.

Hiervoor gebruikte ik een eenvoudig instrument, dat het mogelijk maakte, direct de dikte of lengte van een gezwel of plantendeel af te lezen. Dit instrument draagt in den handel den naam „metalen schuifmaat”. Voor het meten van groote maten werd een gewoon meetlatje gebruikt.

Om eenigszins een contrôle te hebben op de fouten, die men op deze wijze ongetwijfeld maakt, werden de tumoren aan het eind van een proef vlak langs den stengel afgesneden en direct gewogen.



## HOOFDSTUK III.

### ORIËNTEERENDE PROEVEN

Voordat ik kon overgaan tot immuniteitsproeven, moesten verschillende kwesties, waarvan men mocht verwachten dat zij de resultaten konden beïnvloeden, onderzocht worden.

Ten eerste is het absoluut noodzakelijk, te allen tijde te beschikken over een bacteriestam, die 100 % infecties geeft bij alle hier gebruikte proefplanten.

Ten tweede is het wenschelijk te weten, of geringe verschillen in de hoeveelheid bacteriën, gebruikt bij elke afzonderlijke inoculatie, van invloed zijn op de grootte van de tumoren, die ten gevolge van die inoculaties ontstaan. Want al tracht men zoo gelijkmatig mogelijk te inoculeeren, toch zal steeds de eene inoculatieplaats iets meer of minder bacteriën krijgen dan de andere.

Ten derde zal men, indien de tumoren veranderen in grootte, wanneer veel of weinig bacteriën worden geïnoculeerd, voor zijn inoculaties, die tot doel hebben een eventueel ontstane verhooging in resistentie op te sporen, steeds zoo weinig mogelijk bacteriën moeten gebruiken, aangezien men dan de meeste kans zal hebben deze verschillen in resistentie met de contrôleplanten te ontdekken.

Aan de punten 2 en 3 moet nog een onderzoek worden vastgeknoopt naar den invloed van het suspensiemedium op de bacteriën, wanneer deze er langen tijd in verblijven. Dit is n.l. onvermijdelijk bij eenigszins groote inoculatieseries. Om een reeks van 80 planten van gemiddeld 2 inoculaties per plant te voorzien, heeft men  $\pm$  60 minuten noodig. Het is dus niet ondenkbaar, dat de bacteriën tegen het einde van de inoculatiereeks min of meer beschadigd zijn.

Ten vierde is het belangrijk te weten, of de plant als geheel of onderdeelen ervan, door inwendige oorzaken, kunnen veranderen in hun gevoeligheid voor *Ps. tumefaciens*, of in hun vermogen tumoren te vormen.

De boven reeds genoemde bacterie-stammen hebben op moutagar zeer verschillende groeivormen. Deze zien er als volgt uit:

245. Rond, vrij sterk verheven boven het oppervlak, slijmig en weinig visceus. Kleur wit-geel.

Pfältzer. Aanvankelijk rond, daarna ontstaan sterke radiaire plooiingen. Slijmig, maar visceuser dan 245. Kleur geel-wit.

III, 261, a. Ruw, zeer onregelmatig, met wortelvormige uitloopers. Droog, in het geheel niet boven het oppervlak verheven. Kleur wit.

b. Veel op stam Pfältzer gelijkend, evenwel toch goed er van te onderscheiden. Het voornaamste verschil is in de kleinere plooiën gelegen.

c. Typisch een mengsel van a en b. Daar waar beide soorten contact krijgen, lost een van beide — waarschijnlijk b — op; er ontstaan op die plaatsen doorzichtige plekken.

Het is uit deze korte opsomming van macroscopisch zichtbare eigenschappen wel voldoende duidelijk, dat deze 7 stammen groote verschillen vertoonen. Dit blijkt ook nog bijzonder goed uit de resultaten van inoculatieproeven, die met alle 7 stammen werden uitgevoerd:

Inoculatieproeven ter testing van de virulentie.<sup>1)</sup>

De bovengenoemde stammen werden getest op *Ricinus*, *Pelargonium* en *Impatiens*.

De voor de volgende proeven gebruikte inoculatiemethode was methode III. Bij de *Ricinus*-planten werd bovendien inoculatiemethode I met inoculatiemethode III vergeleken, zonder dat hier een verschil optrad. De bacteriën waren 7 dagen bij 26° C. gegroeid.

De proeven stonden aan bij

*Ricinus* van 16.4.34—27.6.34 en zijn uitgevoerd met 47 planten.

*Pelargonium* 16.4.34—16.5.34 „ „ „ „ 40 „

*Impatiens* 23.5.34— 8.8.34 „ „ „ „ 96 „

Resultaat: Bij het beoordeelen van de intensiteit der infectie

<sup>1)</sup> De inoculatie culturen voor alle proeven groeiden steeds op mout-agar.

werd gelet op de afmetingen van de tumoren en het percentage van de gelukte infecties.

Bij *Ricinus* veroorzaakten de stammen 245 en b de grootste gezwellen. Inoculaties gaven 100 % infecties. Pfältzer en c gaven kleinere tumoren. Aantal infecties  $\pm 60$  %. Stam a, III en 261 waren geheel avirulent.

*Pelargonium*. Ook hier was 245 de beste galverwekker; b en c waren voor *Pelargonium* veel minder virulent, d.w.z. de tumoren bleven belangrijk kleiner, alhoewel hier al deze stammen 100 % infectie gaven. Stam a was ook voor *Pelargonium* avirulent. Stam Pfältzer werd bij *Pelargonium* niet getest.

*Impatiens*. De stammen b en c verwekten de grootste tumoren, maar 245 was ook hier sterk virulent. Het verschil tusschen b en c eenerzijds en 245 anderzijds is zeer gering. Alle drie de stammen gaven 100 % infectie. Stam Pfältzer was hier bijzonder weinig virulent, niet alleen kwam dit in de kankergrootte, maar ook in een zeer laag infectiepercentage tot uiting. Stam a was volmaakt avirulent.

In het voorjaar 1935 werden nogmaals inoculatieproeven gedaan met 5 van de bovengenoemde stammen. Als proefplant werd toen uitsluitend *Impatiens* gebruikt. Geïnoculeerd werd volgens methode III. De ouderdom van de bacteriecultures bedroeg 3 dagen, zij stonden bij 26° C. 48 Planten dienden voor de proeven. De resultaten kwamen volmaakt overeen met die van het vorige jaar. Evenwel was er nu in het geheel geen verschil meer zichtbaar tusschen de infecties veroorzaakt door de stammen 245, b en c.

Uit deze inoculatieproeven blijkt duidelijk, dat stam 245 volkomen beantwoordt aan de boven in punt 1 gestelde eischen, daar hij niet alleen 100 % infecties levert bij alle hier gebruikte proefplanten, maar bovendien steeds virulent bleef.

Daarom werd stam 245 gebruikt voor alle inoculatieproeven.

Het tweede punt werd nagegaan door inoculatieproeven bij *Impatiens*. Er werden 4 suspensies van stam 245 gemaakt, en deze suspensies waren onderling zeer sterk verschillend. De dunste was nauwelijks zichtbaar troebel, terwijl de dichtste bijna ondoorzichtig was. De twee andere suspensies vormden een overgang tusschen beide.

Met elk van deze 4 suspensies werden nu 8 jonge balsamieren geïnoculeerd. Elke plant kreeg een prik in het hypocotyl dicht onder de cotylen. Geïnoculeerd werd volgens methode III. Het gevolg van deze inoculaties was bij alle planten een even groote infectie.

Niet alleen kleine, maar ook zeer groote verschillen in dichtheid der suspensie schijnen dus geen zichtbaren invloed uit te oefenen op den tumorgroei. Hiermee lijkt de noodzakelijkheid om punt 3 systematisch na te gaan weg te vallen. Wel is waar bestaat natuurlijk de mogelijkheid dat men — nog verder verdunnende als hierboven gebeurde — een bacterieconcentratie krijgt, die bij inoculatie in de plant kleinere kankers geeft, als de meer geconcentreerde, maar evengoed mogelijk en zelfs waarschijnlijker is het, dat hier een soort alles-of-niets-wet geldt. De hier verkregen resultaten met inoculaties van bacteriesuspensies van verschillende concentraties zijn in volmaakte overeenstemming met die van Levine (1922), die deze kwestie naging voor *Pseudomonas tumefaciens* en *Nicotiana tabacum*.

Het suspensiemedium was voor alle inoculatieproeven steriel leidingwater.

De invloed van leidingwater op de bacteriën schijnt mij niet groot. Daarvoor spreken alleen al de regelmatige resultaten verkregen bij langdurige inoculatieproeven ter testing van de virulentie.

Voor grootere zekerheid werd de volgende proef gedaan: Van cultures der stammen 245, Pfälzter, a, b en c op mout-agar werden watersuspensies gemaakt. Deze bleven 30 uur staan. Vervolgens werd uit deze suspensies overgeënt op mout-agar. Er ontstonden na een volkomen normalen groeitijd van alle gebruikte stammen colonies, die geheel de karaktertrekken vertoonden van de cultures, waarvan de suspensies waren gemaakt. Het lijkt mij dus wel zeker, dat het leidingwater als suspensiemedium ook voor langdurige inoculatieproeven geen schadelijken invloed uitoefent op de bacteriën.

#### Inoculatieproeven in stengeldeelen van verschillende ouderdom.

Daar men in de literatuur herhaaldelijk de waarneming tegenkomt, dat jonge, snelgroeiende deelen de grootste tumoren vormen, was het gewenscht na te gaan, of deze verschillen in ouderdom

groot moeten zijn om intensiteitsverschillen in tumorgroei te veroorzaken. Dit te weten is natuurlijk van het grootste belang in verband met het selecteren van het materiaal, dat later voor immunisatieproeven dienst moet doen.

Deze proeven werden gedaan met kiemplanten van *Ricinus*. In het totaal werden 48 planten gebruikt. Plaats van inoculatie was het hypocotyl, en wel kregen alle planten daar 4 prikken volgens inoculatiemethode III. De planten waren in 3 groepen verdeeld n.l.:

- 13 met juist volgroeide cotylen (a)
- 17 met half volgroeide cotylen (b)
- 18 met zeer jonge cotylen (c).

De hypocotylen zelf waren bij geen van de drie groepen reeds volkomen uitgegroeid.

De proef duurde van 11.5.1934 tot 16.6.1934.

Het resultaat was, dat groep a kleine, gelocaliseerde gezwellen, de groepen b en c daarentegen zeer veel grotere en met het hypocotyl meegegroeide tumoren kregen. Op het einde van de proef was tusschen de tumoren der groepen b en c weinig verschil meer te zien, evenwel was het in het begin duidelijk, dat bij de planten van groep c de tumoren het snelste groeiden, maar de gezwellen bij a waren zeer duidelijk kleiner dan die van b en c. Een indruk hiervan geven de photo's 1 en 2.

Deze zelfde proef werd op 13.5.1935 nogmaals aangezet, ditmaal gepaard met metingen van den hypocotyl- resp. tumorgroei. Het resultaat ziet men in tabel 1.

TABEL I

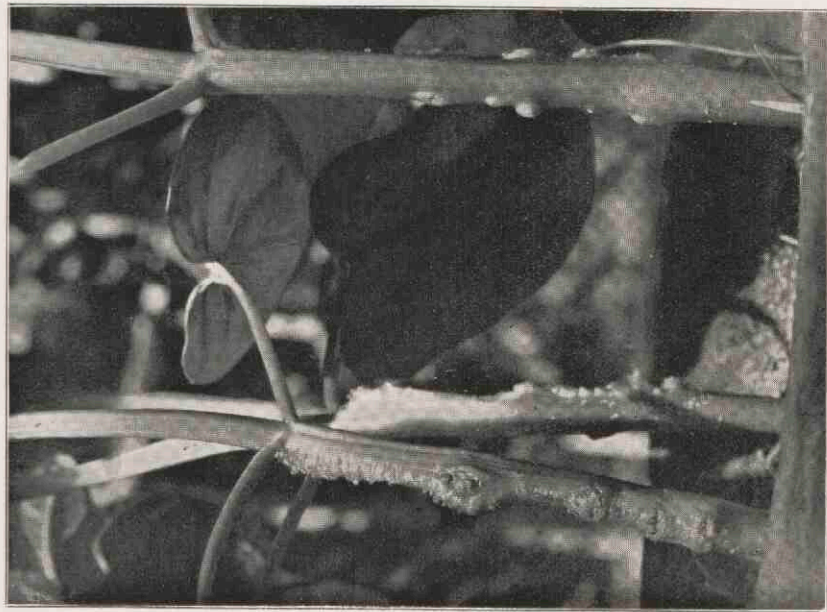
Lengte en dikte groei voor de periode van 13.5.'35—19.6.'35. Tumorgroei op 19.6.'35. Voor nadere gegevens zie pag. 19.

GROEP	HYPOCOTYLEN		TUMORENGROEI
	lengtegroei	diktegroei	
c	1,17	1,54	2
b	1,21	1,55	1,4
a	1,06	1,1	0,6

Uit bovenstaande proeven volgt, dat verschillen in ouderdom van



**Photo 1.** — Zie pag. 16, Inoculatie datum 11. 5. '34  
Gefotografeerd op 16. 6. '34.  
3 planten uit groep a.



**Photo 2.** — Zie pag. 16, Inoculatie datum 11. 5. '34.  
Gefotografeerd op 16. 6. '34.  
3 planten uit groep c.

bepaalde stengeldeelen op eenigerlei wijze verbonden moeten zijn met de snelheid van den tumorgroei en met de definitieve grootte, die de gezwollen tenslotte bereiken.

Het lijkt waarschijnlijk, dat de verschillen in tumorgroei direct samenhangen met de groeisnelheid van de stengeldeelen van verschillende ouderdom. Het is dus in ieder geval noodig, bij het uitzoeken van planten voor immunisatieproeven zooveel mogelijk materiaal van gelijken ouderdom te nemen.

Naar aanleiding van eenige inoculatieproeven, die Stapp en Bortels (1931a) deden bij bloeiende en in den bloei kunstmatig verhinderde planten en de algemeen bekende — hierboven nog eens herhaalde — proeven, dat snel groeiende plantendeelen grootere tumoren vormen, dan minder snel groeiende, werden hun proeven hier herhaald met hun voornaamste proefplant: *Pelargonium*.

Stapp en Bortels vonden, dat enting van bloeiende planten minder groote tumoren opleverde, dan enting van planten, waar voortdurend de bloemknoppen zijn verwijderd. Hun proeven waren ongeveer als volgt ingericht:

Bij jonge voorjaarsloten van overwinterde planten werden jonge internodiën geïnoculeerd. Gelijktijdig werden bij enkele planten de bloemknoppen verwijderd.

Met tusschenpoozen van 4—6 weken werden nogmaals jonge internodiën aan deze planten geïnoculeerd. In totaal werd elke uitlooper 3 maal geïnoculeerd.

Duidelijke resultaten werden bij de laatste inoculaties verkregen. Hier waren de tumoren bij de bloeiende planten duidelijk kleiner, dan bij de in den bloei verhinderde planten.

Evenwel, een verschil was ook te zien bij de gezwollen van de eerste inoculaties, maar in een ander opzicht: Hier vertoonden n.l. de tumoren bij de bloeiende planten spruitvorming, bij de niet-bloeiende traden geen spruiten op.

Het verschijnsel, dat de gezwollen van de derde inoculatie kleiner bleven bij de bloeiende planten, verklaren Stapp en Bortels, voor zoover dat met zekerheid uit hun conclusies is op te maken, door de algemeene theorie, dat bloeien en vegetatieve groei elkaar wederzijds remmen.

Dat zich uit de tumoren der bloeiende planten spruiten ontwikkelen, willen de auteurs begrijpelijk maken door een „Umstim-

mung" van de plant onder invloed van den bloei aan te nemen, waardoor in plaats van chaotische tumorgroei een geordende orgaanvorming optreedt.

De proeven van Stapp en Bortels werden hier herhaald, in de eerste plaats door bloeiende en in den bloei verhinderde planten te inoculeeren in reeds volgroeide internodiën (a);

ten tweede door hetzelfde te doen in jonge, nog groeiende internodiën (b).

Voor proef a en proef b werden telkens 40 planten gebruikt. De proef a werd in het voorjaar 1934, b in het voorjaar 1935 aangezet.

De planten vertoonden een uitgesproken neiging om te bloeien. Het waren gedurende het voorafgaande najaar gesneden stekken, die 's winters onder glas buiten hadden gestaan.

Het resultaat van serie a was, dat hoegenaamd geen verschillen in tumorgrootte tusschen bloeiende en niet-bloeiende planten te constateeren waren.

Dit is dus in overeenstemming met het feit, dat Stapp en Bortels bij inoculaties in oudere internodiën geen of slechts geringe verschillen waarnamen.

De resultaten van proef b gaven ook op geenerlei wijze beïnvloeding van den tumorgroei door den bloei van de planten te zien, hoewel deze zeer intens was. Deze proef moest afgebroken worden op 19.6.'35. Hij stond aan vanaf 14.5.'35. Het is niet onmogelijk, dat bij langeren proefduur, wél verschillen opgetreden zouden zijn. Op 19.6.'35 hadden de tumoren van de niet bloeiende planten een grootte van 0.4, die van de bloeiende planten een grootte van 0.37 bereikt. Deze getallen geven de verhouding aan van den grootsten diameter van den tumor tot dien van den stengel er vlak onder. Verschillen in vegetatieve groei, die tamelijk sterk was, traden bij de bloeiende en in den bloei verhinderde planten niet op.

Het is natuurlijk nog altijd mogelijk, dat het negatieve resultaat van deze proeven te wijten is aan het feit, dat alle planten op het oogenblik der inoculatie reeds knoppen droegen. Hoewel deze en de zich later opnieuw vormenden zorgvuldig verwijderd werden, lijkt mij de mogelijkheid niet uitgesloten, dat men, bij gebruik van planten, waar in het begin van de proef nog geen zichtbare knoppen ontwikkeld zijn, beter resultaat in den zin van Stapp zal krijgen. Overigens hebben ook Stapp en Bortels gewerkt met plan-



ten, die reeds bij het begin van de proef knoppen vertoonden.

Stapp en Bortels vermelden niet, of zij den groei van hun planten hebben gemeten. Indien deze bij in den bloei verhinderde planten werkelijk versneld wordt tegenover dien van bloeiende planten, dan is de versnelde tumorgroei bij de eerste zeer begrijpelijk. Voor het geval, dat geen duidelijk verschil is te constateeren tusschen den groei der internodiën bij de twee categorieën van planten, wordt de zaak echter gecompliceerder. In dit geval zou misschien niet alleen aan een „Umstimmung” in den tumor, die spruitvorming tot gevolg heeft, gedacht moeten worden, maar ook aan een verhooging van de resistentie tegen de parasiet.

Opmerking naar aanleiding van tabel 1.

Wanneer hier of in de tabellen op de volgende pagina's gesproken wordt van de lengte en dikte groei van een internodium of van de lengte groei van een plant in zijn geheel, over een bepaalde periode, dan wordt daaronder verstaan de verhouding van de lengte of dikte op de laatste meetdatum tot die van de vorige.

## HOOFDSTUK IV.

### INLEIDING TOT DE IMMUNISATIEPROEVEN

Nadat gebleken is, welke factoren tot fouten aanleiding kunnen geven, of een schijnimmunitet kunnen veroorzaken, kan begonnen worden met de beschrijving van de proeven, die het doel hadden uit te maken, of planten op eenigerlei wijze tegen *Ps. tumefaciens* te immuniseeren zijn.

De hier volgende proeven werden zoo verschillend mogelijk opgezekt, aangezien het uit de literatuur niet blijkt welke weg zeker en direct tot het gewenschte resultaat leidt.

De gebruikte methoden zijn in het kort als volgt in te deelen:

1. Het inspuiten van stofwisselingsproducten van *Pseudomonas tumefaciens* en van de levende bacterie zelf in bladen van *Bryophyllum* (Hoofdstuk V).

2. Het laten opzuigen door *Pelargonium*-stekken van levende bacteriën, van hun stofwisselingsproducten en bovendien van tot 100° C. verhitte bacteriën (Hoofdstuk VI).

3. Het laten vormen van een gezwel door *Ricinus* en *Pelargonium* en vervolgens in de nabijheid van dit gezwel de gevoeligheid te testen door een tweede inoculatie (Hoofdstuk VII).

4. Het laten vormen van meer dan één gezwel bij *Ricinus* (Hoofdstuk VIII).

## HOOFDSTUK V.

### IMMUNISATIEPROEVEN BIJ BRYOPHYLLUM CREMATUM

Van eenige groote *Bryophyllum*-planten werden 34 bladen afgesneden. Hiervoor werden middelmatig groote bladen uitgezocht, die zich ongeveer op halve hoogte van de plant bevonden.

Deze 34 bladen werden in 5 groepen verdeeld n.l. 4 groepen van 8 en 1 van 2 bladen.

Nadat de bladen op de hieronder beschreven wijze waren behandeld, werden zij 2 bij 2 in petrischalen gelegd. De behandeling bestond in het injecteeren van 1 ccm vloeistof via den bladsteel in de bladschijf. Door het donkergroen worden van de bladen — bij het binnendringen van de vloeistof wordt de lucht uit de intercellulaire holttes verdreven — tijdens de injectie kan men met zekerheid weten, dat de proefvloeistoffen werkelijk met elke cel van het blad in contact zijn gekomen. Deze proefvloeistoffen waren:

a. Een ultrafiltraat van een 22 dagen oude cultuur van *Ps. tumefaciens*. (Een beschrijving van de filtratietechniek vindt men in Hoofdstuk X.) Het cultuurmedium, dat in dit geval gebruikt werd, had de volgende samenstelling:  $H_2O$  : 1 l; Glucose: 10 gr; Asparagine: 1 gr;  $K_2HPO_4$  : 0,5 gr;  $MgSO_4$  : 0,2 gr;  $FeSO_4$  : 0,1 gr;  $MnSO_4$  : 0,1 gr;  $CaCl_2$  : 0,2 gr.

Deze synthetische voedingsoplossing werd overgenomen uit Stappen Bortels (1931b).

- b. Een cultuur als onder a. beschreven, doch ongefiltreerd.
- c. Steriele voedingsoplossing.
- d. Steriel water.

De 5 bladseries werden dus op 13.12.'34 als volgt behandeld:

- Serie 1 (8 bladen) . . . . per blad 1 ccm van a. ingespoten.  
 Serie 2 (8 bladen) . . . . per blad 1 ccm van b. ingespoten.  
 Serie 3 (8 bladen) . . . . per blad 1 ccm van c. ingespoten.  
 Serie 4 (8 bladen) . . . . per blad 1 ccm van d. ingespoten.  
 Serie 5 (2 bladen) . . . . werd niet ingespoten.

De petrischalen met de bladen werden vervolgens in een warme kas in het volle daglicht geplaatst. Na betrekkelijk korten tijd —  $\pm 10$  dagen — begonnen de knoppen in de bladmeristemen uit te loopen en konden bij de bladen zelf kleurveranderingen geconstateerd worden.

Op 9.1.'35 was de stand van zaken als volgt:

TABEL II

Kleur van de bladen, het aantal en de grootte van de plantjes, die zich uit de meristemen ontwikkelden op 9. 1. '35.  
 Injectie-datum 13. 12. '34.

Serie	AANTAL BLADEN			AANTAL PLANTJES		
	groen	groen-geel	geel-bruin	grootte (%)	zeer kleine (%)	totaal
1	3	5	—	91 (73)	33 (27)	124
2	—	7	1	69 (59)	48 (41)	117
3	4	4	—	98 (82)	20 (18)	118
4	6	2	—	78 (75)	26 (25)	104
5	2	—	—	116 (88)	16 (12)	132

Men kan hieruit opmaken, dat inspuiting van de levende bacterie-cultuur de bladen het sterkste aantast, want bij serie 2 zijn alle bladen geel geworden. Bijna even schadelijk werkt inspuiting van het filtraat (serie 1).

De ongebruikte voedingsoplossing (serie 3) heeft evenwel ook een ongunstigen invloed, daar het aantal gele bladen hier grooter is dan bij serie 4, waar alleen water werd ingespoten.

Een duidelijke werking was echter ook te zien op het aantal en

de grootte van de plantjes, die zich uit de bladmeristemen vormden.

In serie 2 waren meer kleine, nauwelijks ontwikkelde plantjes te vinden, dan in de series 3 en 4.

Om na te gaan of deze nieuwgevormde planten in hun gevoeligheid voor *Ps. tumefaciens* onder elkaar verschilden, werden van alle bladen zooveel mogelijk plantjes losgemaakt en op 16.1.'35 overgezet in potten met aarde. Den toestand op dezen dag toont photo 3.

Op 26.3.'35 werden van elke serie 16 planten uitgezocht die ongeveer gelijk groot waren. De gemiddelde hoogte bedroeg 4 cm.

Al deze planten werden nu geïnoculeerd (methode III) in het

TABEL III

Tumorgroei, diktegroei van de geïnoculeerde internodien en lengtegroei van de geheele plant.

t. gr. = tumorgroei, d. gr. = diktegroei, l. gr. pl. = lengtegroei geh. plant. Zie verder de tekst.

Serie	12. 4. '35			30. 4. '35		
	t. gr.	d. gr.	l. gr. pl.	t. gr.	d. gr.	l. gr. pl.
1	70	1,28	1,34	87	1,57	1,16
2	68	1,30	1,32	79	1,56	1,46
3	87	1,28	1,40	126	1,36	1,19
4	90	1,40	1,60	106	1,50	1,26
5	85	1,40	1,50	104	1,48	1,22

oudste internodium. De cultuur waarmede ik inoculeerde, groeide op mout-agar en was 25 dagen oud (kamertemperatuur).

Op 1.4.'35, 12.4.'35 en 30.4.'35 werden de volgende afmetingen opgenomen:

1. De lengte van het geïnoculeerde internodium;
2. de dikte van het geïnoculeerde internodium vlak boven de plaats van inoculatie (d);
3. de dikte van het geïnoculeerde internodium op de plaats van inoculatie (d');

Uit de zoo verkregen getallen werden gemiddelden berekend. De tumorgroei wordt hier en in alle volgende berekeningen steeds weergegeven door de verhouding  $[(d' - d) : d] \times 100$ .

De diktegroei van de geïnoculeerde stengeldeelten wordt uitgerekend voor de periodes, die tusschen de drie metingen in liggen. Op dezelfde wijze wordt snelheid van lengtetoenamen voor de geheele plant opgegeven.

Het heeft geen zin hier den lengtegroei van de geïnoculeerde internodiën op te geven, aangezien deze practisch gelijk 0 is.

Men krijgt dan de in tabel III opgegeven getallen.

Men kan hieruit zien, dat de tumorgroei bij de series 3, 4 en 5 sterker is, dan bij series 1 en 2, al is het verschil niet zeer groot.

Tevens blijkt, dat zoowel de dikte- als de lengtegroei van de geheele plant in de periode van 1—12 April over het geheel genomen grooter is bij de series 3, 4 en 5, vergeleken bij series 1 en 2. Dit verschil verdwijnt in de periode van 12.4.'35—30.4.'35, daarentegen wordt de achterstand in tumorgroei niet ingehaald.

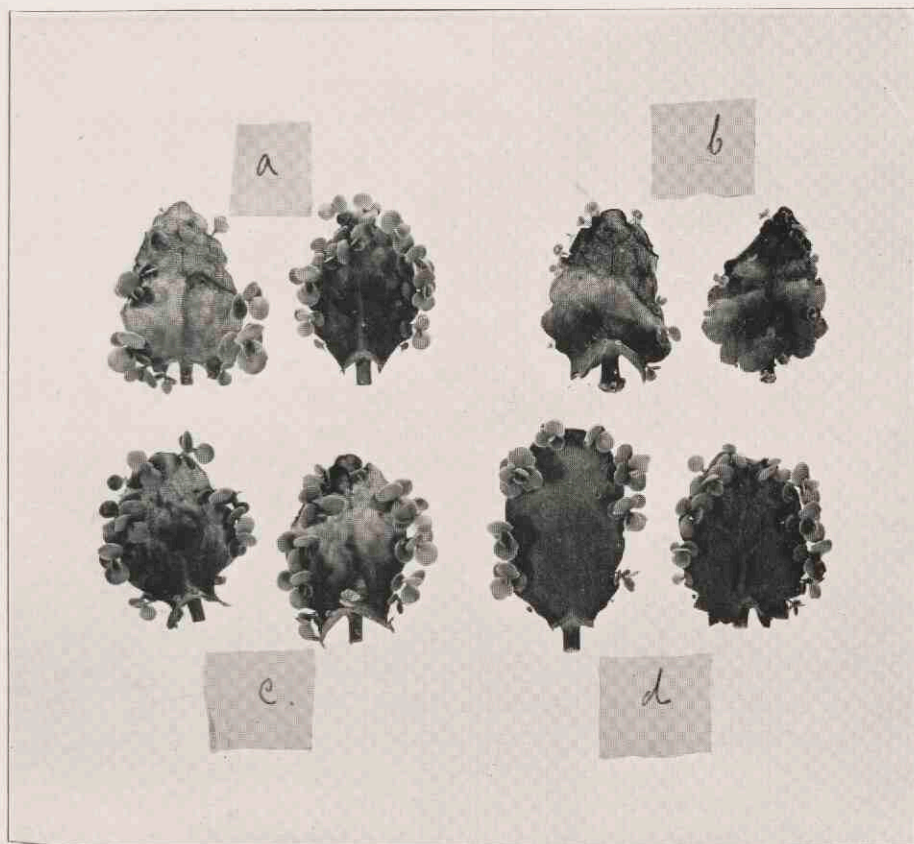
Het is duidelijk, dat deze proef herhaald zou moeten worden, wil men er met volkomen zekerheid gevolgtrekkingen uit opmaken. Daar er echter veel tijd mee gemoeid is, kon dit in verband met andere proeven niet meer gebeuren.

Bij de slotconclusies wordt nog verder op de uitkomsten van deze proef ingegaan.

Verder werd met *Bryophyllum crenatum* de volgende proef gedaan:

Het is bekend [S m i t h (1921), L e v i n e (1919)], dat aan deze plant bijzonder snel okselknoppen tot zijspruiten uitloopen, indien vlak onder een bladaanhechting een inoculatie met *Ps. tumefaciens* wordt verricht. Deze spruiten wijken in vorm af van normale zijspruiten, zoowel wat de dikte van den stengel als wat den vorm en de grootte der bladen betreft. Inoculeert men onder de bladaanhechting, dan ontstaan enkele spruiten — er zijn hier twee okselspruiten gepreformeerd in elken bladoksel —, wordt echter deze spruitaanleg zelf geraakt door de entnaald, dan krijgt men ontspringende uit den tumor talloze kleine spruiten, die vroegtijdig afsterven (S m i t h, 1921).

Deze inoculatieproeven werden hier herhaald met volkomen ge-



**Photo 3** — Zie pag. 22—23. De letters a, b, c en d corresponderen met de serie nummers 1, 2, 3 en 4 in tabel 2 (pag. 22). Men lette op de kleine tumoren aan de bladstelen van b, daar, waar de injectienaald binnendrong.

lijke resultaten. De groote zijspruiten, die men verkrijgt door onder een bladaanhechting te inoculeeren, werden scherp langs den hoofdstam afgesneden en in aarde overgezet, in de hoop dat deze stekken zouden aanslaan, daar zij dan later voor inoculatieproeven gebruikt konden worden. Het is immers a priori niet onwaarschijnlijk te achten, dat dergelijke, door een directen prikkel van de parasiet gevormde plantendeelen, in bijzonder sterke mate een immuniseerenden invloed zullen ondergaan, indien tenminste iets dergelijks in het plantenrijk mogelijk is.

De meeste van deze stekken gingen echter te gronde, zoodat er tenslotte slechts 5 bruikbare planten overbleven. Deze groeiden vrij snel en verloren gaandeweg hun eigenaardig uiterlijk, zoodat er tenslotte niet veel verschil meer was te zien tusschen deze en de contrôle-zijspruiten, die van planten werden verkregen, welke geen tumoren droegen.

Hier volgen de opzet en de resultaten van deze proef:

Op 15.8.'34 werd een groote plant van *Bryophyllum crenatum* met *Ps. tumefaciens* volgens methode I onder verschillende bladoksels en in het hoofdvegetatiepunt geïnoculeerd. Het gevolg was de reeds bovengenoemde vorming van okselspruiten. Ook het hoofdvegetatiepunt veranderde geheel in tumorweefsel en vormde afgezien van groote hoeveelheden zeer kleine spruitjes — enkele groote spruiten (zie photo 4).

Op 16.1.'35 werden alle groote spruiten van de tumoren afgesneden ( $\pm 12$ ) en in aarde overgebracht. Zooals gezegd schoten er vijf wortel. Twee daarvan waren afkomstig van den tumor in den top, de drie anderen kwamen uit den onderste geïnoculeerden bladoksel.

Op 26.1.'35 werden 10 normale zijspruiten van gezonde planten afgesneden en opgepot. Deze bleven alle in leven.

Op 26.3.'35 werden alle planten volgens methode III met *Ps. tumefaciens* geïnoculeerd. Elke plant kreeg 2 prikken en wel een in het onderste internodium en een in het op 3 na bovenste internodium.

Op 2.4.'35, 12.4.'35 en 8.5.'35 werden de op pg. 23 genoemde maten opgenomen en daaruit de tabellen 4 en 5 samengesteld.

Zooals uit tabel 5 blijkt, is de tumorgroei in het bovenste internodium bij de contrôleplanten iets sterker dan bij de proefplanten (127 tegen 88). In de onderste geïnoculeerde internodiën is de



TABEL IV

Tumorgroei, lengte- en diktegroei van de onderste geïnoculeerde internodiën. Lengtegroei van de geheele plant.

t. gr. = tumorgroei, l. gr. = lengtegroei geïnoc. int., d. gr. = diktegroei geïnoc. int., l. gr. pl. = lengtegroei geheele plant.

	2.4.'35	12.4.'35				8.5.'35			
	t. gr.	t. gr.	l. gr.	d. gr.	l. gr. pl.	t. gr.	l. gr.	d. gr.	l. gr. pl.
tumorspruiten	8	45	1,02	1,15	1,22	122	1,7	1,25	1,47
contrôle-spruiten	7	62	1,0	1,12	1,23	116	1,17	1,27	1,43

TABEL V

Tumorgroei, lengte- en diktegroei van de bovenste geïnoculeerde internodiën. Zie voor verklaring der teekens tabel 4.

	2.4.'35	12.4.'35				8.5.'35			
	t. gr.	t. gr.	l. gr.	d. gr.	l. gr. pl.	t. gr.	l. gr.	d. gr.	l. gr. pl.
tumorspruiten	22	40	1,21	1,33	1,22	88	1,21	1,50	1,47
contrôle-spruiten	26	44	1,50	1,33	1,23	127	1,20	1,49	1,43

tumorontwikkeling bij proef- en contrôleplanten ongeveer gelijk.

Uit de tabellen 4 en 5 volgt, dat de diktegroei van de geïnoculeerde internodiën bij contrôle- en proefplanten volkomen gelijk is. Zooals men uit tabel 5 kan opmaken, is de lengtegroei van deze internodiën niet uniform. De bovenste internodiën van de contrôleplanten zijn iets sterker in de lengte gegroeid dan die van de proefplanten.

Of hiermede het verschil in tumorgroei is te verklaren, valt niet uit te maken. Er kan alleen op gewezen worden, dat in de periode, waar het verschil in tumorgroei duidelijk werd, n.l. van 12.4.'35—8.5.'35, de intensiteit van den lengtegroei bij contrôle- en proef-

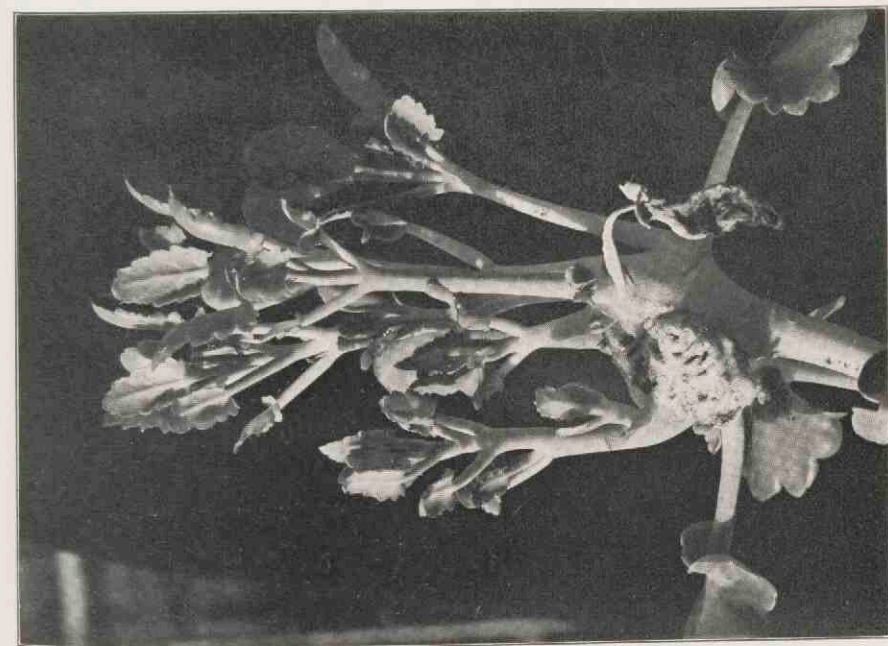


Photo 4. — Zie pag. 25.

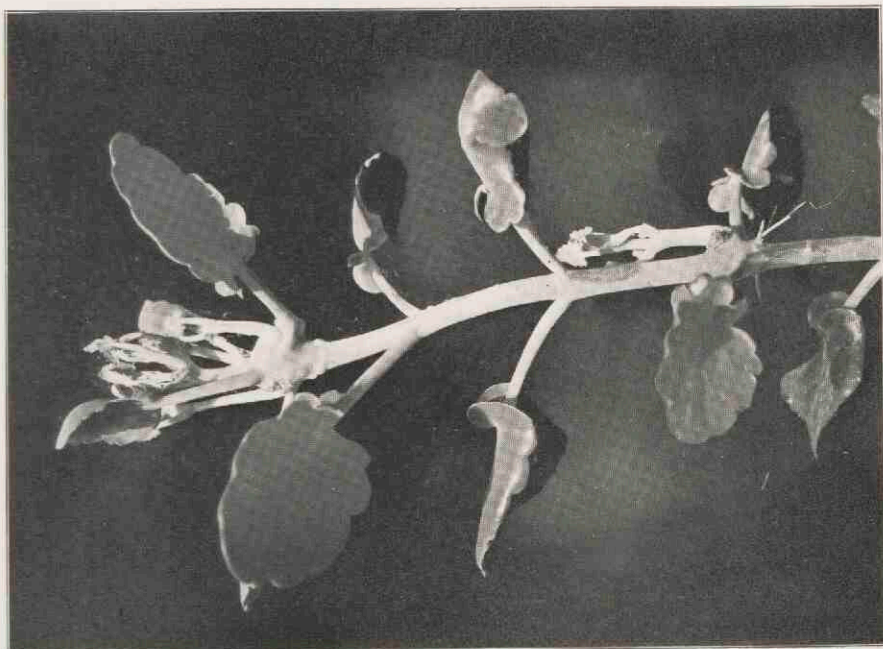


Photo 6. — Zie pag. 67.

planten in het bovenste geïnoculeerde internodium juist gelijk was geworden.

Deze resultaten verkrijgen meer waarde wanneer men hen beschouwt in samenhang met de feiten vermeld in Hoofdstuk VII. Op pg. 45 kom ik dus op de bovenstaande gegevens nog eens terug.

Resumeerende kan hier gezegd worden, dat deze proeven misschien een aanwijzing kunnen zijn voor het optreden van een kleine resistentieverhoging tegen *Ps. tumefaciens* als gevolg van een behandeling met levende bacteriën en met het filtraat van hun cultuurvloeistof.

## HOOFDSTUK VI.

### IMMUNISATIEPROEVEN MET PELARGONIUM-STEKKEN

Zoals uit de proeven met bladen van *Bryophyllum* volgt, is de kans op een resistentieverhoging door behandeling met filtraten of suspensies van ongefiltreerde levende bacteriën niet uitgesloten.

Daarom werd doorgegaan met proeven te nemen in deze richting door dergelijke methodes toe te passen op stekken van *Pelargonium*.

Echter werden de proefvloeistoffen hier niet ingespoten, aangezien dat moeilijkheden oplevert. Veel eenvoudiger en wellicht fysiologisch ook juister is het, de vloeistoffen door de stekken zelf te laten opzuigen. Op deze manier worden in 4—6 dagen per stek gemakkelijk  $\pm 4$  ccm opgenomen. Dergelijke hoeveelheden zijn niet te injecteren in de stengeldeelen van *Pelargonium*. Verder heeft men het voordeel, dat de stekken in de vloeistof zijn ondergedompeld, zoodat deze over een groot oppervlak gelijkmatig kunnen inwerken, iets wat met injecteren onmogelijk te bereiken is.

Voor ik hier de gegevens van mijn proeven met *Pelargonium* vermeld, wil ik even samenvatten, wat er in de literatuur bekend is over immunisering van deze plant tegen *Ps. tumefaciens*.

Arnaudi (1925) zag, dat planten met tumoren voor een tweede infectie minder vatbaar zijn. Verder dat de reeds bestaande kankers verschrompelen, indien de stengels, waarop zij zich bevinden, in een vloeistof geplaatst worden, die uit konijnen verkregen antistoffen tegen *Ps. tumefaciens* bevatten. Deze proeven zijn met zeer weinig planten genomen, zoodat hun uitkomsten niet veel zekerheid geven.

Thung (1929) filtreerde bouilloncultures van *Ps. tumefaciens* van verschillende ouderdom en behandelde met de filtraten *Pelar-*

*gonium*-planten door van te voren gemaakte wondjes er mee in te wrijven of de filtraten te injecteren. Het laatste veroorzaakte hem eveneens moeilijkheden. Het resultaat was negatief, want inoculatie op de behandelde plaatsen gaf normale gezwellen. De door Thung gebruikte *Ps. tumefaciens*-stam — afkomstig van Magrou — was vrij van bacteriophage.

Gheorgiu (1932) gebruikte bij 60° C geïnactiveerde suspensies van *Ps. tumefaciens* en liet deze door watten opzuigen. De watten werden daarna bij wijze van compressen om stengels van *Pelargonium* gewikkeld, die van te voren over een groot oppervlak van hun epidermis waren beroofd. Een inoculatie —  $\pm$  30 dagen na de behandeling — had bij de behandelde planten vrijwel geen resultaat, de contrôles kregen groote kankers. Verder schijnt Gheorgiu gezien te hebben, dat planten met tumoren, indien zij op bovengenoemde wijze werden behandeld, deze gezwellen binnen betrekkelijk korten tijd verloren.

Het aantal planten, waarmee Thung en Gheorgiu werkten, is onbekend.

Magrou (1935) tenslotte vindt in perssappen van *Pelargonium*- en *Chrysanthemum*-tumoren en stengelstukken boven de tumoren een agglutineerend en praecipiteerend principe tegen *Ps. tumefaciens*. Het agglutineerend principe bleek wel, het praecipiteerende niet specifiek. Een dergelijke werking vertoont ook het perssap van gezonde plantenstengels, echter op een andere wijze. Dit verschil in werking — dat zich bij de verdunningsseries van de perssappen manifesteert en dat niet alleen wijst op een quantitatief verschil — schrijft Magrou toe aan het voorkomen van actief gevormde antistoffen in de zieke planten.

Deze resultaten schijnen overtuigend, daar het verschijnsel bij alle 24 onderzochte gevallen optrad. Het ware wenschelijk, deze interessante kwestie aan grooter materiaal uit te werken.

Het is, alles bijeengenomen, dus niet mogelijk, zich over deze immuniteitsvraagstukken bij *Pelargonium* een duidelijk beeld te vormen.

Zooals gezegd, werd door mij een werkmethode gevolgd, die overeenkomt met die van Thung en Gheorgiu, in zoverre, dat o.a. filtraten en gedooide bacteriesuspensies op de planten konden inwerken. Evenwel, er werd geen andere wond aan de stekken gemaakt dan die er door het snijden aan ontstond.

De proeven verliepen in twee series.

De eerst serie stond aan van 17.8.'34 tot 30.1.'35, de tweede van 29.9.'34 tot 23.5.'35.

Het totaal aantal stekken in de eerste serie was 95, in de tweede 180.

De stekken werden gesneden zooals op pg. 10 is opgegeven. Daar kan men tevens vinden, hoe zij werden behandeld. Hier volgen gegevens over:

- a. De bereiding van de proefvloeistoffen;
  - b. Het toedienen van de proefvloeistoffen, de tijd van inwerking, de tijd die daarna verloopt tot de inoculatie en ten slotte de inoculatie zelf.
- Ad. a. Voor de eerste serie werden de volgende proefvloeistoffen gebruikt:
1. *Ps. tumefaciens*-cultuur in synthetische voedingsoplossing (zie pg. 21), 10 min. op 100 ° C verhit.
  2. *Ps. tumefaciens*-cultuur in synthetische voedingsoplossing, 90 min. op 100 ° C verhit.
  3. Ultrafiltraat van de levende cultuur in bovenstaande voedingsoplossing.
  4. Bovengenoemde cultuur onverhit en ongefiltreerd.
  5. Bovengenoemde steriele voedingsoplossing.
  6. Steriel water.

Alle bacteriecultures waren 3½ dag oud en bij 26 ° C gegroeid. De reeksen 1—5 bestonden elk uit 10 stekken, reeks 6 bestond uit 45 stekken.

Voor de tweede serie gebruikte ik de volgende proefvloeistoffen:

1. *Ps. tumefaciens*-cultuur in synthetische voedingsoplossing van 5 dagen, die gedurende 2 min. op 100 ° C werd verhit.
2. Ultrafiltraat van een 2 min. op 100 ° C verhitte cultuur in synth. voedingsoplossing van 5 dagen.
3. Ultrafiltraat van een 5 dagen oude levende cultuur in synthetische voedingsoplossing.
4. Ultrafiltraat van een 2 min. op 100 ° C verhitte cultuur in synth. voedingsoplossing van 45 dagen.
5. Ultrafiltraat van een 45 dagen oude levende cultuur in synthetische voedingsoplossing.
6. Levende, ongefiltreerde 5 dagen oude cultuur in synthetische voedingsoplossing.
7. Levende, ongefiltreerde 45 dagen oude cultuur in synthetische voedingsoplossing.
8. Steriele synthetische voedingsoplossing.
9. Leidingwater.

De reeksen 1—3 bestonden elk uit 20 stekken. De filtratiemethode wordt op pg. 76 nader besproken.

Ad. b. De proefvloeistoffen voor de eerste serie werden in groote hoeveelheden toegediend, n.l. ± 20 ccm per stek. De stekken, die van tevoren 4 dagen op erlenmeyers van 100 ccm gevuld met sterielwater hadden gestaan, kregen dus de vloeistoffen in een verdunning van 1:4 toegediend. Gedurende 12 dagen bleven de stekken in dit mengsel, waarvan tamelijk groote hoeveelheden werden opgezogen.

Daarna bracht ik de stekken over op nieuwe erlenmeyers met leidingwater.

Hierin bleven zij 60 dagen. Geregeld werd het water in de erlenmeyers bijgevuld. Na deze periode werd elke stek in een afzonderlijke pot met gezeefde bladaarde geplant. Toen de planten goed gingen groeien, werden zij allen geïnoculeerd (methode I). De inoculatiecultuur was 5 dagen bij 26° C. gegroeid. Elke stek kreeg 2 prikken, een in het onderste deel, wat in direct contact met de proefvloeistoffen was geweest en een in het op een na jongste internodium.

Tusschen het overplanten in aarde en de inoculatie verliepen 23 dagen.

De methode van toediening der proefvloeistoffen, die hier werd gevolgd, bevredigde niet geheel. Ten eerste worden deze vloeistoffen verdund. Het gevolg daarvan is, dat men de stekken vrij lang er in moet laten staan, om ze voldoende ervan te doen opzuigen. Dit heeft tot gevolg, dat er zich in deze vloeistoffen, waarin tamelijk veel glucose en zouten aanwezig zijn, schimmels gaan ontwikkelen.

Bij de tweede serie ging ik dus op de volgende manier te werk:

De stekken werden, na 7 dagen in erlenmeyers + leidingwater te hebben gestaan, overgebracht op korte glazen buizen van  $\pm 6$  ccm inhoud. In elke buis kwam 4 ccm van de onverdunde proefvloeistof en daarna werden de stekken er stevig in bevestigd door middel van watten. Het snijvlak van de stekken reikte tot op den bodem van de buizen.

Na 6 dagen waren de buizen leeggezogen en werden de stekken weer op erlenmeyers met leidingwater bevestigd. Op deze wijze heeft men veel minder last van infecties.

60 dagen bleven de stekken in de erlenmeyers met water, daarna werden zij overgeplant in aarde. 64 dagen na het overplanten werden zij geïnoculeerd op dezelfde wijze als bij serie 1. De inoculatiecultuur was 10 dagen oud en had 2 dagen bij 26° C. en 8 dagen bij kamertemperatuur gegroeid.

Dat de stekken na de behandeling in de proefvloeistoffen zolang in de erlenmeyers met water bleven staan wordt verklaard, doordat het de bedoeling was, de wortelvorming waar te nemen.

De groote tijdsruimte tusschen het overplanten in aarde en het inoculeeren was noodzakelijk, daar deze proef in den winter gedaan werd. Het is bekend dat *Pelargonium*-stekken 's winters langzaam groeien en daar men voor tumorenvorming flink groeiende planten noodig heeft, moest dus gewacht worden tot de stekken werkelijk aan den groei kwamen, wat geruimen tijd duurde.

Op het oogenblik dat de stekken werden overgeplant hadden zij groote hoeveelheden wortels gevormd.

Het aantal wortels was echter niet gelijk bij alle reeksen van een serie.

Steeds hadden de stekken, die met levende bacteriën behandeld waren, de meeste wortels. Ook de filtraten schijnen de wortelvorming te stimuleeren vergeleken bij de contrôles, dus die stekken welke met ongebruikte voedingsoplossing of met water in contact waren geweest.

Uit tabel 6 en 7 kan men opmaken, dat deze verschillen inderdaad vrij duidelijk zijn:

TABEL VI

Serie I; percentage van het aantal stekken in elke reeks, dat meer dan 30 wortels droeg. Verklaring in de tekst.

Reeks	Proefvloeistof	22.8.'34	20.9.'34	10.10.'34	4.11.'34
1	4 dagen oude cultuur 10 min. 100° C.	0	60	80	100
2	4 dagen oude cultuur 90 min. 100° C.	0	13	88	88
3	filtraat van 4 dagen oude levende cultuur	0	60	90	90
4	levende, ongefiltreerde 4 dagen oude cultuur	0	87	100	100
5	Contrôle: steriele voe- dingsoplossing . .	0	50	88	100
6	Contrôle: water . .	0	50	83	99

Bij serie 1 werd op de wortelvorming pas gelet, toen deze reeds ver gevorderd was. Het bleek onmogelijk te zijn, deze wortels toen nog te tellen. Daarom werd de wortelvorming geschat door in elke reeks het percentage te bepalen van het aantal stekken, dat zeker meer dan 30 wortels droeg.

Bij serie 2 werden de wortels, die zich ontwikkelden, van het begin af aan nauwkeurig geteld. In de tabel 7 ziet men het aantal wortels in elke reeks opgegeven in procenten van het aantal stekken dezer reeks. Hier komen de verschillen veel duidelijker voor den dag en bovendien is te zien, dat men door te lang wachten met waarnemen, geen bijzonder duidelijke verschillen zal krijgen. Aan het einde van de periode, gedurende welke de stekken in het water stonden, waren ook bij serie 2 geen opvallende verschillen meer te zien.



Dat *Ps. tumefaciens* specifiek wortelvormende stoffen zou afscheiden, is voor het eerst geopperd door N e m e c (1930). Het

TABEL VII

Serie 2; Aantal wortels in % van het aantal stekken per reeks.  
Verklaring in de tekst.

Reeks	Proefvloeistof	5.10.'34	15.10.'34	27.10.'34	3.11.'34	7.11.'34
1	5 dagen oude cultures 2 min. 100° C.	0	0	47	100	182
2	filtraat van 5 dagen oude cultures 2 min. 100° C. . . . .	0	0	36	86	114
3	filtraat van 5 dagen oude levende cultures . . . . .	0	0	37	83	168
4	filtraat van 46 dagen oude cultures 2 min. 100° C. .	0	0	36	73	209
5	filtraat van 45 dagen oude levende cultures . . . . .	0	6	158	247	477
6	levende, ongefiltereerde 5 dagen oude cultures . .	0	5	85	140	350
7	levende, ongefiltereerde 45 dagen oude cultures . .	0	15	135	255	495
8	contrôle: voedingsoplossing . . . .	0	0	17	64	133
9	contrôle: water .	0	0	7	14	66

verschijnsel van wortelvorming ter plaatse van of onder een tumor.

veroorzaakt door *Ps. tumefaciens*, is algemeen bekend. Dit gebeurt niet alleen bij planten met gepraeformeerde wortelbeginsels, maar ook en zelfs zeer duidelijk bij die, waar geen praeformatie voorkomt. Bij de inoculatieproeven op *Balsamina*, die hier gedaan werden, traden steeds zeer veel wortels op, zoowel op de tumoren zelf als op groote afstanden (tot  $\pm 8$  cm) daaronder. Zie verder voor het vermogen van *Ps. tumefaciens* om wortelvorming op te wekken de volgende auteurs: Stapp (1927), Brown (1929), Riker c.s. (1928) en anderen. Het lijkt dus vrij waarschijnlijk, dat voor deze wortelvorming inderdaad een rhizocaline in den zin van Bouillène en Went (1933), door de bacterie gevormd, aansprakelijk is. Op dit zeer aantrekkelijke thema kon niet worden ingegaan, daar het veel te ver van de oorspronkelijke vraagstelling zou afleiden.<sup>1)</sup>

Vermeld moet nog worden, dat van een zichtbare toxische werking, uitgaande van de proefvloeistoffen op de stekken geen sprake was, daar alle stekken er volmaakt gezond uitzagen. Alleen de wortelvorming was verschillend en verder ontwikkelden zich aan die stekken, welke met levende *Ps. tumefaciens* waren behandeld, hier en daar kleine tumoren. Deze ontstonden niet alleen op de snijvlakten, maar ook verspreid over het geheele ondergedompelde gedeelte van den stengel. De tumoren aan de snijvlakten zijn, door de vele wortels en gewone calluswoekeringen moeilijk te tellen. Bij serie 1 had slechts een der stekken van reeks 4 een kleinen tumor gevormd op het ondergedompelde stengeloppervlak. Bij serie 2 hadden in reeks 6, 50 %, in reeks 7, 20 % der stekken tumoren gevormd boven de snijvlakten aan de stengels. Nooit ontstonden er tumoren op de stekken, die met filtraten of gekookte bacteriën waren behandeld. Van ultrafiltreerbare vormen van *Ps. tumefaciens*, die onder invloed van de bacteriophage zouden ontstaan en volgens d'Hérelle en Peyre (1927), het tumorverwekkende agens zouden zijn, was geen spoor te bekennen. Hetzelfde negatieve resultaat met dergelijke proeven kregen Brown en Quirk (1929), Thung (1929) en Kauffmann (1929).

Op den datum van de inoculaties werden de planten van serie 2 als volgt gemeten:

1. Grootste diameter van den tumor.
2. Diameter van den stengel vlak onder den tumor.

<sup>1)</sup> Zie pg. 38.

3. Lengte van het internodium, waarin geïnoculeerd werd.
4. Lengte van de geheele plant.

Bij serie 1 werden op den datum van inoculatie geen maten opgenomen. Hier werd pas met meten begonnen, toen de tumoren reeds groot waren. Slechts de volgende maten zijn toen opgenomen:

1. Lengte en breedte van de tumoren.
2. Geheele lengte van de planten.

Serie 1 werd gemeten op 30.1.'35 en 26.2.'35.

In tabel 8 zijn de gemiddelde grootten der tumoren opgegeven voor elke reeks. Deze werd in dit geval bepaald door het product te berekenen van de gemeten lengte en breedte der gezwellen.

TABEL VIII

*Pelargonium* serie 1. Gemiddelde grootte der tumoren en gemiddelde lengte der planten.

Reeks	30. 1. 1935			26. 2. 1935	
	gem. grootte v. d. tumor in mM <sup>2</sup>		gem. lengte van de planten in cM.	gem. grootte v. d. tumor in mM <sup>2</sup>	
	ond. int.	bov. int.		ond. int.	bov. int.
1	58	142	17,8	115	335
2	79	169	18,8	131	220
3	99	156	18,7	188	161
4	36	106	20,8	70	248
5	72	122	22,5	131	283
6	95	142	19,3	162	227

In tabellen 9 en 9a zijn de gegevens van serie 2 verwerkt. Deze serie werd 5 maal gemeten en wel op 22.2.'35 (inoculatie datum), 12.3.'35, 25.3.'35, 11.4.'35 en 23.5.'35.

De tumorgrootte wordt hier opgegeven als verhoudingsgetal van den grootsten diameter der tumoren en dien van de stengels er vlak

onder. De grootte van de onderste tumoren wordt als

$$\left[ (d'_I - d_I) : d_I \right] \times 100,$$

die van de bovenste als

$$\left[ (d'_{II} - d_{II}) : d_{II} \right] \times 100$$

aangeduid.

De snelheden van lengte- en diktegroei der geïnoculeerde inter-nodiën zijn uitgerekend voor de periodes, die tusschen twee metingen in liggen en worden aangeduid met  $l_I$  en  $l_{II}$ , resp.  $d_I$  en  $d_{II}$ .

De groeisnelheid van de planten is op overeenkomstige wijze berekend en aangeduid met  $t$ . 1. Deze waarden vindt men in tabel 9a.

TABEL IX

*Pelargonium* serie 2. Verklaring in de tekst.

Reeks	12. 3. '35		25. 3. '35		11. 4. '35		23. 5. '35	
	tum. gr. ond. int.	tum. gr. bov. int.	tum. gr. ond. int.	tum. gr. bov. int.	tum. gr. ond. int.	tum. gr. bov. int.	tum. gr. ond. int.	tum. gr. bov. int.
1	5	8	7	19	14	28	84	159
2	8	13	11	19	15	24	67	135
3	7	10	9	16	12	27	52	140
4	6	9	9	12	12	15	90	133
5	10	18	11	15	9	16	48	133
6	8	7	10	10	12	8	47	90
7	5	3	6	6	7	17	48	115
8	5	8	9	11	16	14	76	127
9	3	11	7	15	14	27	89	156

Uit de resultaten van serie 1 en 2 is met vrij groote zekerheid op

te maken, dat de hierboven beschreven behandeling met een levende bacteriecultuur een verhooging van resistentie in de stekken tot gevolg heeft, want de tumorgroei bij de contrôles is  $1\frac{1}{2}$  à 2 keer sterker dan bij de behandelde stekken.

De uitkomsten van serie 2 schijnen er verder op te wijzen, dat filtraten van levende cultures een ongeveer even groote resistentieverhoging veroorzaken. Daarentegen verdwijnt deze immuniserende werking van het filtraat min of meer, wanneer de cultures vóór de filtratie  $2^{\text{min}}$  op  $100^{\circ}$  C worden verhit. De stekken, die met een  $2^{\text{min}}$  op  $100^{\circ}$  C verhitte bacteriecultuur waren behandeld, blijken evenmin een resistentieverhoging verkregen te hebben, hetgeen dus overeenkomt met de werking van het filtraat van deze gekookte cultuur.

Deze laatste feiten zijn evenwel in tegenspraak met de uitkomsten

TABEL IXa

Pelargonium serie 2.

Lengte en dikte groei voor de periode van 22.2.'35—21.5.'35.

Reeks	$l_I$	$l_{II}$	t.l.	$d_I$	$d_{II}$
1	1,—	1,2	1,1	1,1	1,3
2	1,—	1,2	1,1	1,1	1,5
3	1,1	1,1	1,2	1,2	1,3
4	1,1	1,2	1,1	1,1	1,4
5	1,1	1,1	1,1	1,1	1,3
6	1,—	1,3	1,1	1,1	1,2
7	1,—	1,—	1,1	1,1	1,3
8	1,—	1,3	1,—	1,—	1,1
9	1,—	1,1	1,1	1,1	1,3

van serie 1 (tabel 8). Want hier blijkt van een resistentieverhoging door een filtraat van levende bacteriecultures niets, daarentegen schijnt de ongefiltreerde, gekookte cultuur eenige weerstandsverhoging te geven, zij het dan ook lang niet in die mate als de levende bacteriecultuur.

Een mogelijke verklaring voor deze gedeeltelijk uiteenlopende resultaten van de series 1 en 2 kan wellicht gevonden worden in de feiten, dat

- 1°. de cultures bij serie 1 jonger waren dan bij serie 2 en
- 2°. de cultures voor serie 1, 15 resp. 90 minuten werden gekookt, terwijl bij serie 2 slechts 2 minuten op 100° C werd verhit.

Het onwerkzaam zijn van het filtraat van de levende cultuur in serie 1 zou dus veroorzaakt kunnen zijn doordat bepaalde stoffen, die bij toenemenden ouderdom der cultuur in steeds sterkere mate ontstaan, nog niet in voldoende concentratie aanwezig waren. De resistentieverhoging door de gekookte cultuur bij serie 1 kan op de volgende wijze hypothetisch verklaard worden: Door de langere verhitting worden de bacteriën sterker gedesorgeriseerd, waardoor stoffen vrij komen, die bij kort durende verhitting binnen de lichamen der bacteriën blijven.

Uit tabellen 8 en 9 kan men overigens nog opmaken, dat de duidelijkste resistentieverhoging optreedt in het deel van den stengel, wat in direct contact was geweest met de proefvloeistoffen.

Voorloopige proeven hebben aangetoond, dat de hier gebruikte ultra-filtraten van *Ps. tumefaciens* een duidelijk stimulerende werking op de groei van *Aspergillus niger* vertoonden. De werking was reeds te zien bij een verdunning van de filtraten 1 : 25. De verschillen in groei werden gemeten door drooggewichtsbepalingen van de schimmel.

De groei van *Asp. niger* was met filtraat  $\pm 100\%$  sterker dan bij de contrôles. Zie in verband met deze quaestie ook Smith (1917, in het bijzonder pg. 182 onderaan). Zie noot pg. 34 van dit proefschrift.

## HOOFDSTUK VII.

### DE INVLOED VAN EEN REEDS AANWEZIGE TUMOR OP EEN HER-INFECTIE

Na in het voorgaande te hebben aangetoond, dat de mogelijkheid van immunisatie der gebruikte proefobjecten tegen *Ps. tumefaciens* door inwerking van stofwisselingsproducten enz. van deze bacterie op de planten niet uitgesloten is, wil ik nu de proeven vermelden, waarbij nagegaan werd in hoeverre een reeds aanwezige infectie door *Ps. tumefaciens* een beletsel kan zijn voor een volgende aantasting door deze parasiet. Zooals men uit de literatuur over actieve immunisatie tegen *Ps. tumefaciens* kan opmaken, meenen *Arnaldi* (1925), *Redaelli* (1934) en misschien ook *Smith, Brown* en *Townsend* (1911) en *Brown* (1923) een immuniseerenden invloed te hebben aangetoond, uitgaande van een tumor. De methode was bij alle onderzoeken van deze auteurs gelijk. Eerst werd een plantendeel geïnoculeerd en nadat er zich een gezwel had ontwikkeld, werd dezelfde plant in de nabijheid van deze infectie voor de tweede maal geïnoculeerd. Ter controle inoculeerden bovenstaande auteurs gezonde planten. *Brown* ging anders te werk. Zij sneed gedurende eenige achtereenvolgende jaren stekken van *Chrysanthemum* planten die tumoren droegen. Deze werden dan, tegelijk met controlestekken, geïnoculeerd. In het begin bleek inderdaad resistentie verhooging te zijn opgetreden. Ten slotte werden echter de stekken van de tumor-dragende planten gevoeliger dan de controles, hetgeen *Brown* toeschreef aan een weerstandsvermindering van de planten als gevolg van het jarenlange parasitaire proces.

Bovenstaande auteurs hebben, voorzover dat is na te gaan, voor de beoordeeling van het effect slechts de tumor-grootte opgenomen, dus hielden zij niet voldoende rekening met groeiremmingen van de proefplanten, die eventueel tengevolge van de eerste infectie op zouden kunnen treden. Dergelijke proeven werden hier herhaald met *Pelargonium* en *Ricinus*.

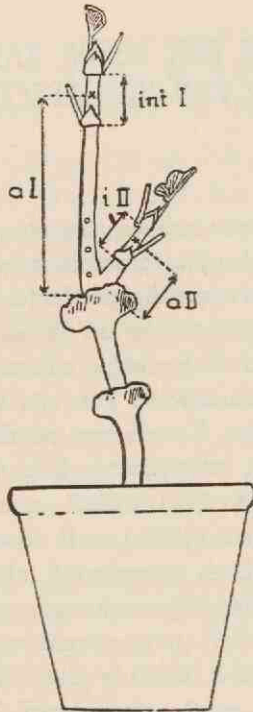


Fig. 1

Voor *Pelargonium* week de methode af, bij *Ricinus* ging ik precies zoo te werk als Arnaudi en Redaelli.

Bij *Pelargonium* bestond de afwijking hierin, dat planten werden uitgekozen, die door de tumoren tot ontwikkeling gekomen zij-spruiten droegen. In deze „tumorspruiten” werd een inoculatie gegeven op 1—2 cm afstand van den tumor en bovendien in den hoofdstam, die dezen tumor droeg, maar op  $\pm 12$  cm afstand daar-



vandaan (zie fig. 1). In totaal behandelde ik op deze wijze 18 planten. 12 Andere planten werden op overeenkomstige wijze geprikt, evenwel bleef hier de inoculatiernaald steriel en kregen zij behalve de hierboven bedoelde 2 prikken nog 3 extra-prikken in den hoofdstam, vlak boven den tumor.

Dit prikken met een steriele naald in de nabijheid van een tumor gebeurde op grond van de volgende overweging: Gesteld dat de bacteriën uit een tumor in het nabijzijnde, gezonde weefsel kunnen doordringen — iets wat door *Robinson* en *Walkden* (1923) is bewezen voor *Nicotiana tabacum* en *Chrysanthemum frutescens* — dan is het interessant te weten of zij, indien kunstmatig in dat weefsel een wond wordt gemaakt, hier een infectie teweeg kunnen brengen. Wanneer geen tumor ontstaat op deze wondvlakte, kan men trachten uit deze weefselstukken de bacterie te isoleren. De zoo verkregen stammen van *Ps. tumefaciens* kunnen dan getest worden op planten, die nooit met *Ps. tumefaciens* in aanraking zijn geweest.

Blijken bedoelde bacteriën daar wel tumoren te verwekken, dan is de waarschijnlijkheid groot, dat het weefsel, waaruit zij geïsoleerd waren, immuun tegen hen was geworden. Zijn evenwel de bacteriën avirulent, dan moet gezocht worden naar de oorzaken in de plant, die deze avirulentie hebben teweeggebracht.

Dat men zeer vaak avirulent geworden stammen van *Ps. tumefaciens* geïsoleerd heeft uit tumoren, is bekend [*Smith* (1911), *Stapp* (1927)], soms werd echter ook het omgekeerde geconstateerd (*Brown*, 1929).

Het komt mij voor, dat deze kwestie zeer belangrijk is in verband met het immuniteitsvraagstuk, maar het oplossen ervan is een onderzoek op zichzelf, dat mij, gegeven de doelstelling die hier werd gevolgd, teveel op een zijpad zou hebben gevoerd.

Hier volgen de resultaten van de proeven met *Pelargonium* en *Ricinus*.

*Pelargonium*. 30 flinke stekken werden op 27.11.'34 voor de eerste maal op twee plaatsen geïnoculeerd. Deze inoculatie geschiedde in het op 2 na jongste internodium en in het oudste internodium.

Beide inoculaties waren op 26.2.'35 uitgegroeid tot groote gezwellen. De tumoren in het jongere internodium waren begrijpe-

lijkerwijze het grootst en hadden alle tot spruitvorming aanleiding gegeven.

Op 26.2.'35 werden nu bij 18 van deze planten 2 inoculaties gegeven op de wijze, zooals boven is uiteengezet. Voor alle inoculaties werd de methode I gebezigd. Voor de inoculatie op 27.11.'34 waren de bacteriën 5, voor die op 26.2.'35 7 dagen oud en bij 20° C gegroeid.

De 12 overgebleven planten werden op bovengenoemde wijze met een steriele naald geprikt.

Op 26.2.'35, 17.3.'35, 4.4.'35 en 1.5.'35 werden van deze planten de volgende maten opgenomen:

l int. I = lengte van het internodium, waarin op 26.2.'35 een inoculatie werd gegeven en dat deel uitmaakte van den hoofdstam.

a I = afstand van de inoculatieplaats in int. I tot den tumor, die ontstond door de inoculatie op 27.11.'34 in het jongere internodium.

l int. II = lengte van het 2de internodium, waarin op 26.2.'35 werd geïnoculeerd en dat deel uitmaakte van de „tumor-spruit.

a II = afstand van deze inoculatieplaats tot den tumor hierboven bedoeld.

d'I = grootste diameter van de inoculatieplaats in int. I.

d I = diameter van dit internodium vlak onder de inoculatieplaats.

d'II = grootste diameter inoculatieplaats in internodium II.

d II = diameter van internodium II vlak onder de inoculatieplaats.

Tabel 10 werd uit de door deze metingen verkregen gegevens samengesteld.

Zooals hieruit blijkt, is de tumorgroei in het internodium van den hoofdstam duidelijk grooter dan in het internodium van de „tumor-spruit” en deze versnelde tumorgroei kan ook hier niet verklaard worden uit groeiverschillen van deze internodiën zelf.

Het resultaat van de „steriele” inoculaties bij de 12 overige planten was negatief, d.w.z. er was — ook na 3,5 maand — geen spoor van zwellingen rondom de inoculatieplaatsen te bespeuren

TABEL X  
Verklaring in de tekst.

	l int. I	l int. II	a I	a II	d' I	d I	d' II	d II
26. 3. '35 . . . . .	16	10,5	206	28,5	6,7	6,7	6,2	6,2
17. 3. '35 . . . . .	20,3	13,6	206	32,5	10,—	9,3	8,9	8,7
4. 4. '35 . . . . .	23,5	13,6	206	32,—	11,8	10,—	9,8	9,—
1. 5. '35 . . . . .	24,3	15,2	206	33,—	22,—	11,—	16	10,—
(28. 5. '35) <sup>1)</sup> . . .					(0,53)		(0,25)	

Er moest nu dus uitgemaakt worden, of uit deze stengelstukken 1—3 cm boven de tumoren *Ps. tumefaciens* geïsoleerd kon worden. Gegevens omtrent deze pogingen vindt men in Hoofdstuk IX.

**Ricinus.** Op 23.11.'33 werden 10 *Ricinus*-kiemplanten met nog niet geheel volgroeide cotylen op 4 verticaal onder elkaar gelegen plaatsen van het hypocotyl met *Ps. tumefaciens* geïnoculeerd. 8 kiemplanten van denzelfden ouderdom werden als contrôles niet geprikt.

Op 3.1.'34 werden de 18 planten alle geïnoculeerd in het 1ste internodium, door elke plant daar twee prikken boven elkaar te geven.

Alle inoculaties bij deze proefserie gebeurden volgens II. De ent-cultuur was  $\pm 5$  dagen oud en bij 20° C gegroeid.

Op 3.1.'34 waren de tumoren aan de proefplanten, ontstaan door de inoculaties van 23.11.'33 zeer sterk gegroeid met het gevolg, dat de hypocotylen zelf van deze planten min of meer opgezwollen waren.

Op 23.1.'34, 30.1.'34, 5.2.'34, 12.2.'34 en 19.2.'34 werden van deze planten de volgende maten opgenomen:

l = lengte van het 1ste internodium.

a en a' = de grootste lengte en de grootste breedte van den tumor in het 1ste internodium.

In de tabel 11 worden de gemiddelde waarden van l in mm en de producten van a en a' in mm<sup>2</sup> opgegeven:

<sup>1)</sup> Getallen ( ) = gemiddeld gewicht van de tumoren in Gr. op 28.5.'35.

TABEL XI

Tumorgrootte en lengte van het eerste internodium bij *Ricinus*.  
Nadere gegevens in de tekst.

	23. 1. '34		30. 1. '34		5. 2. '34		12. 2. '34		19. 2. '34	
	l.	a × a'	l.	a × a'	l.	a × a'	l.	a × a'	l.	a × a'
Proefplanten	5,4	3,75	5,8	10.—	5,8	20,7	5,8	27,5	5,7	32,5
Contrôle-planten	5,3	35.—	6	59.—	5,7	109,5	5,6	179.—	5,6	305

Zoals hieruit is op te maken, worden de tumoren op de controle-planten gemiddeld  $\pm 10$  maal zoo groot als op de proefplanten, zonder dat dit gepaard gaat met belangrijke verschillen in den groei der internodiën, waar zij zich bevinden. Onder de proefplanten waren er 4, die betrekkelijk kleine tumoren hadden gevormd in het 1ste internodium. De overige 6 proefplanten hadden vrijwel niet gereageerd.

Deze proeven, die met in totaal 36 individuen van 2 verschillende plantensoorten werden verricht, bevestigen dus de resultaten van *Arnaudi* (1925) en *Redaelli* (1934). De hier verkregen uitkomsten zijn echter met iets grootere zekerheid als een resistentieverhoging te beschouwen, daar gelijktijdig met de metingen van de tumoren de groei van de geïnoculeerde internodiën bij proef- en controleplanten werd gemeten. Deze uitkomsten gaven geen relatie tusschen de grootte der tumoren en den groei van de internodiën te zien.

Of deze resultaten echter zonder meer als het gevolg van een actief verkregen immuniteit geïnterpreteerd mogen worden, schijnt mij om de volgende redenen niet zeker:

Niettegenstaande er geen verschil in groei was te constateeren, kon men — in het bijzonder bij de zoo duidelijk positief uitgevallen proef met de *Ricinus*-planten — een verschil in habitus zien tusschen de proefplanten en de controles. De laatste hadden duidelijk beter ontwikkelde bladeren, wat zich uitte in de langere

bladstelen en vooral in de grootere oppervlakte der bladen.

Het is dus niet ondenkbaar, dat de veel grootere gezwellen in het 1ste internodium van de contrôleplanten het gevolg zijn van een sterkeren toevoer van assimilaten. Dat de internodiën zelf bij de contrôles niet sneller gegroeid zijn dan bij de proefplanten, zou verklaard kunnen worden door een uitputting tengevolge van den intensen tumorgroei aldaar.

Deze bedenking vervalt bij de op pg. 25-27 besproken proeven met *Bryophyllum*. In dat geval werd immers de tumor, die tot spruitvorming aanleiding had gegeven, verwijderd, zoodat deze op de stofwisseling van de plant geen invloed meer kon uitoefenen. Dat desondanks de tumoren in het bovenste geïnoculeerde internodium bij de contrôlespruiten duidelijk grooter waren dan bij de tumor-spruiten (tabel 5) vergroot de waarschijnlijkheid, dat deze en de zoo juist besproken resultaten niet op groeibelemmeringen van de internodiën terug te brengen zijn.

## HOOFDSTUK VIII.

### INVLOED VAN MEERDERE GELIJKTJDIG GROEIENDE TUMOREN OP ELKAAR

Bij alle aanwijzingen voor een verhooging der resistentie, die wij in de voorafgaande hoofdstukken hebben meenen te vinden, blijven natuurlijk onzekerheden bestaan. Er werd dus getracht, deze met een andere methodiek op te lossen.

In plaats van te beginnen met de planten van te voren te inoculeren en daarna deze ziek geworden planten te vergelijken met gezonde contrôles, werden proeven opgezet met vergelijkbare planten, die alle op denzelfden dag werden geïnoculeerd. Hadden deze planten 3 internodiën gevormd op het oogenblik van de inoculatie, dan werden er 3, 2 of 1 internodiën geïnoculeerd en wel door in elk internodium 1 prik te geven.

Wanneer ook bij deze wijze van proefneming de tumoren grooter zouden worden bij planten, die bijv. 1 inoculatie minder kregen, dan schijnt het mij toe, dat hier met meer recht op een resistentieverhoging van de een of andere soort besloten mag worden, daar de tumoren hier — in ieder geval in het eerste stadium van hun groei — practisch gelijke kansen hebben wat hun voeding betreft. Natuurlijk moeten ook bij deze proeven de lengte- en diktegroei van de internodiën en de totale groei van de planten gemeten worden.

Het is echter ook waarschijnlijk, dat, mochten de op deze manier aan den dag getreden verschillen het gevolg zijn van immunitaire reacties, zij minder duidelijk zullen worden dan bij de hierboven bedoelde methode, waar de plant van te voren langen tijd den invloed van het gezwel kon ondergaan. Dan is er immers meer tijd voor de vorming van reactiestoffen en zal de positieve uitslag later duidelijker moeten zijn.

Voor de proeven met deze gewijzigde methodiek werden uitsluitend *Ricinus*-planten gebruikt. De eerste serie bestond uit 56 planten, die elk 4 duidelijk zichtbare internodiën vertoonden. Deze serie werd in 4 reeksen verdeeld:

reeks 1 kreeg in het hypocotyl en in ieder der 4 internodiën 1 inoculatie,

reeks 2 kreeg in het hypocotyl en in het 1ste, 2de en 4de internodium telkens 1 inoculatie,

reeks 3 kreeg in het hypocotyl en in het 1ste en 4de internodium telkens 1 inoculatie,

reeks 4 kreeg in het hypocotyl en in het 4de internodium 1 inoculatie.

Hier en in de volgende proeven worden de internodiën steeds opklimmend genummerd, te beginnen direct boven het hypocotyl. Het inoculeren gebeurde op 2.10.'34 door middel van methode I. De bacteriecultuur, die voor de suspensie werd gebruikt was  $\pm 6$  dagen oud.

De controle van de proef wijkt af van die van de volgende, daar hier de tumoren gemeten werden door hun grootste lengte en breedte op te nemen. Verder werden alleen de lengten van de 4de internodiën gemeten en tevens de totale lengten van de planten.

Deze metingen werden gedaan op 10.12.'34, 26.12.'34 en 22.1.'35.

De afmetingen van de tumoren worden in tabel 12 opgegeven door het gemiddelde product van hun grootste lengte en breedte in  $\text{mm}^2$ .

Verder worden er de gemiddelde lengten van de 4de internodiën en totale planten in cm opgegeven.

Deze getallen leiden voorloopig tot de volgende conclusies:

a. Inoculeert men het hypocotyl en de 4 daarboven gelegen internodiën allen gelijktijdig, dan worden de tumoren in het 3de internodium het grootste. Dan volgen de tumoren in het 4de, 2de en 1ste internodium, terwijl de zwellingen in het hypocotyl zeer klein blijven (reeks 1).

b. Wanneer men de inoculatie in het 3de internodium weglaat, worden de tumoren in de overige internodiën en ook in het hypocotyl belangrijk grooter (reeks 2).

c. Laat men de inoculaties in het 2de en 3de internodium weg

TABEL XII

*Ricinus*, serie 1. Gemiddelde afmetingen der tumoren in mM<sup>2</sup> en gemiddelde lengten van de planten en hun vierde internodiën in c.M. De cijfers I, II en III slaan op de meetdata: 10. 12. '34, 20. 12. '34 en 21. 1. '35.

Reeks	Tumor hypocotyl			Tumor 1 <sup>ste</sup> internodium			Tumor 2 <sup>de</sup> internodium			Tumor 3 <sup>de</sup> internodium			Tumor 4 <sup>de</sup> internodium			Lengte 4 <sup>de</sup> internodium		Lengte tot pl.	
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	III	I	III
1	1	3	4	4,5	5	6	32	37	57	75	92	135	41	63	95	1,9	1,9	30,4	32
2	6	7	9	17	18	20	46	53	75				77	96	140	1,58	1,7	29	31
3	9	9	9	14	16	20							154	210	250	1,49	1,8	27	28
4	6	9	13										150	209	270	2,2	2,3	31	32

(reeks 3), dan heeft dat een nog verdergaande vergrooting van de tumoren in het 4de internodium tot gevolg. De zwellingen in het 1ste internodium en het hypocotyl blijven ongeveer even groot als in de vorige reeks.

d. Wordt tenslotte slechts in het hypocotyl en het 4de internodium geïnoculeerd (reeks 4), dan nemen de tumoren in deze internodiën nauwelijks meer in omvang toe, vergeleken bij de voorgaande reeks.

Men ziet tevens uit tabel 12, dat de lengte-afmetingen van de 4de internodiën en van de geheele planten bij de 4 reeksen niet veel uiteenloopen. Verder vertoonden de planten onderling geen verschil in habitus, hetgeen door photo 5 wordt gedemonstreerd.

Het schijnt dus, dat ook hier de tumoren op elkaar een remmenden invloed uitoefenen, en dat deze werking naar boven en naar beneden gericht is.

Om deze kwestie volledig op te helderen, moet men 15 combinaties onderzoeken, wanneer men planten gebruikt, die op den





**Photo 5.** — Zie pag. 48. Om technische redenen werden bladen verwijderd. Nummers 1, 2, 3 en 4 correspondeeren met de reeks nummers in tabel 12 pag. 48. De pijlen wijzen naar de tumoren in het 4de int.

inoculatie datum behalve het hypocotyl nog 4 internodiën hebben ontwikkeld. Dit zou het totale aantal planten — indien 10 planten per reeks worden gebruikt — opvoeren tot 150.

Daar het echter in den winter en het vroege voorjaar ten eerste zeer lang duurt, voordat de planten de voor dezen proefopzet vereischte lengte hebben bereikt, en het ten tweede veel moeite kostte, uit het zaadmengsel, dat ik toen tot mijn beschikking had, zooveel planten tegelijk te kweken — het kiemingspercentage bedroeg  $\pm 15\%$ ! — werd nagegaan of zich hetzelfde verschijnsel ook liet reproduceeren met jongere planten.

Wanneer planten gebruikt worden met behalve het hypocotyl 2 zichtbaar ontwikkelde internodiën, dan kan men de proef sneller na het uitzaaien aanzetten en zijn slechts — bij reeksen van 10 — 80 planten voor elke volledige proefserie noodig. Ter oriëntatie werd daarom op 18.2.'35 de volgende proef aangezet:

35 *Ricinus*-planten, die op 16.1.'35 waren verspeend en behalve een bijna volgroeid hypocotyl 2 jonge internodiën ontwikkeld hadden, werden ingedeeld in 3 reeksen:

reeks 1 kreeg in het hypocotyl en in elk der beide internodiën 1 prik,

reeks 2 werd in het hypocotyl en het 2de internodium geprikt,

reeks 3 kreeg slechts in het 2de internodium 1 prik.

De hierbij gebruikte inoculatie-methode was methode III, de bacteriecultuur was bij  $20^{\circ}\text{C}$  gegroeid en 9 dagen oud.

Op 21.2.'35, 8.3.'35, 15.3.'35, 22.3.'35 en 5.4.'35 werden de volgende maten van het hypocotyl alsmede van het 1ste en 2de internodium opgenomen: lengte, dikte op de inoculatieplaats, dikte vlak onder de inoculatieplaats. Bovendien werd de totale lengte van de planten bepaald.

De tumorgrootte wordt weer opgegeven als de verhouding van  $[(d' - d) : d] \times 100$  en deze uitkomsten vindt men in tabel 13.

De lengte- en diktegroei der hypocotylen, 1ste internodiën, 2de internodiën en totale planten worden in tabel 14 opgegeven:

Vergelijkt men de tumoren van reeks 2 met die van reeks 1, dan blijken zij bij de eerste belangrijk grooter te zijn. Reeks 2 mist de inoculatie in het 1ste internodium. Wordt ook nog de inoculatie in het hypocotyl achterwege gelaten (reeks 3) dan groeit de tumor in het 2de internodium iets sneller dan bij reeks 2, evenwel het ver-

TABEL XIII

*Ricinus*, serie 2. Grootte der tumoren. Verklaring der getallen in de tekst.

	Reeks 1			Reeks 2			Reeks 3		
	hypocotyl	1ste internod.	2de internod.	hypocot.	1ste internod.	2de internod.	hypocot.	1ste internod.	2de internod.
8. 3. '35	40	30	14	50	—	20	—	—	27
15. 3. '35	41	50	34	80	—	50	—	—	47
22. 3. '35	49	90	37	89	—	100	—	—	110
9. 3. '35	70	120	75	100	—	135	—	—	165
5. 4. '35	78	145	80	130	—	152	—	—	187
(6. 4. '35) <sup>1)</sup>	(0.02)	(0.12)	(0.11)	(0.06)		(0.28)			(0.27)

TABEL XIV

*Ricinus*, serie 2. Snelheid van lengte- en diktegroei van de hypocotylen en internodiën voor de periode van 8. 3. '35—5. 4. '35.

Reeks	Hypocotyl		1ste Internodium		2de Internodium		totale lengte der plant
	lengte	dikte	lengte	dikte	lengte	dikte	
1	1,05	1,31	1,23	1,33	1,8	1,9	1,17
2	1,—	1,3	1,21	1,49	1,58	1,5	1,17
3	1,—	1,3	1,41	1,5	1,75	1,5	1,18

schil is nu lang niet zoo duidelijk als tusschen de tumoren in het 2de internodium van de reeksen 1 en 2.

Zooals tabel 14 duidelijk laat zien, zijn de dikte- en lengtegroei van de hypocotylen bij de reeksen 1, 2 en 3 onderling gelijk.

Daarentegen vertoonen deze waarden van den groei voor het 2de internodium een neiging kleiner te worden bij de reeksen 2 en 3.

<sup>1)</sup> Getallen ( ) = gemiddeld gewicht van de tumoren in Gr. op 6.4.'35.

Bedenkt men, dat juist bij deze reeksen de tumoren in het 2de internodium het grootst zijn, dan wordt het waarschijnlijk, dat een tumor den groei van het internodium, waarin hij zich ontwikkelt, remt. Deze groeiremming schijnt plaatselijk te zijn, daar zij noch in den totalen lengtegroei van de plant, noch in den groei van hypocotyl en 1ste internodium duidelijk tot uiting komt.

Door deze proef is waarschijnlijk geworden, dat ook jonge planten, die behalve het hypocotyl nog 2 kleine internodiën hebben ontwikkeld, en waarvan het jongste  $\pm 1-2$  mm lang is, geschikt zijn voor het verwekken van het te onderzoeken verschijnsel. Daarom werden de proeven in het vervolg steeds met planten van dezen ouderdom herhaald, daar hiermede veel minder tijd en planten gemeoid gaan.

In totaal werden nog 190 planten geïnoculeerd. Deze waren ingedeeld in 3 series (3—5), te weten: 2 van 80 planten en 1 van 30 planten.

De series van 80 planten waren ingedeeld in 8 reeksen. De inoculatie van deze reeksen geschiedde op een wijze, zooals in tabel 15 is aangegeven.

De serie 5 (30 planten) was in 3 reeksen verdeeld. Deze reeksen kwamen overeen met de nrs. 1, 2 en 6 in tabel 15.

Dat alle mogelijke combinaties werden geprobeerd — zooals uit bovenstaande tabel 15 blijkt — vindt zijn grond in de volgende vraagstellingen:

- 1°. Kan een tumor een anderen tumor aan dezelfde plant alleen maar remmen als deze tweede tumor zich boven den eersten bevindt, of werkt deze remming ook naar beneden?
- 2°. Is de intensiteit van remming afhankelijk van de plaats op de plant, waar de te remmen tumor zich bevindt?
- 3°. Kan geconstateerd worden, dat 2 tumoren hun remmende werking addeeren ten opzichte van een derden tumor?

Het was bij voorbaat waarschijnlijk te achten, dat de tumoren in de jongste internodiën — in dit geval dus het 2de internodium, dat op het moment van de inoculatie  $\pm 2$  mm lang was — de grootste verschillen in groei zouden vertoonen.

Voor het geval dat de remming van den tumor tot stand komt door een zuivere vegetatieve groeivertraging van het internodium, waarop hij zich bevindt, is het zonder meer duidelijk, dat deze

TABEL XV

Inoculatieschema der series 3 en 4 van *Ricinus*.

Een + beteekent, dat in het betrokken lid werd geïnoculeerd.  
In de *Ricinus*-series 1—5 werden de inoculaties direct onder de bladaanhechtingen in het internodium gegeven.

Reeks	Hypocotyl	1ste Internodium	2de Internodium
1	+	+	+
2	+	—	+
3	—	+	+
4	—	—	+
5	+	+	—
6	+	—	—
7	—	+	—
8	—	—	—
(contrôle)			

groeiremming uitgesprokener wordt in jong, actief deeland en strekkend weefsel.

Mocht echter de remming van den tumorgroei werkelijk berusten op een actieve afweerreactie van het internodium, waarop de tumor zich bevindt, dan is het eveneens aannemelijk, dat jong, nog niet vol-groeid weefsel gemakkelijker verandert en reactiestoffen kan vormen dan volwassen of bijna volwassen weefsel.

Met veel minder zekerheid schijnt het mij van te voren uit te maken te zijn, welke deelen der planten zich het beste leenen als uitgangspunten van remming, daar de aard dezer remming geheel onzeker is. Voor het geval dat zij berust op een vertraging van den vegetatieven groei, moet natuurlijk aangenomen worden, dat die internodiën, welke den sterksten tumorgroei geven, na inoculatie ook het krachtigst als remmingscentrum zullen werken. Dit zouden dus weer de jonge, onvolgroeide internodiën zijn.

Spelen echter actief gevormde reactiestoffen een rol, dan is wel is waar waarschijnlijk te achten dat in een grooten tumor — d.w.z. in een jong internodium — de meeste toxinen resp. antitoxinen gevormd worden — maar evengoed is het mogelijk, dat de cellen voor deze productie een bepaalden ouderdom bereikt moeten hebben.

Ter beantwoording dezer vragen zou het natuurlijk beter geweest zijn, planten met meer internodiën te gebruiken, dit was evenwel om reeds genoemde redenen uitgesloten. Het zaad, dat voor serie 3 werd uitgelegd, kiemde nog voor geen 10 %, zoodat het niet eens mogelijk was, een goede selectie van de kiemplanten toe te passen.

Deze serie heeft dan ook onregelmatig gereageerd met het gevolg, dat de gemiddelde uitkomsten niet zeer overtuigend zijn, hoewel zij tijdelijk in dezelfde richting als de beide vorige proeven wijzen.

De inoculatie van serie 3 werd op 29.3.'35 uitgevoerd met een 7 dagen oude cultuur van *Ps. tumefaciens*. Deze cultuur was de eerste twee dagen bij 20° C, de 5 overige dagen bij kamertemperatuur gegroeid. Gebruikt werd inoculatiemethode III.

De metingen werden verricht zooals op pg. 49 is aangegeven en uitgevoerd op de volgende data: 27.3.'35, 8.4.'35, 13.4.'35, 18.4.'35, 26.4.'35 en 4.5.'35.

Tumorgroei, lengte- en diktegroei van hypocotyl, 1ste en 2de internodium en de totale lengtegroei van de planten wordt uitgerekend zooals op pg. 49 is aangegeven.

Men vindt deze waarden in tabel 16 en 17.

Bespreken wij nu de gegevens van deze tabellen.

#### a. *Hypocotyl.*

De tumorgroei in de reeksen 1, 2, 5 en 6 is practisch gelijk tot op 18.4.'35. Daarna begint de snelheid van den tumorgroei af te nemen in de reeksen 2, 5 en 6 en wel is deze vermindering in reeks 6 het sterkst. Dit is juist het tegenovergesteld van hetgeen men — gezien de resultaten van de series 1 en 2 — mocht verwachten.

Dat deze afname niet in verband gebracht kan worden met groeiverschillen van de hypocotylen zelf, blijkt duidelijk uit tabel 17.

TABEL XVI

*Ricinus*, serie 3. Grootte der tumoren.  
Verklaring der getallen zie pag. 49.

Reeks	HYPOCOTYL						1ste INTERNODIUM					2de INTERNODIUM						
	8. 4. '35	13. 4. '35	18. 4. '35	26. 4. '35	4. 5. '35	28. 5. '35 *)	8. 4. '35	13. 4. '35	18. 4. '35	26. 4. '35	4. 5. '35	28. 5. '35 *)	8. 4. '35	13. 4. '35	18. 4. '35	26. 4. '35	4. 5. '35	28. 5. '35 *)
1	10	14	29	39	60	(1.4)	17	18	38	58	102	(3.3)	1	20	35	48	75	(3.9)
2	16	14	21	33	47	(0.9)							7	32	44	60	91	(3.9)
3							24	30	44	76	111	(2.7)	4	32	32	68	92	(3.4)
4													5	31	33	71	100	(2.9)
5	13	20	26	28	33	(0.8)	22	30	56	79	106	(3'2)						
6	11	19	32	29	38	(0.8)												
7							30	42	66	85	111	(2.8)						

\*) De getallen in deze kolom geven de som der tumorgewichten per reeks in grammen.

#### b. 1ste Internodium.

De tumorgroei (tabel 16) is in reeks 1 het kleinst tot en met 26.4.'35. In de reeksen 3, 5 en 7 is tot dien datum inderdaad een iets sterkere groei van de gezwellen te constateeren. In reeks 7 zijn de gezwellen iets grooter dan in de reeksen 3 en 5, die onderling ongeveer gelijk zijn. Al deze verschillen verdwijnen geheel in de periode van 26.4.'35—4.5.'35.

De lengte- en diktegroei van de 1ste internodiën — zie tabel 17 — vertoonen in de reeksen 1, 3, 5 en 7 onderling weinig verschil, evenmin is er een duidelijk onderscheid vergeleken met de reeksen 2, 4 en 6 of met de contrólereeks 8.

Alleen bij reeks 7 kan men misschien van een geringe remming van den lengtegroei spreken.

Er is dus geen enkele aanwijzing in de gegevens over den groei van de 1ste internodiën te vinden, die de plotselinge verandering van den tumorgroei in die internodiën kan verklaren. De dikte- en

TABEL XVII

*Ricinus*, serie 3. Lengte- en diktegroei van hypocotylen en internodiën, alsmede lengtegroei van de geheele plant.

Reeks	HYPOCOTYL				1ste INTERNODIUM				2de INTERNODIUM				Lengtegroei geheele plant
	lengtegroei		diktegroei		lengtegroei		diktegroei		lengtegroei		diktegroei		
	27.3—13.4	13.4—4.5	27.3—13.4	13.4—4.5	27.3—13.4	13.4—4.5	27.3—13.4	13.4—4.5	27.3—13.4	13.4—4.5	27.3—13.4	13.4—4.5	
1	1,17	1,8	1,2	1,1	2,3	1,1	1,41	1,08	3,9	1,35	1,6	1,5	1,59
2	1,24	1,—	1,29	1,05	2,9	1,07	1,33	1,08	3,6	1,34	1,36	1,5	1,79
3	1,22	1,—	1,26	1,1	2,9	1,1	1,4	1,1	4,—	1,45	1,54	1,6	1,79
4	1,17	1,—	1,28	1,07	3,—	1,14	1,6	1,1	4,—	1,45	1,27	1,5	1,62
5	1,25	1,—	1,13	1,11	3,1	1,1	1,46	1,1	5,5	1,53	1,63	1,29	1,75
6	1,22	1,—	1,2	1,1	2,9	1,18	1,4	1,5	4,7	1,7	1,38	1,39	1,70
7	1,17	1,—	1,25	1,14	2,07	1,07	1,3	1,2	3,6	1,48	1,43	1,3	1,50
8	1,2	1,—	1,24	1,13	3,—	1,13	1,42	1,1	4,28	1,8	1,5	1,18	1,60

lengtegroei van deze internodiën in de periode van 26.4.'35—4.5.'35, dus in de periode waarin volgens tabel 16 de groei van de tumoren zoodanig werd, dat het verschil in de reeksen 1, 3, 5 en 7 practisch



verdween, was in de reeksen  $1-8 \pm 0$ , zoodat ook hierin geen verklaring gevonden kan worden voor de veranderde snelheid van tumorgroei.

c. *2de Internodium.*

Uit tabel 16 blijkt, dat tot en met 18.4.'35 de tumoren in het 2de internodium bij reeks 1—4 ongeveer even groot zijn. Daarna evenwel komt er eenig verschil; de tumoren van reeks 1 groeien iets minder snel dan die van de reeksen 2, 3 en 4. Dit groeiverschil blijft in dit geval behouden tot 4.5.'35. Uit tabel 17 blijkt, dat deze geringe verschillen in tumorgroei niet verklaard kunnen worden door verschillen in lengte- of diktegroei van de 2de internodiën zelf, daar deze bij de reeksen 1—4 onderling praktisch gelijk zijn.

Resumeerende kan men dus van de uitkomsten van serie 3 tot en met 4.5.'35 zeggen, dat zij voor het hypocotyl geheel in strijd zijn met die van de beide vorige proeven.

Voor het 2de internodium is er overeenstemming, maar de verschillen in tumorgroei zijn bij deze proef voor dat internodium veel geringer dan bij de twee eerste proefseries.

Het gedrag van de tumoren in het 1ste internodium werd hier voor het eerst nagegaan, zoodat daarvoor nog geen vergelijkbare resultaten aanwezig zijn.

In ieder geval zijn dus de verschillen in serie 3 zoo klein, dat ze niet als reëel beschouwd kunnen worden. Hier moet aan toegevoegd worden, dat de planten van deze serie zonder eenige voorafgaande selectie van het kiemplantenmateriaal gebruikt moesten worden, gezien het feit, dat van de  $\pm 1000$  uitgelegde zaden er 80 kiemden. Daarbij kwam dat deze zaden nog zeer verschillend snel opkwamen. Zodoende waren er onder deze 80 planten tamelijk veel variëteiten, die afweken van het type dat uitgezocht werd, wanneer voldoende kiemplantenmateriaal aanwezig was (zie Hoofdstuk II, pg. 8).

Aan deze omstandigheden moeten m.i. de slechts geringe verschillen tusschen de reeksen onderling toegeschreven worden.

Wellicht spelen hier bovendien de zeer groote temperatuurschommelingen in de proefkas na 26 April een rol. Na 4.5.'35 werden de planten niet meer gemeten. Op 27.5.'35 werden echter de tumoren afgesneden en alle tumoren van een bepaald internodium gezamenlijk reeks voor reeks gewogen. Daarbij bleek, dat de in de

tabel 16 reeds aangeduide veranderingen in groeisnelheid van de tumoren waren blijven bestaan.

De gewichten van de tumoren op het hypocotyl vertoonen een onderlinge verhouding, die overeenkomt met de uitkomsten der meting van 4.5.'35.

Hetzelfde is het geval voor de gezwellen van de eerste internodiën.

TABEL XVIII

*Ricinus*, serie 4. Grootte der tumoren. Verklaring der getallen zie *Ricinus*, serie 4. Grootte der tumoren.  
Verklaring der getallen zie pag. 49.

REEKS	HYPOCOTYL					1ste INTERNODIUM					2de INTERNODIUM				
	3. 5. '35	10. 5. '35	17. 5. '35	23. 5. '35	27. 5. '35	3. 5. '35	10. 5. '35	17. 5. '35	23. 5. '35	27. 5. '35	3. 5. '35	10. 5. '35	17. 5. '35	23. 5. '35	27. 5. '35
1	13	26	40	59	72 (0,6) <sup>1)</sup>	30	57	81	107	119 (1,8) <sup>1)</sup>	12	26	49	78	93 (1,5) <sup>1)</sup>
2	17	23	35	50	60 (0,5)						15	35	61	90	100 (1,9)
3						30	67	100	130	145 (2,—)	13	40	80	119	142 (3,—)
4											23	53	92	141	152 (3,—)
5	18	34	46	65	80 (0,6)	35	66	81	108	127 (2,—)					
6	19	36	48	75	96 (0,9)										
7						30	64	80	108	120 (1,9)					

<sup>1)</sup> De tusschen ( ) geplaatste getallen zijn de gewichten in grammen van de tumoren per reeks op 27. 5. '35.

De tumoren van het 2de internodium hebben zich echter veel verder in de reeds op 4.5.'35 voor hypocotyl en 1ste internodium kenbaar geworden richting ontwikkeld. Een en ander is op te maken uit de tusschen ( ) staande getallen van tabel 16.

Gezien deze afwijkende resultaten was het dus noodzakelijk, de proef nog eens te herhalen.

Ditmaal werd met iets beter kiemend zaad gewerkt, zoodat een selectie van de planten mogelijk was, al kon deze niet zoo intens zijn, als men wel zou wenschen.

Serie 4 werd precies als serie 3 opgezet.

De inoculaties werden gedaan op 17.4.'35 met behulp van methode III.

De gebruikte bacteriecultuur was 15 dagen oud. De 7 eerste dagen waren de bacteriën bij 26° C gegroeid, de 8 volgende dagen bij kamertemperatuur.

De metingen werden op de gebruikelijke wijze uitgevoerd op de volgende data: 17.4.'35, 3.5.'35, 10.5.'35, 17.5.'35, 23.5.'35 en 27.5.'35.

In tabel 18 vindt men den tumorgroei, in tabel 19 den lengte- en diktegroei der planten vermeld.

Wij gaan nu over tot de bespreking van de tabellen 18 en 19.

#### a. *Hypocotyl:*

Uit tabel 18 blijkt, dat de tumoren in het hypocotyl een neiging vertoonen grooter te worden, wanneer men geen tumoren in het eerste en het tweede internodium laat groeien (reeks 6); dit blijkt zoowel uit de waarden van  $[(d' - d) : d] \times 100$  als uit de gewichten der tumoren.

Uit tabel 19 zien wij dat de snelheid van dikte- en lengtegroei der hypocotylen in de reeksen onderling geen duidelijke verschillen vertoonen, in ieder geval zijn deze zoo klein, dat men ze niet verantwoordelijk kan stellen voor die, welke de tumoren te zien geven.

#### b. *1ste Internodium:*

Het gedrag van dit internodium is, wat den tumorgroei betreft, tamelijk onveranderlijk, wanneer de tumoren in het hypocotyl, tweede internodium of in beiden tegelijk weggelaten worden.

De verschillen van de waarden  $[(d' - d) : d] \times 100$ , die daarbij optreden, zijn te gering, om er met zekerheid gevolgtrekkingen uit te maken, hetgeen ook blijkt uit de gewichten van deze gezwellen, die zeer weinig uiteenloopen. Tabel 19 laat zien, dat nauwelijks verschillen in snelheid van dikte- of lengtegroei in het 1ste internodium te constateeren zijn.

## 2de Internodium:

Hier is een duidelijk verschil in tumorgroei te zien, vooral tusschen

TABEL XIX

*Ricinus*, serie 4. Lengte- en diktegroei van hypocotylen en internodiën, alsmede lengtegroei van de geheele plant.

Reeks	HYPOCOTYL				1ste INTERNODIUM				2de INTERNODIUM				Lengtegr. geheele plant
	lengtegroei		diktegroei		lengtegroei		diktegroei		lengtegroei		diktegroei		
	17.4—10.5	10.5—27.5	17.4—10.5	10.5—27.5	17.4—10.5	10.5—27.5	17.4—10.5	10.5—27.5	17.4—10.5	10.5—27.5	17.4—10.5	10.5—27.5	
1	1.06	1,—	1.3	1.0	2.1	1,—	1.33	1,—	3.9	1.2	2.07	1.06	1.4
2	1.08	1,—	1.24	1,—	2.08	1,—	1.3	1,—	3.9	1.2	2.02	1.16	1.41
3	1.15	1.03	1.34	1,—	2.08	1,—	1.39	1,—	4	1.16	2.18	1,—	1.45
4	1.09	1,—	1.3	1,—	2.42	1,—	1.34	1,—	4	1.22	2.08	1.14	1.43
5	1.08	1,—	1.27	1.05	1.9	1,—	1.4	1.05	5.3	1.21	1.8	1.1	1.31
6	1.06	1,—	1.3	1.04	2.6	1,—	1.4	1,—	5.3	1.24	1.77	1.1	1.43
7	1.07	1,—	1.18	1.02	1.9	1,—	1.18	1.06	4.3	1.2	1.5	1.13	1.34
8	1.29	1,—	1.18	1,—	2.09	1,—	2,—	1.05	3.8	1.3	1.7	1.15	1.42

de reeksen 3 en 4 eenerzijds en reeks 1 anderzijds, dit blijkt zoowel uit de waarden van  $[(d' - d) : d] \times 100$  als uit de gewichten der tumoren.

Er is volgens tabel 19 geen duidelijk verschil in snelheid van lengte- of diktegroei van de internodiën II tusschen de reeksen 1, 2, 3 en 4 onderling.

Ten slotte werd de proef nogmaals gedeeltelijk herhaald, en wel met 30 planten.

De reeksen, waaruit deze serie 5 bestond, komen overeen met de reeksen 1, 2 en 6 van de series 3 en 4. De inoculatie van deze planten werd op 9.5.'35 uitgevoerd met behulp van methode III. De gebruikte bacteriecultuur had 48 uur bij 26° C. gegroeid.

TABEL XX

*Ricinus*, serie 5. Grootte der tumoren. Verklaring der getallen zie pag. 49.

Reeks	HYPOCOTYL			1ste INTERNODIUM			2de INTERNODIUM		
	18.5	24.5	30.5	18.5	24.5	30.5	18.5	24.5	30.5
1	39	60	84	33	84	121	9	63	117
2	51	80	109	—	—	—	28	99	180
6	50	76	90	—	—	—	—	—	—

De metingen werden verricht op 9.5.'35, 18.5.'35, 24.5.'35 en 30.5.'35. De resultaten hiervan zijn in de tabellen 20 en 21 vastgelegd.

Ook van de uitkomsten van deze serie volgt hieronder een bespreking.

#### *Hypocotyl:*

Het heeft ook hier weer den schijn, alsof de tumoren boven het hypocotyl den groei der gezwellen in het hypocotyl zelf iets remmen. Zooals blijkt is de reactie in het hypocotyl als gevolg van het weglaten van de tumoren in het 1ste en 2de internodium niet groot, zoodat men voorzichtig zal moeten zijn, er gevolgtrekkingen op te baseeren.

Uit tabel 21 zien wij dat de lengtegroei der hypocotylen practisch stil staat. De diktegroei is iets sterker, zonder echter duidelijke verschillen bij de reeksen onderling te vertoonen.

*1ste Internodium:*

Daar in deze serie dit internodium slechts bij een reeks werd geïnoculeerd, zullen wij het hier buiten beschouwing laten.

*2de Internodium:*

Het verschil tusschen de tumoren in het tweede internodium van de reeksen 1 en 2 komt bij deze serie weer duidelijk tot uiting.

TABEL XXI

*Ricinus*, serie 5. Lengte- en diktegroei van hypocotylen en internodiën, alsmede lengtegroei van de geheele plant.

Reeks	HYPOCOTYL				1ste INTERNODIUM				2de INTERNODIUM				Lengtegr. geheele plant
	lengtegroei		diktegroei		lengtegroei		diktegroei		lengtegroei		diktegroei		
	9.5— 18.5	18.5— 30.5	9.5— 18.5	18.5— 30.5	9.5— 18.5	18.5— 30.5	9.5— 18.5	18.5— 30.5	9.5— 18.5	18.5— 30.5	9.5— 18.5	18.5— 30.5	
1	1,02	1,—	1,1	1,15	2,21	1,21	1,36	1,28	2,84	1,66	1,57	1,3	1,44
2	1,05	1,—	1,07	1,2	1,73	1,13	1,24	1,26	2,66	1,45	1,41	1,29	1,4
6	1,04	1,01	1,07	1,16	2,38	1,24	1,34	1,2	3,—	2,38	1,32	1,33	1,66

Uit tabel 21 is op te maken dat de 2de internodiën van reeks 2, die de grootste tumoren dragen, iets minder snel gegroeid zijn, dan de 2de internodiën van reeks 1.

Vergeleken bij reeks 6, waar geen inoculatie in dit internodium werd gegeven, vertoonen zoowel reeks 1 als reeks 2 een duidelijke remming van den lengtegroei.

*Conclusies naar aanleiding van de proefseries 1—5 met Ricinus.*

Wanneer men de uitkomsten van deze series met elkaar vergelijkt, dan kan met zekerheid vastgesteld worden, dat gezwellen, verwekt

door inoculaties in het jongste internodium, geremd worden door tumoren, die ontstaan ten gevolge van gelijktijdige inoculaties in oudere internodiën.

De verschillen in tumorgroei, die hierbij in het jongste internodium optreden, zijn te duidelijk, dan dat men ze aan toevallige variaties zou kunnen toeschrijven.

Bij het begin van al deze proefseries had het jongste geïnoculeerde internodium een lengte van 1—2 mm bereikt, het bevond zich tijdens de inoculatie in het begin van zijn groote periode.

Het oudere internodium, in de reeksen 2—5, dus het 1ste internodium, was op het oogenblik van inoculatie midden in de groote periode; het hypocotyl tenslotte was bij alle proefseries practisch volgroeid in de lengte, zoodat in dit lid na de inoculatie alleen nog een geringe diktegroei plaats vond.

Zooals uit de resultaten blijkt, worden de tumoren in het 1ste internodium bij den hier gebruikten proefopzet niet duidelijk grooter, wanneer men de inoculaties in het hypocotyl resp. het 2de internodium achterwege laat.

De tumorgroei in het hypocotyl schijnt bij planten van den hier gebruikten ouderdom iets sterker beïnvloed te worden door de infecties in het eerste en tweede internodium, al zijn de versnellingen in tumorgroei, die bij het hypocotyl optreden als gevolg van het weglaten van tumoren erboven, veel geringer dan die, welke optreden in het tweede internodium door de infecties in de leden daaronder uit te laten vallen.

Uit de resultaten van serie 1, waar planten met 5 leden, en uit die van de series 2—5, waar jongere planten met slechts 3 leden werden geïnoculeerd, kan men opmaken, dat bij gelijktijdige inoculatie van alle internodiën het op een na jongste lid steeds de grootste tumoren vormt. De afmetingen dezer tumoren worden slechts overtroffen door die van het jongste internodium, indien de inoculatie in het op een na jongste lid achterwege blijft.

Het maakt duidelijk den indruk, alsof een inoculatie in een internodium, dat zich in zijn groote periode van groei bevindt, tot een tumorvorming aanleiding geeft, die niet goed te remmen is door infecties boven of onder dit lid.

Wanneer men aanneemt, dat remming van de tumoren tot stand zou kunnen komen door transport van „afweerstoffen”, die de ter

plaatse reeds gevormde komen versterken, dan is het begrijpelijk, dat de tumor in het 1ste internodium niet geremd wordt, althans in het begin van zijn ontwikkeling kan er geen sprake zijn van een vervoer van afweerstoffen van andere tumoren daarheen, aangezien deze gezwollen zich nog niet gevormd hebben op het moment, dat de tumor in het 1ste internodium reeds groeit.

Waarom later, wanneer de gezwollen in het hypocotyl en het 2de internodium zich ontwikkeld hebben, niets blijkt van een remming van den tumor in het 1ste internodium, is niet duidelijk. Misschien mag dat verklaard worden door aan te nemen, dat een remming alleen daar duidelijk wordt, waar zij aan kan grijpen op tumoren, die in het begin van hun ontwikkeling staan.

De zeer duidelijke remming van den tumorgroei in het jongste internodium en de minder opvallende, in enkele series echter toch te constateeren vertraging in het hypocotyl zouden dan te verklaren zijn, doordat in beide gevallen de tumorgroei in de eerste weken na de inoculatie zeer langzaam verloopt. In beide gevallen is dit waarschijnlijk te wijten aan geringen vegetatieven groei: het jongste internodium bevond zich immers nog in een ontwikkelingsstadium, dat vóór de periode van sterken groei valt, het hypocotyl daarentegen had zijn lengtegroei reeds volbracht.

Dit laatste zal vermoedelijk ook de verklaring zijn voor de veel duidelijker remming in het jongste internodium, vergeleken bij die in het hypocotyl. Het is immers wel aannemelijk, dat een duidelijk groeiverschil tengevolge van een remming alleen maar bij intens groeiende tumoren tot uiting kan komen.

Groeit het gezwel uit zich zelf reeds langzaam, zooals bij deze proeven in de hypocotylen het geval was, dan kan men niet verwachten, dat hier nog een duidelijke remming optreedt.

Bovenstaande verklaring van de bij *Ricinus* waargenomen verschijnselen werd gebaseerd op de hypothese, die mij in dit geval het waarschijnlijkste voorkomt, n.l.: De tumoren oefenen op elkaars groei een remmenden invloed uit, doordat bepaalde stoffen — die men in het algemeen reactiestoffen van de plant kan noemen — er uit diffundeeren in het omringende weefsel. Deze stoffen zouden op een of andere wijze de bacteriën, welke zich in de nabijheid van den tumor bevinden, moeten aantasten of hun uitwerking op de plant verminderen. Deze conclusie is, o.m. gegrond op de volgende



waarnemingen: Werd de lengtegroei van een internodium, dat een „geremden”, dus kleinen tumor droeg, vergeleken met lengtegroei van een internodium, welks gezwel niet door een tumor daaronder beïnvloed kon worden, dan waren er geen verschillen te constateeren. Mag hier echter uit afgeleid worden, dat in het eerste geval geen remming van het internodium zelf door den tumor, die zich daaronder bevond, bestond?

We hebben gezien, dat in enkele gevallen een min of meer duidelijke locale remming van den lengtegroei van het internodium te zien was, wanneer er zich een groote tumor op ontwikkelde en bij oriënteerende proeven, die hier niet vermeld zijn, was deze locale groeiremming zonder eenigen twijfel te zien. Maar dan moet men ook aannemen, dat de grootte van den tumor van invloed is op de intensiteit van de locale remming van het internodium.

Wanneer dus — zooals bij bovenbeschreven proeven — dit niet het geval blijkt te zijn, moet daarvoor een oplossing gezocht worden. Deze ligt voor de hand: Het niet tot stand komen van een geringere locale remming kan hier verklaard worden door een andere remming, want juist bij deze gevallen bevond zich een tweede tumor onder het internodium, dat in het bovenstaande bedoeld werd.

Of deze redeneering al dan niet juist is, kan slechts onderzocht worden, door bij een reeks van planten de locale groeiremmingen van een bepaald internodium te meten, die veroorzaakt worden door tumoren van verschillende grootte.

Mocht het daarbij blijken, dat tumoren — in grootte niet meer van elkaar afwijkende dan het geval was bij de hier boven beschreven proefseries — een duidelijk verschillende locale groeiremming uitoefenen op hun internodium, dan zou dit de verklaring van de bij mijn proeven met *Ricinus* opgetreden verschillen in tumorgrootte door de werking van „afweerstoffen”, zeer verzwakken.

In dat geval zou men, vóór deze „afweerstoffen” zijn aangetoond, beter aan kunnen nemen, dat genoemde remmingen in den groei van de tumoren terug te brengen zijn op belemmeringen in groei van het internodium, waarop zij zich bevinden.

Dit zou men zich veroorzaakt kunnen denken doordat de tumor een gedeelte van den sapstroom tot zich trekt.

Zoolang echter dit verband met den groei niet door metingen is aangetoond, schijnt het mij beter te besluiten tot den een of

anderen vorm van immuniteit en wel hoofdzakelijk om de volgende reden:

De remming, die de onderste tumor op den bovensten uitoefent, is reeds te constateeren wanneer deze onderste tumor nog zoo klein is, dat hij de groeiende deelen erboven onmogelijk kan beïnvloeden door het onttrekken van groote hoeveelheden voedingsstoffen. Verder komt het mij voor, dat een groeiremming van het plantendeel boven den tumor wel zeer sterk zou moeten zijn, dus duidelijk aan den dag moet treden, wil zij geheel aansprakelijk gesteld kunnen worden voor de groote verschillen in tumorgroei. Dit nu was bij bovengenoemde proeven zeker niet het geval (zie hiervoor ook photo 5). Tevens zal men in het oog moeten houden, dat immuniteit en groeiremming elkaar in hun uitwerkingen op den groei van de tumoren wederzijds zullen versterken, zoodat, al worden groeiremmingen van de internodiën gevonden, deze nog niet de eenigste factor behoeven te zijn.

## HOOFDSTUK IX.

### OVER DE LOCALISATIE VAN *PS. TUMEFACIENS* IN PLANTEN MET TUMOREN

Voordat nader onderzocht kon worden, of er aanwijzingen te vinden zijn, dat de in de vorige hoofdstukken beschreven verschijnselen op een resistentieverhoging tegen de parasiet berusten, die het gevolg is van de vorming van bepaalde stoffen door de plant, moest eerst worden uitgemaakt of:

1. *Ps. tumefaciens* uit de tumoren en de stengelstukken boven de tumoren te isoleeren is en zoo ja, hoever boven de tumoren hij dan nog voorkomt;
2. de zoo verkregen bacteriën nog virulent zijn, of hun virulentie geheel of gedeeltelijk verloren hebben.

Dat *Ps. tumefaciens* ook in deelen van de plant boven of onder de gezwellen aangetroffen zou worden, was waarschijnlijk, gezien de resultaten van Robinson en Walkden (1923), Hill (1928) en Hill c.s. (1930), die aantoonde, dat *Ps. tumefaciens* via de intercellulaire holtes in de plantenstengels tot op groote afstanden van de tumoren aangetroffen kan worden. Daar kunnen de bacteriën de vorming van z.g. „smooth tumors” veroorzaken, dat zijn verdikkingen die niet naar buiten doorbreken. Zij zijn vermoedelijk identiek met de zwellingen, welke E. F. Smith secundaire tumoren noemde, in den zin van de terminologie, die in de mensche lijke pathologie gebruikelijk is. Deze „smooth tumors” heb ik herhaaldelijk aangetroffen bij *Ricinus*, en wel op groote afstanden van de oorspronkelijke infectieplaatsen. Ook bij *Bryophyllum* (zie

photo 6) en *Impatiens* traden ze vaak op. Bij *Pelargonium* zag ik ze nooit.

Om nu te onderzoeken, of *Ps. tumefaciens* in de tumoren en de deelen van de plant daarboven en daaronder voorkomt, werd op de volgende wijze te werk gegaan:

Van *Ricinus*-, *Pelargonium*- en *Impatiens*-planten, die gezwollen hadden, veroorzaakt door inoculaties met stam 245, werden eerst de tumoren afgesneden. Deze tumoren waren bij *Ricinus* en *Impatiens*  $\pm$  2 maanden oud, bij *Pelargonium*  $\pm$  4 maanden. Allen waren zij nog gaaf. Vervolgens werd van de stengel stukken boven de gezwollen het onderste deel ( $\pm$  0,5 cm), dus hetgeen direct aan den tumor had gegrens, verwijderd. Van het stengeldeel, dat nu volgde, werd, van onderen af gerekend, een stuk van 1 tot 2 cm lengte afgesneden en deze stukken werden evenals de afgesneden tumoren, voorloopig in steriele erlenmeyers bewaard.

Bij de Balsemienien werden bovendien deelen van den stengel onder de gezwollen afgesneden.

Als controles bij deze proeven werden *Ricinus*- en *Pelargonium*-planten, die nooit met *Ps. tumefaciens* in aanraking waren geweest, op overeenkomstige wijze in stukken gesneden en deze tegelijk met die, afkomstig van de tumorplanten, verder onderzocht.

De verwerking van bovenbedoelde tumoren en stengeldeelen geschiedde direct na het snijden. De plantendeelen werden eerst in een blauw brandende vlam uitwendig gesteriliseerd en vervolgens in een steriele mortier fijngewreven. De zoo ontstane weefselbrij werd gemengd met steriele bouillon (recept zie hoofdstuk 10). Dadelijk daarna of in sommige gevallen 1 of 2 dagen later werden van deze extracten in bouillon uitstrijkcultures op platen van bouillonagar gemaakt. Natuurlijk werd voor elk nieuw te wrijven plantendeel eerst weer het mortier gesteriliseerd, door het met water en vervolgens met alcohol 96% uit te spoelen, waarna de alcohol, die in het mortier achterbleef, werd aangestoken. Hetzelfde gebeurde met den stamper.

De uitstrijksels van den bouillon + plantenextracten, afkomstig van de tumorplanten, leverden groote hoeveelheden bacteriën op, die in colonievorm varieerden van volmaakt ruw en droog tot glad slijmig. Van deze slijmige vormen waren er enkele — zoowel uit tumorextracten als stengelstukken daarboven — die groote overeenkomst vertoonden met de colonies van *Ps. tumefaciens* stam 245. Het grootste gedeelte was echter geplooid en gelek op stam Pfältzer.

De ruwe en droge vorm, die vrij veel voorkwam, was op het oog

niet te onderscheiden van de ruwe stammen van *Ps. tumefaciens* a, III, en 261, die op pg. 13 besproken zijn.

De extracten van de contrôleplanten gaven tot veel geringeren bacteriëngroei aanleiding, en verder waren deze bacteriën overwegend ruw en droog. Steriel waren de contrôleplanten dus geenszins, maar er was in kwantiteit en kwaliteit van de bacteriën een duidelijk verschil met de tumorplanten te zien, ook indien men voor deze vergelijking alleen van de bacteriën uit de stengelstukken boven de gezwellen uitging. Men ziet dus, dat uit tumoren en stukken van den stengel daarboven bacteriën te isoleren zijn en nu moest uitgemaakt worden, op welken afstand van de tumoren de bacteriën nog in de stengels voorkomen.

Hiertoe werden van *Ricinus*-planten, die alleen in het hypocotyl een tumor droegen, de stengels boven deze tumoren afgesneden en vervolgens in stukken verdeeld, elk van 2 cm lengte. Het vegetatiepunt met 2 daaronder liggende internodiën vormde het laatste stuk. Al deze stengeldeelen werden behandeld op de manier zooals boven is aangegeven.

Het resultaat was, dat uit alle deelen van den stam boven den tumor tot en met het vegetatiepunt bacteriën groeiden en weer was deze groei veel rijker en duidelijk verschillend van dien, welke planten zonder tumoren te zien gaven.

Nu werd onderzocht of onder deze bacteriën, die uit tumorplanten geïsoleerd waren, *Ps. tumefaciens* voorkwam, en zoo ja, of deze bacterie dan nog de sterke virulentie bezat, die aan den oorspronkelijken stam 245 eigen was.

Voor dit doel werden jonge *Ricinus*-planten met deze bacteriën geïnoculeerd. De cultures, welke gegroeid waren uit de extracten van *Pelargonium*- en *Impatiens*-tumoren en stengelstukken daarboven, werden als mengsel geïnoculeerd door middel van methode III. Die, welke afkomstig waren van de tumordragende *Ricinus*-planten werden eerst gescheiden, zoodat tenslotte geïnoculeerd kon worden met de verschillende types in reincultuur. Hierbij werd methode II gebruikt. Ter contrôle werden *Ricinus*-planten met een steriele naald geprikt.

Uit deze inoculatieproeven bleek duidelijk, dat de bacteriën veel van hun virulentie hadden verloren. De isolaties uit tumoren en stengelstukken van *Pelargonium* gaven alle op een na slechts ge-

ringe zwellingen; deze eene isolatie — afkomstig uit een tumor — veroorzaakte een groot gezwel.

De bacteriën uit tumoren van *Impatiens* waren voor een deel zeer virulent (2 van de 6 tumorisolaties). De overige isolaties uit de stengelstukken boven de tumoren en uit de tumoren zelf gaven slechts kleine zwellingen.

De inoculaties met de bacteriën uit de tumoren en stengelstukken van *Ricinus* toonden aan, dat de gladde slijmige culturen veel virulenter waren dan de ruwe droge vormen. Deze laatste gaven kleine zwellingen, de eerste echter bleken voor 50 % sterk virulent te zijn. Hieronder waren 2 isolaties uit stengelstukken boven de tumoren.

Alle zwellingen, die hierboven als klein worden aangeduid, waren slechts weinig grooter dan de wondcalluswoekeringen, die op de contrôleplanten ontstonden als gevolg van een prik met een steriele naald. Niettemin waren zij er meestal toch duidelijk van te onderscheiden.

Het is uit deze resultaten waarschijnlijk geworden, dat ook bij mijn proefplanten, evenals bij die van Robinson en Walkden, *Ps. tumefaciens* niet alleen in de tumoren, maar ook in de rest van de plant te vinden is. Tevens heeft een groot deel van de bacteriën onder invloed van de plant zijn virulentie vrijwel ingeboet. Dit is merkwaardig, wanneer men bedenkt, dat de stam 245 onder normale omstandigheden in reïncultuur gedurende vele jaren zijn virulentie heeft behouden. Verder heeft deze stam in de plant aanleiding gegeven tot de ontwikkeling van vormen, die in habitus afwijken van de normale groeiwijze van 245. Ook dit is opvallend, want stam 245 is in reïncultuur zeer constant. Nooit werden variaties van dezen stam opgemerkt, wanneer hij gekweekt werd op gunstige voedingsbodems als mout- en bouillon-agar. Ook na gegroeid te hebben in vloeibare mout of bouillon vertoonde hij bij overenting op agarbodems steeds weer den normalen karakteristieken gladden slijmigen groei.

Slechts wanneer een voor de ontwikkeling van bepaalde stadia van *Ps. tumefaciens* ongunstige voedingsoplossing werd gebruikt, kon na overenting van stam 245 uit deze voedingsoplossing op mout-agar een duidelijk afwijkende groeivorm waargenomen worden, die sterk het karakter van een ruwe variëteit had aangenomen. Dit was de reeds op pg. 21 opgegeven synthetische oplossing. Tegelijk met

den ruwen vorm kwamen in mijn proeven ook nog onveranderde 245-kolonies op. Deze waren echter in de minderheid. Het mengsel van deze 2 vormen gaf bij inoculatieproeven duidelijke tumoren.

Stapp (1931) heeft het gedrag van *Ps. tumefaciens* in deze oplossing bestudeerd en hij vond, dat de bacterie hierin niet overgaat tot de z.g. stervorming, die in den normalen cyclus van *Ps. tumefaciens* een belangrijke schakel schijnt te vormen. Dat dergelijke ruwe vormen bij *Ps. tumefaciens* kunstmatig verkregen kunnen worden, toonde het onderzoek van A. Quirk (1931) aan, die door deze bacterie te kweken in bouilloncultures van  $p_H$  6 of 7 naar keuze ruwe, avirulente of gladde, virulente groeivormen kon laten ontstaan (zie ook pg. 71).

Naar aanleiding van het gedrag van stam 245 in reïncultuur mag men wellicht aannemen, dat deze bacterie in de hier gebruikte proefplanten onder ongunstige omstandigheden groeit en daardoor dus van kenmerken verandert. Daar de zwak virulente vormen van stam 245 in de plant ook buiten den tumor voorkomen, is het niet uitgesloten, dat de remmende invloed van de tumoren op elkaar op de een of andere wijze verbonden is met de verspreiding van deze weinig tot avirulente vormen door de plant.

Om dit experimenteel te benaderen, werden proeven aangezet, waarbij jonge *Ricinus*-planten vlak onder de cotylen geïnoculeerd werden met den zeer weinig virulenten stam Pfältzer en den avirulenten stam a (zie pg. 13). Direct boven de cotylen in het eerste internodium, dat bij deze proeven nog zeer jong was, werd geïnoculeerd met stam 245. Als contrôles werden planten onder de cotylen met stam 245 en met een steriele naald geprikt; boven de cotylen in het eerste internodium kregen zij allen een inoculatie met 245. Deze proef werd in totaal met 24 planten gedaan, 12 proef- en 12 contrôleplanten.

Het resultaat was, dat inderdaad de tumoren in het eerste internodium bij de contrôles duidelijk grooter werden dan bij de proefplanten. De proefplanten, die met den stam Pfältzer in het hypocotyl waren geïnoculeerd, droegen daar kleine tumoren. Die welke met den avirulenten stam a waren geprikt, hadden in het hypocotyl geen tumoren.

Het voornaamste resultaat van de in dit hoofdstuk beschreven

proeven is, dat *Ps. tumefaciens* niet alleen in de tumoren, maar ook in de gezonde deelen van de plant te vinden is op tamelijk groote afstanden van de tumoren.

Verder is de virulentie van den zeer pathogenen stam 245 tijdens het verblijf in de planten sterk verminderd, hetgeen waarschijnlijk samenging met een verandering van de uiterlijk zichtbare kenmerken van deze bacterie.

Dit virulentieverlies van *Ps. tumefaciens* in de plant is opvallend en werd reeds door den eersten onderzoeker van *Ps. tumefaciens*, E. F. Smith (1911), gesignaleerd. Na hem hebben andere auteurs het verschijnsel eveneens waargenomen. Stapp (1927) legt er nog eens sterk den nadruk op.

Waardoor dit virulentieverlies in de plant wordt veroorzaakt, is onbekend. Het is echter niet onmogelijk, dat de bacteriophag hier een rol speelt.

Ten eerste is het bekend, dat in het algemeen onder invloed van een bacteriophag een verandering van gladde virulente bacteriën in ruwe avirulente vormen plaats kan vinden [zie voor een overzicht van de kwesties Topley en Wilson (1931) en Schlemper (1934)].

Ten tweede hebben Muncie en Patel (1930) aangetoond, dat een gladde vorm van *Ps. tumefaciens* in reïncultuur onder invloed van de phaag verandert in den ruwen vorm. Deze bleek in dit geval meer of minder resistent tegen de phaag. Muncie en Patel laten zich niet duidelijk uit over de pathogeniteit van dezen ruwen vorm; het is evenwel zeer waarschijnlijk, dat deze gering was geworden, gezien de algemeene ervaringen met andere pathogene bacteriën op dit gebied.

Ten derde is door de onderzoekingen van Israïlsky (1926, 1927), Brown en Quirk (1929), Muncie en Patel (1930) en Chester (1933) wel bewezen, dat de bacteriophag niet alleen uit reïncultures van *Ps. tumefaciens* is te isoleeren, maar ook uit gezwellen van planten, die met door de phaag besmette cultures waren verwekt. Chester (1933) tenslotte toont aan, dat men de phaag behalve uit de gezwellen, ook uit de stengeldeelen boven deze gezwellen kan isoleeren.

Het is dus niet onwaarschijnlijk, dat zich in de plant dezelfde verschijnselen kunnen voordoen als in vitro; d.w.z. onder invloed



van de phaag verandert de gladde virulente vorm van *Ps. tumefaciens* in een ruwe, weinig virulente variëteit. Het schijnt evenwel niet goed mogelijk, dat deze verandering in de plant zonder meer tot stand kan komen. Even goed als het in vitro pas na vele passages en filtraties gelukt, de bacteriën een bijna volkomen lyse te doen ondergaan met het resultaat, dat alleen de resistente (in dit geval ruwe) vormen in leven blijven, moet men in de plant de een of andere oorzaak veronderstellen, die het mogelijk maakt, dat de bacteriophaag zich sterk vermeerderd ten koste van de bacteriën.

Hoe men zich dezen invloed van de plant op het systeem bacterie-bacteriophaag moet denken, zal er van afhangen, welk standpunt men inneemt tegenover het wezen van de phaag. Vat men deze op als een doode stof, dan moet men aannemen, dat de bacterie onder invloed van de plant gevoeliger wordt voor de phaag, waardoor deze laatste zich dus sterk kan vermeerderen.

Wil men er van uitgaan dat de phaag een zelfstandig op de bacterie parasiteerend organisme is, dan kan bovenbedoeld effect zoowel verklaard worden door een virulentieverhoging van de phaag of een resistentievermindering van de bacterie tegen de phaag aan te nemen, twee processen, die onder invloed van de plant moeten verlopen.

Tenslotte moet er op gewezen worden, dat de verandering van gladde virulente in ruwe avirulente vormen door zeer veel verschillende oorzaken tot stand kan komen. De phaag zou in dat geval voor het tot stand komen van deze virulentievermindering van *Ps. tumefaciens* in het geheel geen rol behoeven te spelen.

Hoewel ik het volmaakt hypothetische karakter van bovenstaande beschouwingen geheel inzie, leken zij mij toch van belang in verband met de hierboven opgesomde resultaten en ook met de nu volgende onderzoekingen, waarbij werd aangetoond, dat de stam 245 van *Ps. tumefaciens*, die ik voor alle proeven gebruikte, besmet was met een bacteriophaag \*).

\*) Indien ik hier en in het vervolg woorden als „besmet“, „aantasten“ enz. gebruik wil ik mij daardoor in geen geval voor de organisme-theorie van de phaag verklaren. Ik kies deze bewoordingen slechts daar zij algemeen gebruikelijk zijn.

## HOOFDSTUK X.

### DE BACTERIOPHAAG VAN *PS. TUMEFACIENS* STAM 245

Zooals hierboven is uiteengezet, zouden de verschijnselen, die in de vorige hoofdstukken zijn beschreven, eventueel met behulp van een bacteriophage in de plant gedeeltelijk te verklaren zijn.

Daarvoor moest natuurlijk nagegaan worden, of de inoculatiecultuur, die bij al deze proeven werd gebruikt, met een phage besmet was. Indien dit niet het geval mocht blijken te zijn, wordt de rol van een bacteriophage bij gebruik van dezen stam als inoculatiecultuur zeer denkbeeldig, vooral waar de onderzoekers op dit gebied (Chester, 1933; Israïlsky, 1926) hebben aangetoond, dat planten zonder infectie met *Ps. tumefaciens* geen aantoonbare hoeveelheden phage bevatten.

Chester onderzocht gezonde stengels van *Pelargonium* en kon daarin geen phage tegen *Ps. tumefaciens* vinden. Bovendien werkte hij met gezonde wortels van *Beta* en hieruit konden in enkele gevallen phagen geïsoleerd worden, die werkzaam waren tegen *Ps. tumefaciens*. Chester verklaart de aanwezigheid van deze phage in gezonde wortels door aan te nemen dat hij er uit den bodem binnengedrongen is.

Israïlsky (1926) onderzocht eveneens gezonde bietenwortels op hun phagegehalte tegen *Ps. tumefaciens*, maar kon hier geen phage aantoonen. Bodemonderzoekingen wezen uit, dat de grond, waarin de bieten groeiden, eveneens geen phage bevatte, hetgeen de bovengenoemde veronderstelling van Chester bevestigt.

Daar het verder niet is in te zien, hoe zich bij het parasitaire proces tusschen een phagevrijen stam van *Ps. tumefaciens* en een phage-

vrije plant een bacteriophage zou kunnen vormen, moet men wel aannemen, dat de phagen, die uit gezwollen en deelen van planten in de nabijheid van deze gezwollen geïsoleerd worden, er tegelijk met de bacteriën ingekomen zijn.

Indien toch mocht blijken, dat tumoren, die met een bij voorafgaand onderzoek phaagvrij gebleken stam van *Ps. tumefaciens* waren verwekt, phagen tegen deze bacterie bevatten, dan is daar maar één waarschijnlijke verklaring voor: de bacteriën waren wel besmet met de phaag, maar deze was er zoodanig aan gebonden, dat hij met de gewone middelen van onderzoek niet aan te toonen was. Dit houdt dan tevens in, dat de bacteriën resistent waren tegen die phaag. Pas in de plant moeten in dat geval de omstandigheden zoodanig geworden zijn, dat de koppeling bacterie—phaag verbroken werd.

Dat deze mogelijkheid niet ondenkbaar is, bewijzen de resultaten van vele onderzoekingen over bacteriophagen [nadere gegevens bij d'Hérelle (1926)].

Het onderzoek naar de mogelijke rol, die een bacteriophage bij mijn proeven kon hebben gespeeld, moest dus als volgt worden ingedeeld:

- 1°. Is uit stam 245 van *Ps. tumefaciens* in reïncultuur een phaag te isoleeren? (pg. 81).
- 2°. Is hetzelfde mogelijk voor de perssappen van tumoren en plantendeelen boven of onder gezwollen, veroorzaakt door dezen stam 245? (pg. 83).

Voor de oplossing van deze vragen werd in hoofdzaak de methode gevolgd, die Chester (1933) bij een soortgelijk onderzoek bezigde. Vóór ik begin met de resultaten dezer proeven te noemen, wordt eerst een overzicht van deze werkwijze gegeven.

#### Het maken der voedingsoplossing.

Als medium, waarin de bacteriophagewerking werd bestudeerd, werd een bouillon-pepton-NaCl-oplossing gebruikt, van een samenstelling, waarmede Chester de beste resultaten bereikte.

De bouillon werd als volgt bereid:

2 kg fijngehakte magere paardenbiefstuk werd in  $\pm 9$  l  $H_2O$  eenige uren gekookt, totdat  $\pm 1$  l water verdampt was. Vervolgens werd de brij snel

gefiltreerd. De zoo verkregen vloeistof werd dan gesteriliseerd gedurende een half uur bij 0,5 atm. overdruk en vervolgens nog eens gefiltreerd door gewoon filtreerpapier.

Daarna werden er 20 gr NaCl in opgelost, waarna nogmaals werd gefiltreerd. De pH werd met NaOH bijgesteld op 6,8. Vervolgens werd weer gesteriliseerd.

Meestal was de bouillon, na nogmaals gefiltreerd en gesteriliseerd te zijn, helder. Het is natuurlijk voor deze proeven noodzakelijk over volkomen heldere bouillon te beschikken.

Wanneer de vloeistof helder was, werden reageerbuisjes — die een inwendigen diameter van 16 mm hadden — gevuld met 10 ccm van deze bouillon. Van tevoren werden op die wijze groote hoeveelheden buizen klaargemaakt, die, na gesteriliseerd te zijn, in voorraad werden gehouden.

Op deze wijze was het zeker, dat voor vele opeenvolgende proefseries bouillon van dezelfde samenstelling werd gebruikt. De  $p_H$  werd na de laatste sterilisatie nogmaals gecontroleerd en bleek steeds  $\pm 6,8$  te zijn.

Als voedingsbodem voor de bacteriën, die als teststam dienst deden, werd mout-agar gebruikt.

### De constructie van filtertoestellen.

Voor het filtreren van de cultures gebruikte ik collodiummembranen, die in porseleinen kroesjes volgens Bechhold—König werden gegoten.

Daar het bij deze membranen slechts met behulp van een vacuum mogelijk was, een snelle filtratie van de vloeistoffen te verkrijgen, werden de filterkroesjes, vóórdat zij met de collodium behandeld werden, luchtdicht op zuigflesschen bevestigd zooals hieronder schematisch is weergegeven (tekstfig. 2).

Zooals men in dit schema ziet, werden de kroezen (a) met een gummiring (b) bevestigd op een glazen trechter (c).

Deze trechter is door de gummistop (d) van de zuigflesch (e) heengestoken en aan de uitmonding van den trechter hangt een glazen buis (f), die daar met watten stevig aan bevestigd is.

Het filtraat werd in deze buizen opgevangen, omdat meermalen was gebleken, dat er infecties optraden, indien het filtraat direct in de zuigflesch kon druppelen. Dit werd veroorzaakt, doordat men na de filtratie het vacuum moet opheffen, waarbij natuurlijk het binnenstroomen van niet steriele lucht onvermijdelijk is.

Moet deze lucht echter eerst nog de stijf aangedraaide watten, waarmede het buisje aan den trechter is verbonden, passeeren, dan zijn infecties met fungi en bacteriën uitgesloten. Ook heeft men het groote gemak, dat de filtraten niet afgeschonken behoeven te worden, hetgeen de mogelijkheid van infectie eveneens vermindert.

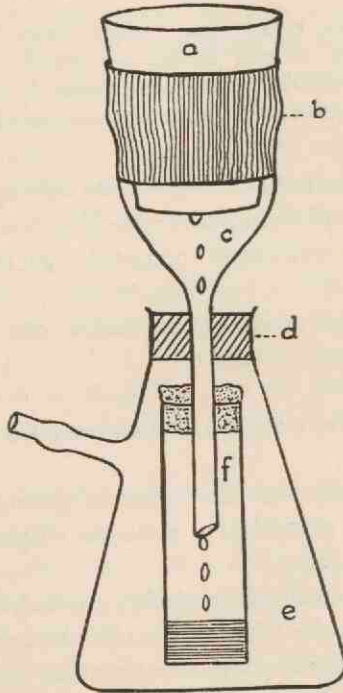


Fig. 2.

Wanneer het filtertoestel op deze wijze was samengesteld, werd het geheel 30 min. bij 0,5 atm. overdruk gesteriliseerd. Nadat alles was afgekoeld, werden de kroezen met collodium behandeld.

De hiervoor gebruikte collodium had de volgende samenstelling:

- 10 gr Gossypium Collodii
- 250 ccm aether
- 625 ccm alcohol 96 %.

De schietkatoen werd eerst geïmbibeerd met de alcohol. Vervolgens kwam de aether erbij, waarin de schietkatoen oplost. Het duurde geruimen tijd, voordat dit volledig gebeurd was.

Deze oplossing werd gebruikt nadat eerst was getest, of zij geen bacteriën doorliet.

Het is een oplossing, die veel minder geconcentreerd is, dan die, waarvan d'Hérèlle (1926) aangeeft, dat zij alle ultravira en phagen doorlaat, zoodat hier met zekerheid mocht worden aangenomen, dat de phaag van *Ps. tumefaciens* er niet door zou worden tegengehouden.

De steriele, droge kroezen werden met deze oplossing gevuld. Door de collodium er vervolgens weer uit te laten loopen, terwijl het kroesje voortdurend gelijkmatig gedraaid werd, kon bereikt worden, dat het collodiumlaagje op den binnenwand van het kroesje overal dezelfde dikte kreeg.

Na  $\pm 5$  min. werd het kroesje gevuld met steriel water ter fixeering van het membraan.

Dit water werd nu om de 20 min. drie keer ververscht, zoodat men vrij zeker kon aannemen, dat na de laatste verversching geen groote hoeveelheden alcohol of aether meer uit het membraan konden oplossen, en dat zodoende een toxisch effect op de te filtreen vloeistoffen uitgesloten was.

Er werden voor de filtratie steeds 8 van dergelijke filtertoestellen tegelijk gebruikt, die allen op een waterstraal-pomp aangesloten konden worden, zoodat het mogelijk was, 8 verschillende filtraten gelijktijdig te bewerken.

De kroezen moesten na elke filtratie gegloeid worden, totdat alle organische resten verascht waren. Daarna werden zij uitgespoeld met water en gedroogd.

Wanneer de filtratie was afgelopen, wat voor  $\pm 16$  ccm filtraat ongeveer 60 min. duurde, werd in de meeste gevallen direct begonnen met de verdere verwerking van de filtraten.

Door bepaalde omstandigheden bleef het filtraat echter wel eens een nacht staan, hetgeen aan de resultaten niets veranderde.

In het volgende vindt men een nauwkeurige beschrijving van de methodes, die bij het onderzoek dezer filtraten gebezigd werden.

Het enten van den bouillon en de daarop volgende toevoeging der filtraten.

Steeds werd van te voren de bouillon geënt met de bacteriën, die later — na toevoeging van de te onderzoeken filtraten — de aan-

wezigheid van lyse veroorzakende bestanddeelen in die filtraten zichtbaar moesten maken. Deze bacteriën moeten, wil men onder zoo gunstig mogelijke voorwaarden voor de aantooning van geringe hoeveelheden bacteriophag werken, zelf vrij van bacteriophag en tevens goed gevoelig ervoor zijn.

Gebruikt men als bacteriestam voor de test een cultuur, die min of meer met een phaag is besmet, dan zullen de contrôlebuizen — die dus alleen met deze bacteriën geënt werden — een lyse vertoonen, die natuurlijk in sterkte afhangt van verschillende factoren, o.m. van de hoeveelheid phaag, die de teststam bevat.

Indien deze besmetting met phaag niet te sterk is, dan zal een dergelijke stam zeer wel te gebruiken zijn voor het aantonen van een grootere hoeveelheid phaag in de filtraten, vooropgesteld natuurlijk, dat er onder de met phaag besmette testbacteriën voldoende individuen voorkomen, die phaagvrij zijn. Volgens de algemeen geldende opvatting toch, zijn de met phaag besmette bacteriën min of meer resistent tegen die phaag geworden, zoodat alleen de phaagvrije individuen in de buizen, waarin een extra hoeveelheid bacteriophag toegevoegd wordt, deze kunnen indiceeren door een sterkere lysse.

Chester (1933) begon te experimenteeren met een teststam (*Ps. tumefaciens* Chrys. 2b Stapp), die bij nadere beschouwing besmet bleek te zijn met een phaag en ondervond daarbij moeilijkheden, want een duidelijk verschil tusschen contrôle- en proefbuizen was niet met eenige regelmaat te constateeren. Daarom heeft hij getracht, uit dezen stam individuen te isoleeren, die vrij van de phaag waren, hetgeen hem gelukte.

Daartoe werd de stam uitgezaaid op agarplaten en vervolgens werden van 13 geïsoleerd gegroeide colonies nieuwe cultures aangelegd. Twee van deze 13 stammen bleken — bij verdere bestudeering — vrij van de phaag te zijn. In bouillon manifesteert zich dit verschijnsel, doordat de phaagvrije stammen dezen bouillon doorlopend troebel houden, terwijl er weinig agglutinaat in ontstaat. Is de stam besmet, dan wordt de bouillon na eenigen tijd helder en komt er veel agglutinaat.

De stam, die voor mijn experimenten het meest in aanmerking kwam, om als teststam dienst te doen, was *Ps. tumefaciens* stam 245.

Wanneer met 24 h oude cultures van dezen stam op mout-agar, bouillon werd beënt zoodanig, dat de bouillon direct na het enten nog niet zichtbaar troebel was, dan bleek deze na 24 h tot 48 h bij kamertemperatuur homogeen troebel te worden. Na verdere 1—2 dagen begon zich een gladde pellicula te vormen en de bouillon bleef troebel. Pas na 10—14 dagen begon er een duidelijke afname van de troebeling op te treden. Steeds verzamelden zich op den bodem van de buizen vrij groote hoeveelheden agglutinaat.

Daar het niet zeker was, of stam 245 phaagvrij was, werden van uitzaaiingen van dezen stam op agarplaten subcultures van 10 geïsoleerde colonies gemaakt.

Deze vertoonden echter na enting in bouillon geen duidelijke verschillen in groei, zoodat deze poging tot het isoleeren van phaagvrije individuen, voorloopig werd gestaakt.

Het bleek bij de hieronder te beschrijven proeven, dat de stam 245 wel was te gebruiken als teststam, niettegenstaande aangetoond kon worden, dat hij met phaag was besmet.

Dezelfde ervaringen heeft *Israelsky* (1926, 1927) opgedaan bij een onderzoek naar het voorkomen van bacteriophagen tegen *Ps. tumefaciens* in tumoren van bieten. De stam, dien hij gebruikte, om deze phaag aan te toonen, bleek bij een ouderdom van 24 uur geen bacteriophag in aantoonbare hoeveelheid te bevatten (*Israelsky* 1926, S. 240). Daarentegen kon uit cultures van denzelfden stam, wanneer deze ongeveer een maand oud waren, wél een phaag geïsoleerd worden (*Israelsky* 1927, S. 307).

Het leek mij dus gewenscht van den stam 245 steeds 24 uur oude of nog jongere cultures te gebruiken bij de enting van de proef- en contrôlebuizen.

Daartoe werd deze stam elken dag opnieuw op een groot aantal buizen met mout-agar overgeënt.

De enting van de bouillonbuizen bestemd voor een proef met filtraten werd begonnen, zoodra de filtratie afgelopen was. Daartoe werden van de 24 uur oude mout-cultures van stam 245 suspensies in bouillon gemaakt, zoodanig dat 0,05 ccm van deze suspensie  $10^6$ — $10^7$  bacteriën inhield.

Een dergelijke suspensie kon steeds zonder moeite verkregen worden, daar eerst door middel van buizen met mastixsuspensies, van verschillende dichtheid vastgesteld was met welken graad van



troebelheid van de mastixbuizen de gewenschte bacteriënsuspensie overeenkwam. Deze mastixbuis werd gemerkt en in het vervolg steeds gebruikt als maat van troebelheid voor de entsuspensie. De hoeveelheid bacteriën in 0,05 ccm van een suspensie werd van te voren bepaald door verdunningen te maken in een reeks bouillonbuizen.

Voor het enten werd steeds dezelfde pipet gebruikt, die per druppel precies 0,05 ccm leverde.

Wanneer de bacteriesuspensie den vereischten graad van dichtheid had verkregen, werden door middel van deze pipet alle voor de proef benodigde bouillonbuizen elk met 1 druppel geënt.

Daarna werd direct overgegaan tot het inbrengen der filtraten.

Per buis werden na de eerste filtratie 2 ccm filtraat, na de volgende passages en filtraties daarentegen steeds slechts 0,5 ccm filtraat toegevoegd.

Met elk filtraat werden op deze wijze steeds 4 bouillonbuizen geënt, zoodat men voor het beoordeelen van het effect niet op één buis was aangewezen, hetgeen bij mogelijke variabiliteit van de werking natuurlijk tot groote fouten aanleiding had kunnen zijn.

Natuurlijk werden er steeds 4 buizen, die alleen 1 druppel bacteriesuspensie hadden gekregen, als contrôle gebruikt. Alle buizen kregen een nummer, zoodat zij individueel gecontroleerd konden worden, indien dat ten gevolge van variaties in de sterkte van het effect noodig mocht blijken te zijn.

Behalve de bovengenoemde contrôlebuizen werd bij de proeven met filtraten van perssappen uit tumoren enz. nog een tweede soort contrôles gebruikt, die bij de behandeling dier proeven ter sprake zal komen.

Voor het beoordeelen van den graad van opheldering in de proefbuizen werden deze tegelijk met de contrôlebuizen vergeleken met een reeks van mastixsuspensies van opklimmende dichtheid. Deze contrôlemethode, die bij doorvallend licht tegen een donkeren achtergrond het beste voldeed, is ongeveer dezelfde, die *C h e s t e r* uitgewerkt heeft. De mastixsuspensies waren als volgt samengesteld:

Van Oranje G werd een oplossing gemaakt in een mengsel van 50 deelen alcohol 96% en 50 deelen aqua dest. zoodanig, dat de kleur bij benadering overeenkwam met de hier gebruikte bouillon. Reageerbuisjes werden elk gevuld

met 10 ccm van deze oplossing.

Vervolgens werden 2 gr mastixkralen in 100 ccm alcohol 96% opgelost. Van deze oplossing werden in de buizen met Oranje G een opklimmend aantal druppels van 0,05 ccm gevoegd. Zoo verkreeg ik de testbuizen 1—4.

Testbuis 1 kreeg 1 druppel van de mastixoplossing

„ 2 „ 2 druppels „ „ „

„ 3 „ 3 „ „ „ „

„ 4 „ 4 „ „ „ „

Op deze wijze ontstonden suspensies die onder elkaar duidelijke verschillen in troebelheid vertoonden zonder dat deze verschillen echter te groot werden.

De buizen werden met een kurk afgesloten en bleven gedurende 4 maanden homogeen troebel zonder vorming van een neerslag.

Werd de Orange G opgelost in aqua dest., dan ontstonden na toevoeging van de alcoholische mastixoplossing zulke sterke neerslagen, dat een duidelijk verschil tusschen de testbuizen niet te constateeren was.

Een nadeel bij het gebruik van zoo samengestelde testbuizen is de onmogelijkheid suspensies van dezelfde kleur als de bouillon met bacteriën te verkrijgen. Evenwel, na eenige oefening wordt deze methode zeer bruikbaar voor kwalitatieve proeven, waar het hier om te doen was.

Het dient hier nog te worden opgemerkt, dat alle proeven met bacteriophag gebeurden bij  $\pm 18^{\circ}$  C.

Na deze methodische uiteenzettingen volgen hier de resultaten van het eerste deel van dit onderzoek.

I. Is *Ps. tumefaciens* stam 245 phaagvrij of bevat hij een phaag in aantoonbare hoeveelheden?

Deze vraag werd als volgt opgelost: Bouillonbuizen geënt op de hierboven aangegeven wijze met den te onderzoeken stam, werden na  $\pm 5-6$  dagen groei gefiltreerd. Van dit filtraat werd 2 ccm gevoegd bij nieuwe bouillonbuizen, die ook weer met denzelfden stam waren geënt. Na  $5-6$  dagen werden ook deze buizen weer gefiltreerd. Dit gebeurde verscheiden keeren achter elkaar.

Inderdaad bleken reeds na  $3-4$  passages van  $5-6$  dagen geringe verschillen in troebelheid tusschen de buizen met filtraten en de contrôlebuizen op te treden. Deze werden na verdere passages niet veel duidelijker. In tabel 22 ziet men deze verschillen uitgedrukt door het teeken +. Deze teekens duiden een zekeren graad van helderheid van de proefbuizen aan vergeleken met de contrôles. De af-

TABEL XXII

De werking van de in cultures van *Ps. tumefaciens* stam 245 aanwezige bacteriophage. Voor de beteekenis der +-teekens zie de tekst. \* Beteekent dat de reeks niet verder doorgezet werd.

Passages	PROEFREEKS		
	1	2	3
1	+	+	+
2	+++	-	+
3	++	++	+
4	++	-	.
5	++	++	.

stand tusschen twee van de boven beschreven mastixsuspensies werd denkbeeldig in 4 trappen verdeeld en elk van deze trappen door een +-teeken aangeduid. Was dus een proefbuis even troebel als mastixbuis 2 en een contrôlebuis als mastixbuis 3, dan wordt de graad van helderheid van de proefbuis hier opgegeven als ++++.

Deze verschillen met de contrôles verdwenen, wanneer de filtraten voor het pipetteeren 2 min. op 100° C werden verhit. Nog op andere wijze werd het voorkomen van een thermolabiele lyseverwekkende stof in de filtraten van bouillon + *Ps. tumefaciens* stam 245 aangetoond.

Van het filtraat van de 4de en 5de passage in tabel 22 bedoeld, werd 8 ccm afgepipetteerd en verdeeld over 2 leeg steriele buizen. De eene buis werd 2 min. op 100° C verhit, de andere buis niet. Vervolgens werden beide buizen elk met 8 druppels van de suspensie geënt. In dit geval kon dus het onverdunde filtraat inwerken.

Het resultaat is een duidelijk onderscheid in troebeling tusschen het gekookte en ongekookte filtraat. Het laatste is belangrijk helderder.

Het optreden van een verschil tusschen proef- en contrôlebuizen bij elke passage ontwikkelde zich slechts zeer geleidelijk. Na 48 uur was er bij de verdunde filtraten nooit enig verschil op te mer-

ken. Pas na 3—5 dagen, soms ook na nog langeren tijd, werden de verschillen goed duidelijk. Dit is ook de reden waarom hier de passages zoo lang duurden.

Bij de onverdunde filtraten daarentegen trad het verschil veel sneller op, maar het manifesteerde zich eerst door een sterkere troebeling in de buizen met het ongekookte filtraat, vergeleken bij die welke 2 min. op 100° C waren verhit. Dit is in overeenstemming met de volgende waarnemingen van d'Hérelle (1926) en anderen: De bacteriophagaag kan soms beginnen met een stimulatie van den bacteriegroei, waarna de lyse optreedt.

Een volkomen opheldering werd bij inwerking van filtraten van stam 245 op dienzelfden stam na het aantal passages, dat bij deze proeven werd gebruikt, niet bereikt, ook daar niet, waar het filtraat onverdund kon inwerken.

De conclusie, die uit dit deel van het onderzoek te trekken valt, is dus, dat *Ps. tumefaciens* stam 245 met een phaag is besmet, die door middel van de hierboven aangegeven methode is aan te toonen. Deze phaag bereikt na 5 passages van 5—6 dagen elk, nog niet die concentratie in het onverdunde filtraat, welke vereischt is voor een volkomen opheldering van bovengenoemde suspensie, wanneer de bacteriën in de aangegeven hoeveelheid aan het filtraat worden toegevoegd.

## II. Is in de tumoren en stengelstukken boven of onder de tumoren een phaag aan te toonen?

Het is duidelijk, dat deze vraag niet met zekerheid positief beantwoord kan worden, indien niet tevens blijkt, dat de phaag, die men uit de tumoren en stengelstukken boven of onder deze tumoren verkrijgt, een sterkere werking vertoont na evenveel passages door-gemaakt te hebben dan die, welke uit den teststam 245 zelf afkomstig is. Men voegt immers bij elke nieuwe passage het filtraat van de vorige toe. Dit filtraat echter bevat niet alleen phaag uit de plantenextracten, maar ook — zooals uit het voorafgaande blijkt — die, welke deel uitmaakt van den teststam zelf.

Deze proeven werden dus met de volgende series van buizen opgezet:

1. Contrôle 1: 4 buizen, die slechts een druppel van de entsuspensie kregen.
2. Contrôle 2: 4 buizen, die behalve een druppel van de entsuspensie eerst 2 ccm en bij de volgende passages 0,5 ccm van de filtraten der vorige passages van deze zelfde buizen kregen.
3. Proefbuizen: 4 buizen, die behalve een druppel entsuspensie eerst 2 ccm en vervolgens 0,5 ccm filtraat van de vorige passages met tumor- resp. stengelextracten kregen \*).

De proeven werden gedaan met tumoren en stengels boven de

TABEL XXIII

*Ricinus*: Werking van de bacteriophag uit extracten van tumoren en stengelstukken vergeleken bij contrôle 2. De gegevens zijn voor elk extract apart vermeld. In deze tabel beteekent een t achter de cijfers, dat het extract van een tumor afkomstig is. Hetzelfde getal zonder t duidt het extract uit het bijbehorende stengelstuk aan.

Voor de beteekenis van de + teekens zie den tekst (pag. 81).

Passages	PROEFREEKS									
	1	1t	2	2t	3	3t	4	4t	5	5t
2	—	—	+	—	+	—	++	++	++	++
3	++	++	++	+	—	—	+	+	++	++
4	+++	++++	+	+	.	+	++	++++	++	++
5	.	.	.	.	.	.	.	.	+++	+++

tumoren van *Ricinus*, *Pelargonium* en *Impatiens*, bij de laatste bovendien nog met stengelstukken onder de tumoren.

Op deze wijze werden van *Ricinus* 5 tumoren en 5 stengelstukken, van *Pelargonium* 4 tumoren en 4 stengelstukken en van *Impatiens* eveneens 4 tumoren en 4 stengelstukken onderzocht. De tumoren en stengelstukken werden gesneden en behandeld zooals op pg. 67 is opgegeven.

\*) De steriliteit van elk filtraat werd bij elke proef op moutagar getest. Verontreinigingen bleken nooit voor te komen.

TABEL XXIV

*Pelargonium*: Werking van bacteriophage uit extracten van tumoren en stengelstukken; verdere verklaring zie vorige tabel en tekst (pag. 81).

Passages	PROEFREEKS							
	1	1t	2	2t	3	3t	4	4t
2	—	+	—	—	+	—	+	++
3	+	+	+	+	+	+	+	—
4	—	+	+	+	—	—	—	—
5	++	++	+	++	++	.	+	++
6	—	++	++	++	++	.	++	++

TABEL XXV

*Impatiens*: Werking van bacteriophage uit extracten van tumoren en stengelstukken; o beteekent, dat in de reeks een extract van een stengelstuk onder de tumor werd gebruikt. Verdere verklaring zie tabel 24 en tekst (pag. 81).

Passage	PROEFREEKS		
	1t	2t	4o
2	+	+	++
3	+	+	+
4	+++	+++	+++
5	++	++	++

Nadat de weefselbrij 4—5 dagen in den bouillon was gebleven, werd voor den eersten keer gefiltreerd. Dit kan men als eerste passage in aanmerking nemen, hoewel hier geen andere

bacteriën werden toegevoegd dan die, welke reeds in de weefselbrij aanwezig waren. Toch heb ik dit groeien in bouillon als 1ste passage opgevat en dus moest daarmede rekening worden gehouden bij de vergelijking met contrôle 2.

In de tabellen 23, 24 en 25 ziet men achtereenvolgens de resultaten met de extracten van *Ricinus*, *Pelargonium* en *Impatiens*.

Zooals uit deze tabellen blijkt, is het verschil tusschen de proefbuizen en de contrôles 2 tamelijk duidelijk. Ook hier is echter met het verdunde filtraat nergens een volkomen opheldering opgetreden.

Anders was dat met de proeven met de onverdunde filtraten, die bij deze series eveneens gedaan werden.

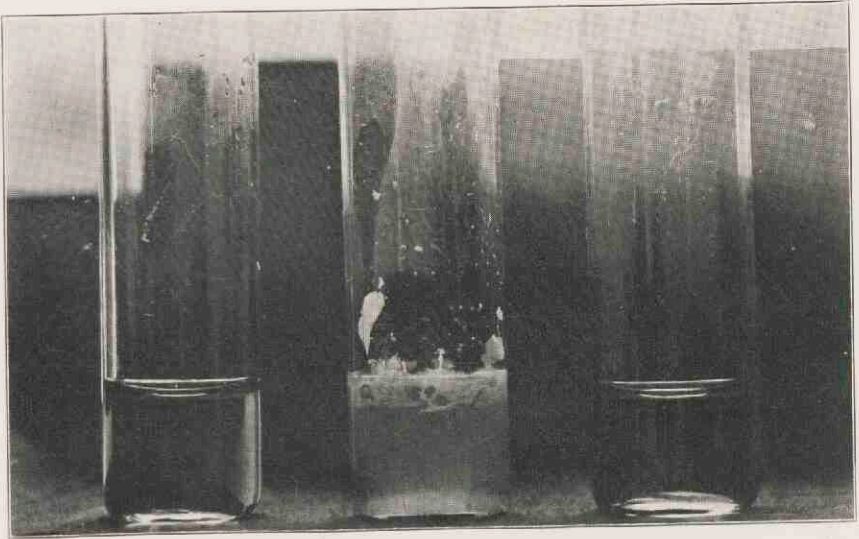
Twee onverdunde filtraten afkomstig van *Ricinus*-tumoren en een onverdund filtraat van een *Ricinus*-stengelstuk boven den tumor gaf na enting met 8 druppels bacteriesuspensie in 4 ccm filtraat een volkomen opheldering, d.w.z. ook na weken trad in deze filtraten geen groei meer op. Zij bleven dus helder.

Op photo 7 ziet men de twee tumorfiltraten en daartusschen het bijbehorende filtraat van contrôle 2. Deze filtraten waren afkomstig van de 4de passage.

Op photo 8 ziet men het filtraat van het stengelstuk boven een tumor van een andere plant als de twee eerstgenoemde filtraten. Daarnaast staat een buis, die hetzelfde van te voren 2 min. op 100° C verhitte filtraat bevat. Dit was een filtraat van de 5de passage.

Drie dagen nadat in de buizen met de tumorfiltraten de lyse volkomen was geworden, werden uit deze buizen en uit de buis, waarin zich het filtraat van contrôle 2 bevond, entingen gedaan op bouillon-agar. Op alle platen kwamen bacteriën op, maar de platen, geënt met de tumorfiltraten vertoonden pas 2—3 dagen later groei, dan die, welke met contrôle 2 waren geënt. Het aantal bacteriënkolonies was bij de filtraatplaten veel geringer. De kolonies, die ontstonden, vertoonden het gladde type.

6 dagen na de volledige opheldering van het filtraat van het *Ricinus*-stengelstuk boven den tumor (zie photo 8) begon hierin opnieuw een troebeling op te treden. Nu werden hieruit en uit de nog altijd duidelijk troebeler buis, die het gekookte filtraat bevatte, uitstrijkcultures gemaakt op moutagar-buizen met het resultaat, dat op



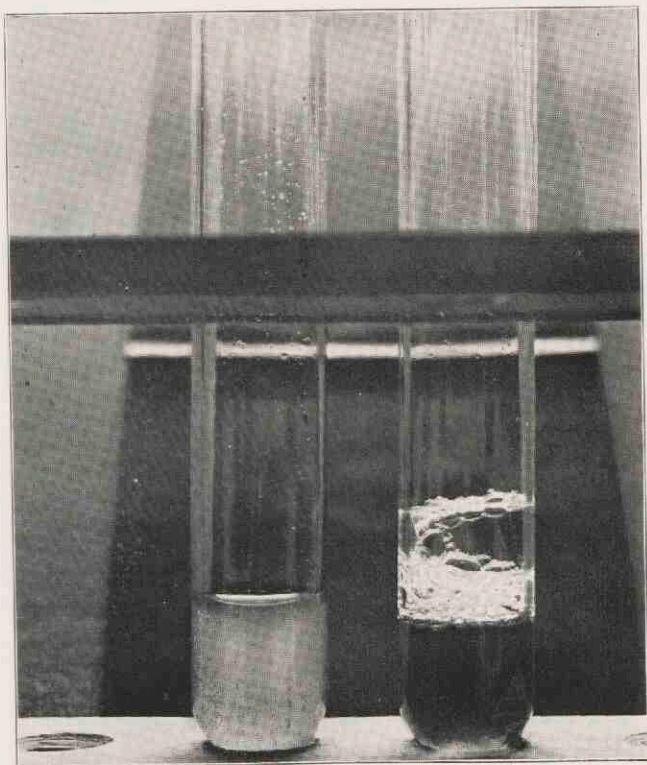
1

2

3

**Photo. 7** — Zie pag. 84. Buizen 1 en 3 bevatten onverdunde tumorfiltraten na de 4de passage. Buis 2 bevat het onverdunde filtraat van contrôle 2. Alle 3 de buizen werden met dezelfde bacteriën hoeveelheid geënt. Gephotografeerd 30 dagen daarna. Voor het photografeeren werden de drie buizen geschud.





1

2

**Photo 8.** — Zie pag. 85—86. Buis 1 bevat 2 min. op 100° verhit filtraat, buis 2 bevat hetzelfde filtraat, doch onverhit. Beide buizen werden met dezelfde hoeveelheid bacteriën geënt. Beide buizen werden voor het photografeeren geschud. De vloeistof in buis 2 was sterk visceus geworden (zie luchtblazen).

de agarbuizen, beënt met de gekookte filtraten, groei optrad (gladde vorm), op de andere buizen groeide niets.

Er moet hier naar voren gebracht worden, dat dit de drie eenigste gevallen waren, waarin een volkomen opheldering te zien was. Bij geen van de andere onverdunde filtraten trad zij op. Wel traden ook hier vaak duidelijke verschillen met contrôle 2 op, maar een zoo frappant verschil als in bovengenoemde drie gevallen was niet te zien.

Hoogst onaangenaam was ook het verschijnsel, dat de filtraten na een bepaalde passage een duidelijk effect gaven, dat dit effect na een volgende filtratie sterk verminderde, om na verdere filtraties weer sterker te worden (zie bij voorbeeld tabel 23). Wellicht moet hier gedacht worden aan wisselende gevoeligheid van den teststam.

In de buizen, waar geen volledige opheldering optrad, werd het verschil tusschen proef- en contrôlebuizen na verloop van minstens 10 dagen geringer.

Dat de verschillen na 7 dagen nog duidelijk te zien waren, blijkt uit photo 9, die een proef weergeeft met extracten van *Impatiens* (4de passage). Men ziet op deze photo afwisselend contrôlebuizen 1 en proefbuizen. De nuances in troebelheid komen hier goed uit.

Ongetwijfeld zouden bovenstaande resultaten nog sprekender uitgevallen zijn, indien de phaag meer passages had doorlopen en vooral wanneer gewerkt had kunnen worden met een phaagvrijen teststam. Dat desondanks duidelijke verschillen optraden, verhoogt de waarde van de geconstateerde feiten.

Hoewel het aantal proeven hier gering was, schijnt het mij geoorloofd — ook in verband met de gelijklopende resultaten van Brown en Quirk (1929), Muncie en Patel (1930), Israïlsky (1926) en Chester (1933) — daaruit de volgende conclusies te trekken:

Uit 3 van de 5 onderzochte *Ricinus*-planten met tumoren was een phaag te isoleeren, die duidelijk sterker werkzaam was onder corresponderende omstandigheden dan de phaag, die de gebruikte teststam *Ps. tumefaciens* stam 245 bevatte. In alle andere gevallen waren de filtraten, verkregen uit de planten met tumoren, weliswaar sterker werkzaam dan die, welke de teststam zelf leverde, maar deze werking haalde niet bij de drie zoo juist genoemde.

Het is hier de aangewezen plaats voor de volgende vraag:

Is de phaag in de plant virulenter geworden, of was de beginconcentratie van phagen in de plantenextracten grooter dan die, welke *Ps. tumefaciens* stam 245 bevat?

De eerste veronderstelling mag men m.i. pas dan bewezen achten, wanneer het onmogelijk is, de phaag, die stam 245 bevat, door nog meer passages als hierboven werden doorgevoerd, te brengen tot dezelfde activiteit als de phagen uit de tumorextracten.

Chester (1933), die de meening is toegedaan, dat de phaag in de plant virulenter wordt, heeft deze kwestie, voorzoover uit zijn publicatie is op te maken, niet nagaan.

De oplossing van de bovengestelde vraag is overigens voor het immuniteitsvraagstuk van minder belang, aangezien aangenomen moet worden, dat de plant een invloed uitoefent òf op de virulentie van de phaag, òf op de gevoeligheid van de bacterie. In elk geval hebben wij te maken met een actieve rol, die de plant in deze speelt.

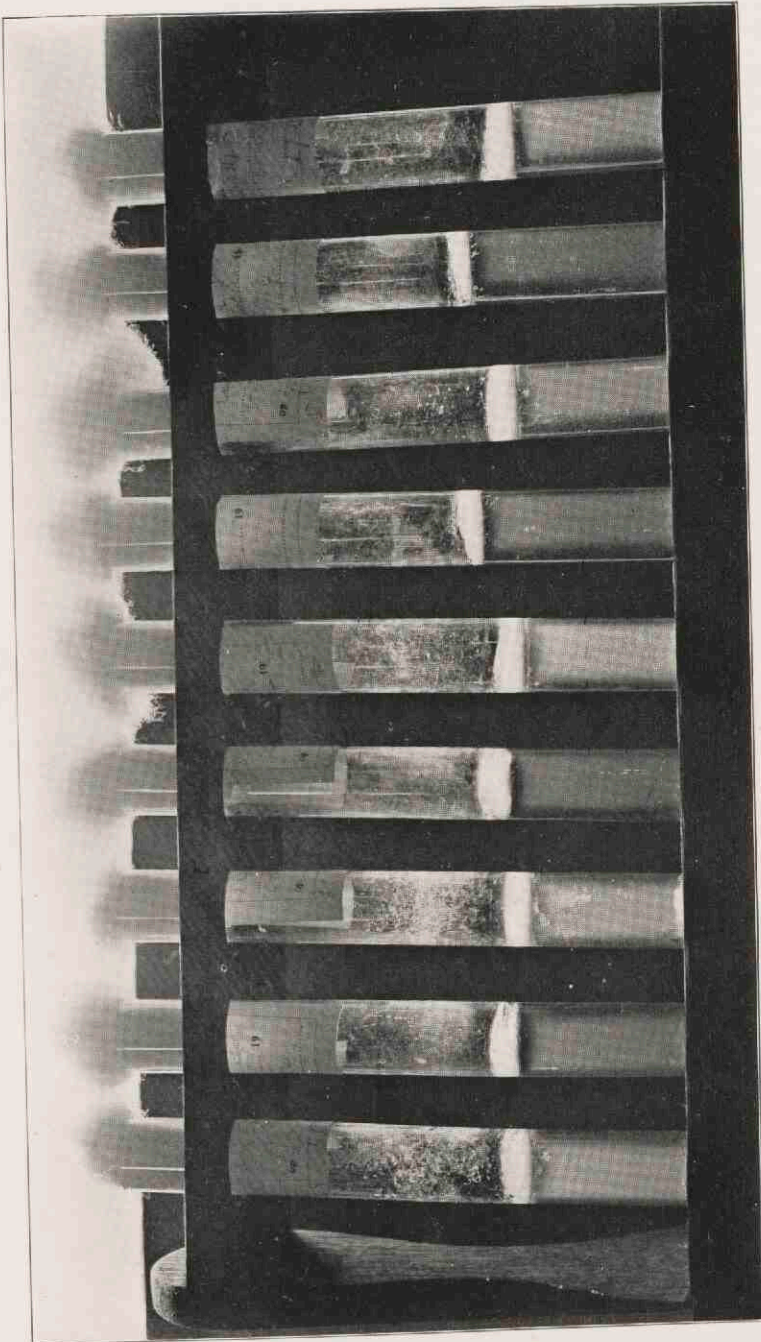


Photo 9. — Zie pag. 86. Niet geschud voor het photografeeren.

## HOOFDSTUK XI.

### ALGEMEENE BESCHOUWINGEN

Wanneer wij de resultaten van dit onderzoek met elkaar in verband trachten te brengen, dan valt op, dat bij alle proeven één punt telkens weer naar voren komt, en dat is de resistentieverhooging, die optreedt na een behandeling met levende bacteriën. Zooals gezegd, waren de bacteriën, die hiervoor dienden, gegroeid in een synthetische voedingsoplossing, waarin zij geen optimale groei-voorwaarden vonden. Het gevolg hiervan was, dat zij in dit medium veranderden en na eenigen tijd voor het grootste gedeelte overgingen in ruwe varianten.

Ook bij isolatie van bacteriën uit de tumoren en de aangrenzende, niet gezwollen deelen van de plant, bleek het grootste gedeelte der bacteriën uit ruwe vormen te bestaan, zoodat naar analogie met de verschijnselen optredende in reïncultuur wellicht aangenomen mag worden, dat de plant ongunstig op de bacterie inwerkt. Deze ruwe vormen waren volgens inoculatieproeven zeer weinig virulent.

Aangetoond kon worden dat na inwerking van een mengsel gladruw op bladen of stekken (pg. 21—38) of na uittreding dezer vormen uit de tumoren in naburige stengeldeelēn (pg. 39—72) de boven bedoelde resistentieverhooging optrad. Het schijnt dus niet onmogelijk dat de aanwezigheid van deze vormen in de plant het opkomen van een infectie met virulente bacteriën meer of minder remt.

Wellicht kan men, gezien de resultaten die men op medisch gebied heeft verkregen door behandeling van mensch en dier met avirulente pathogenen, ook hier de conclusie trekken, dat de plant als reactie op de aanwezigheid van de weinig virulente vormen van

*Ps. tumefaciens* afweerstoffen gevormd heeft tegen deze bacterie. Dat dit niet de eenige verklaring is, spreekt van zelf, men denke slechts aan een mogelijk antagonisme dier vormen binnen de plant.

Om deze kwesties verder te analyseeren zou men perssappen van de zieke planten moeten onderzoeken op hun gehalte aan de veronderstelde afweerstoffen. Hoeveel moeilijkheden dit onderzoek kan opleveren blijkt duidelijk uit de herhaling van de proeven van Kostoff (1929) door Silberschmidt (1931) en Chester (1932).

Des te meer verbaast het, dat Magrou (1935) door een eenvoudige filtratie van perssappen uit tumoren en plantenstengels in het zoo verkregen filtraat stoffen heeft kunnen aantoonen, die specifiek agglutineerend werken op *Ps. tumefaciens*.

Toch komt het mij voor dat de op pg. 24 reeds besproken proeven aandacht verdienen, daar zij door hun contrôlesysteem vertrouwen inboezemen.

Of het dergelijke stoffen zijn, die de bacteriën in de plant hun virulentie doen verliezen is natuurlijk voorloopig geenszins uit te maken. Het is misschien mogelijk dat na inwerking van de bedoelde stoffen op de bacteriën, de bacteriophag een verhoogde activiteit kan ontplooiën.

Hoe ingewikkeld deze kwesties zijn en hoe voorzichtig men moet wezen bij het trekken van algemeene conclusies bewijzen overigens proeven van Brown (1929), die aantoonen dat *Ps. tumefaciens* in de plant lang niet altijd aan virulentie verliest. Deze auteur vindt n.l. dat tumoren veroorzaakt door zeer zwak virulente stammen bacteriën opleveren die veel virulenter zijn geworden. Wellicht kunnen deze tegenstrijdigheden verklaard worden door dat de verschillende onderzoekers tumoren van verschillenden ouderdom onderzochten. Bekend is het feit dat *Ps. tumefaciens* des te moeilijker te isoleeren is naarmate de tumor ouder wordt. Wanneer men zich echter achter de woorden „des te moeilijker“ de zinsnede „in virulenten vorm“ denkt, dan zou dit wellicht een verklaring kunnen zijn voor de bovengenoemde tegenstrijdigheid.

Overigens zal het zeker niet onverschillig zijn of men isoleert uit tumoren, verwekt door sterk virulente stammen, of uit zulke die ontstonden door nauwelijks pathogene bacteriën. In het laatste geval vond Brown na herisolatie een verhooging der virulentie. Of zij ook gelet heeft op de virulentie van bacteriën afkomstig uit tumoren van de eerstgenoemde soort, is uit deze publicatie niet op te maken.

Het virulentieverlies van pathogene stammen van *Ps. tumefaciens* in de plant en in reïncultuur is echter zoo vaak zonder enig twijfel geconstateerd

(zie vooral Smith en Stapp), dat men het als een vaststaand feit kan beschouwen.

Het schijnt mij in geen geval geoorloofd, de phaag op te vatten als een door de plant gevormde afweerstof, zooals G ä u m a n n (1933) en I s r a i l s k y (1926) gedaan hebben. Dit is in strijd met alle gangbare opvattingen omtrent bacteriophagen.

Dat deze phaag echter een rol te vervullen zal hebben in het proces is niet uitgesloten. Dit kan men slechts onderzoeken door proeven te doen met phaagvrije stammen van *Ps. tumefaciens*, wanneer deze tenminste bestaan.

Het is hier de plaats een waarschijnlijk analoog verschijnsel te bespreken, n.l. de vorming der wortelknolletjes bij Leguminosen. Ook hier zijn er onderzoekingen die de vorming van specifieke agglutininen aangetoond schijnen te hebben (C a p p e l l e t t i, 1923). Ook hier worden veranderingen van vorm bij de bacteriën binnen het weefsel dezer knolletjes gesignaleerd.

Ten slotte is ook uit de knolletjes en de wortels, ja zelfs uit de stengels een bacteriophag geïsoleerd, welke op *Bacterium radicum* werkt (zie G e r r i t s e n c.s., 1923; I s r a i l s k y, 1929).

Evenals bij tumoren van *Ps. tumefaciens* hebben verscheidene auteurs gevonden, dat van de knolletjes een zekere immuniseerende invloed uitgaat op den wortel. Deze invloed uit zich daarin, dat superinfecties alleen gelukken met virulentere stammen. Nu komt echter het volgende: L ö h n i s (1930) en vele anderen vinden, dat planten die voldoende stikstofvoeding kregen „immuun” zijn tegen infectie. Volgens L ö h n i s is nu de „immunitet”, die in de wortels optreedt wanneer deze knolletjes dragen, veroorzaakt door actieve — dus stikstof assimileerende — bacteriën, aan hetzelfde toe te schrijven. Dit wordt waarschijnlijk door de waarneming dat wortels, die knolletjes dragen veroorzaakt door bacteriën welke geen of weinig stikstof assimileeren, in het geheel niet immuun zijn bij een superinfectie!

Men ziet hoe voorzichtigheid is geboden bij conclusies over immuniteit, waarmee niet gezegd wil zijn, dat ook bij de Leguminosenknolletjes echte immunitaire reacties geen begeleidende rol zouden kunnen spelen. Deze verschijnselen zijn zeer gecompliceerd en ver-

schillende oorzaken kunnen samenwerken, om een bepaald zichtbaar eindeffect te versterken.

Bij de Leguminosenknolletjes is men vrij goed op de hoogte van de intieme relaties, die bestaan tusschen de bacterie en de plant. Hetzelfde kan geenszins gezegd worden van de combinatie van *Ps. tumefaciens* en zijn gastheer. Welke stofwisselingsverschijnselen zich bij dit parasitaire proces voordoen, is slechts bij benadering bekend.

In ieder geval is het zeker, dat ook in dit geval zeer vele factoren denkbaar zijn, die hetzelfde eindeffect teweegbrengen.

Dit geldt eveneens voor de gevallen waar men een gevoeligheidsverlaging van planten voor parasitaire fungi heeft geconstateerd als gevolg van het inwerken van stofwisselingsproducten, dood mycelium of verzwakte levende vormen dezer fungi op die planten.

Ter verduidelijking kan het volgende dienen:

Z o j a (1925) vindt een duidelijke resistentieverhoging van tarwekiemplanten tegen *Helminthosporium sativum* indien de zaden gekiemd waren in een waterig extract dezer schimmel. Zij besluit tot immuniteit, evenals A r n a u d i (1933) waar deze haar proeven bespreekt.

L e e m a n (1932) doet proeven met denzelfden gastheer en parasiet. Hij bevestigt Z o j a's resultaten doch ziet bovendien, dat een dergelijke resistentieverhoging tegen *Helminthosporium sativum* optreedt na behandeling met extracten van andere parasitaire en niet-parasitaire schimmels en bacteriën!

Conclusies als die van Z o j a—A r n a u d i zullen dus eerst bewezen moeten worden. Eenzelfde houding moet men innemen tegenover het laatste onderzoek van A r n a u d i (1933).

Hoewel dus de bij mijn onderzoek verkregen resultaten in het geheel geen definitieve oplossing van het vraagstuk der immuniteit tegen *Ps. tumefaciens* opleveren, scheen het mij toch goed, de rol die avirulent geworden bacteriën al of niet in samenwerking met de bacteriophage, bij de door mij geconstateerde resistentieverhoging zouden kunnen spelen, naar voren te brengen.



## SAMENVATTING VAN DE VOORNAAMSTE RESULTATEN

Alle hieronder genoemde resultaten werden verkregen door behandeling van de planten met *Ps. tumefaciens* stam 245, sinds 1932 op het Phytopathologisch Laboratorium „Willie Commelin Scholten” aanwezig en geïsoleerd door B. H u s uit *Pirus communis*.

1. Door inoculatieproeven bij *Ricinus*, *Pelargonium*, *Impatiens* en *Bryophyllum* werd aangetoond, dat deze stam zeer virulent was en in 100 % van de gevallen infectie veroorzaakte (pg. 13), dat steriel leidingwater een voor deze bacterie onschadelijk suspensiemedium is, ook op den langen duur (tot 30 uur) (pg. 15) en dat zeer groote verschillen in de hoeveelheden bacteriën, waarmede de planten werden geïnoculeerd, niet den minsten invloed uitoefenen op de grootte van de tumoren, die hierdoor ontstaan (pg. 15).

Deze stam is sinds 1932 voortdurend elke maand van moutagar op moutagar overgeënt en heeft al dien tijd zijn virulentie behouden.

Dit laatste is niet het geval geweest met de andere hier onderzochte stammen (pg 13).

2. Voor de beoordeeling van de infectiegrootte werden de afmetingen van de tumoren opgenomen; tegelijkertijd werd de groei van de plantendeelen, waarop zij zich ontwikkelden, gemeten.
3. Bij oriënteerende proeven is gebleken, dat bij kiemplanten van *Ricinus* de geschiktheid van het hypocotyl om tumoren te vormen afneemt, naarmate het ouder wordt. Wanneer de periode van lengtegroei (celstrekingsperiode) is afgelopen en de cotylen volgroeid zijn, ontstaan na inoculatie van het hypocotyl nog slechts kleine tumoren.

Op welk moment van zijn ontwikkeling het hypocotyl het sterkst reageert op een inoculatie met *Ps. tumefaciens*, is niet

- precies onderzocht. Met groote waarschijnlijkheid kan evenwel gezegd worden, dat dit even na het begin van de celstrekkingperiode valt (pg. 16, photo's 1 en 2).
4. De gevoeligheid voor *Ps. tumefaciens* van bloeiende en in den bloei verhinderde *Pelargonium*-planten werd onderzocht. Wanneer bij dergelijke planten werd geïnoculeerd in oude internodiën, dan was geen verschil in gevoeligheid te constateren. Werd in jonge, nog groeiende internodiën geïnoculeerd, dan was na ruim een maand evenmin een verschil te zien tusschen bloeiende en niet bloeiende planten. Of er na langere proefduur wel verschil zou optreden, kon niet verder nagegaan worden (pg. 18).
  5. Proeven waarbij nagegaan werd, of het op eenigerlei wijze mogelijk was, de gevoeligheid tegen *Ps. tumefaciens* experimenteel te verlagen, werden gedaan met de volgende planten: *Pelargonium*, *Bryophyllum* en *Ricinus*.
  6. Bij *Pelargonium* kon een verhoogde weerstand geconstateerd worden ten gevolge van een behandeling van stekken met levende *Ps. tumefaciens* in een voor de parasiet ongunstige voedingsoplossing (pg. 35—36).
  7. Tevens kon bij *Pelargonium* aangetoond worden, dat van een tumor een remmende invloed uitgaat, welke de vorming van een tweeden, later geïnoculeerden tumor min of meer tegenwerkt (pg. 43).
  8. Bij de onder 6 en 7 genoemde gevallen kon aangetoond worden, dat de geringere tumorgroei niet het gevolg was van vegetatieve groeiremmingen (pg. 38 en 43).
  9. Na injectie van een cultuur van *Ps. tumefaciens* groeiende op de onder 6 bedoelde voedingsoplossing, in afgesneden bladen van *Bryophyllum crenatum*, was ten eerste een duidelijke invloed te zien op het aantal en de grootte van de zich in de bladmeristemen ontwikkelende plantjes en verder bleken deze planten, nadat zij overgezet waren in aarde, iets minder gevoelig te zijn voor *Ps. tumefaciens* (pg. 23, photo 3).
  10. Bij een gering aantal spruiten, die zich bij *Bryophyllum crenatum* in de bladoksels ontwikkelden tengevolge van een inoculatie met *Ps. tumefaciens* onder de bladoksels, bleek de gevoeligheid voor *Ps. tumefaciens* gedaald te zijn, nadat ge-

noemde spruiten afgesneden en in aarde overgeplant waren (pg. 26).

11. Bij een beperkt aantal planten van *Ricinus*, die groote tumoren in het hypocotyl droegen, bleken inoculaties in het eerste internodium vrijwel geen succes te hebben, vergeleken bij controleplanten (pg. 44).

Bij deze proef is het onzeker, of er geen vegetatieve groei-remmingen zijn opgetreden (pg. 45).

12. Bij een groot aantal *Ricinus*-planten bleken de tumoren, die door gelijktijdige inoculaties in verschillende internodiën ontstonden, elkaar in hun groei te remmen.

Deze remming was reeds vroeg te constateeren, nog vóór de tumoren zoo groot werden, dat redelijkerwijs aangenomen kon worden, dat zij den vegetatieven groei van de planten konden beïnvloeden door voedingsstoffen aan de groeiende deelen te onttrekken.

Metingen van lengte- en diktegroei van de geïnoculeerde internodiën wezen uit, dat groei-remmingen optraden, vooral bij den lengtegroei van de geïnoculeerde internodiën. Deze hadden, wanneer de planten in hun geheel langzaam groeiden, een lokaal karakter. Wanneer daarentegen de uitwendige omstandigheden zoodanig waren, dat de planten sneller groeiden, dan was ook een duidelijke invloed op de planten in hun geheel te constateeren.

Gezien echter de duidelijke remming, die de tumoren reeds in het begin van hun groei op elkaar uitoefenen, is het voorloopig het waarschijnlijkst hier een rechtstreeksche beïnvloeding van de tumoren op elkaar aan te nemen (pg. 65).

13. Uit de tumoren en de stengels, waarop deze tumoren gegroeid waren, kon *Ps. tumefaciens* geïsoleerd worden (pg. 69).

Deze isolaties veroorzaakten slechts voor een gering percentage groote tumoren. Het grootste aantal gaf bij inoculatie van *Ricinus*-planten slechts kleine zwellingen, die evenwel grooter waren dan de calluswoekeringen, die rondom wonden van controleplanten, gemaakt met een steriele entnaald, groeiden (pg. 69).

De zeer virulente stam boette dus binnen de plant een groot deel van zijn virulentie in. De bacteriën zijn niet alleen van

- virulentie, maar ook van uiterlijk veranderd. Voor het grootste deel werden n.l. ruwe vormen uit de planten geïsoleerd (pg. 67).
14. Nooit werd eenige variabiliteit van *Ps. tumefaciens* stam 245 in reïncultuur geconstateerd, indien hij gekweekt werd op gunstige voedingsmedia als mout-agar, bouillon-agar, vloeibare mout en vloeibare bouillon. De vorming van ruwe varianten trad echter op, wanneer deze stam in de voor zijn groei ongunstige synthetische voedingsoplossing van Stapp en Bortels werd gekweekt (pg. 69).
  15. Het bleek, dat deze stam met een bacteriophag besmet was (pg. 82).
  16. Eveneens gelukte het een phaag te isoleeren uit tumoren en stengelstukken van tumordragende planten, waarbij waargenomen kon worden, dat deze phaag na een gelijk aantal passages op *Ps. tumefaciens* stam 245 een sterkere lytische werking uitoefende dan die, welke reeds in den stam 245 aanwezig was (pg. 83—88).
  17. Het is niet uitgemaakt, of dit verschil in werking berust op een virulentieverhooging van de phaag in de plant, dan wel op het feit, dat de phaag in de plant in grotere hoeveelheden voorkomt dan in de cultures der bacteriën (pg. 88).
  18. In de cultures van *Ps. tumefaciens* op de synthetische voedingsoplossing van Stapp en Bortels, wordt waarschijnlijk een wortelvormende stof gevormd (pg. 32, 33).

## LITERATUURLIJST

- ARNAUDI, C., Sull' immunità acquisita nei vegetali.  
 1925, Atti. Soc. Ital. Sci. Nat., Milano. 64. 230—238.  
 ——— On the vaccination of tobacco plants against *Thielaviopsis basicola*.  
 1933, Bull. of the Torr. Bot. Club. 60. 583—597.
- BOUILLENNE, RAY, et WENT, F. Recherches experimentales sur la neoformation des racines dans les plantules et les boutures des plantes supérieures.  
 1933, Arch. l'Inst. Bot. Univ. Liège. 10. 1—177.
- BROWN, N. A., Experiments with Paris daisy and rose to produce resistance to crown gall.  
 1923, Phytopath. 13. 87—99.  
 ——— The tendency of the crown-gall organism to produce roots in conjunction with tumors.  
 1929, Journ. Agr. Res. 39. 747—766.  
 ——— and QUIRK, A. J., Influence of bacteriophage on *Bact. tumefaciens* and some potential studies of filtrates.  
 1929, Journ. Agr. Res. 39. 503—530.
- CAPPELLETTI, C., Reazioni immunitarie nei tubercoli radicali delle leguminose.  
 1923, Giorn. di Biol. e Med. sperm. 1.  
 ——— Reazioni immunitarie nei tubercoli delle leguminose.  
 1924, Ann. di Bot. 16.
- CHESTER, K. S. and WHITAKER, T. W., Studies on the precipitin reaction in plants. IV.  
 1933, Am. Journ. Bot. 20. 297—308.
- CHESTER, K.S., Studies on bacteriophage in relation to phytopathogenic bacteria.  
 1933, Zentrbl. Bakt. II. 89.
- GÄUMANN, E., Neuere Erfahrungen auf dem Gebiete der pflanzlichen Immunitätslehre.  
 1933, Verh. Schw. Natforsch. Ges. 114. 197—219.

- GERRETSEN, F. C., GRIJNS, A., SACK, J. and SOHNGEN, N.L., Das Vorkommen eines Bakteriophagen in den Wurzelknöllchen der Leguminosen.  
1923, Zentrbl. Bakt. II. 60. 311—316.
- GHEORGHIU, J., L'immunité et la vaccinothérapie anticancéreuse chez les plants.  
1932, C. R. Soc-Biol. Paris. 109. 1387—1389.
- d'HERELLE, F., Le bacteriophage et son comportement.  
1926, — et PEYRE, E., Contribution à l'étude des tumeurs expérimentales.  
1927, C. R. Ac. Sci. Paris. 185. 227—230.
- HILL, J. B., The migration of *Bacterium tumefaciens* in the tissue of tomato plants.  
1928, Phytopath. 18. 553—564.
- BRITTINGHAM, Wm. H., GIBBONS, P. and WATTS, Gr. W., Further notes on *Bacterium tumefaciens* and its host relationship.  
1930, Phytopath. 20. 179—186.
- ISRAILSKY, W. P., Bakteriophagie und Pflanzenkrebs.  
1926, Zentrbl. Bakt. II. 67. 236—242.
- Bakteriophagie und Pflanzenkrebs.  
1927, Zentrbl. Bakt. II. 71. 302—311.
- Vergleichende Untersuchungen über die Rassen-eigentümlichkeiten des *B. tumefaciens* und verwandter Mikroorganismen.  
1929, Zentrbl. Bakt. II. 79. 354—369.
- KAUFFMANN, F., Zur *Tumefaciens* frage.  
1929, Ztschr. Krebsforsch. 28. 109—120.
- Zur Biologie der *Tumefaciens* stämme.  
1929, Ztschr. Krebsforsch. 30. 290—294.
- KOSTOFF, D., Acquired immunity in plants.  
1929, Genetics. 14. 37—77.
- Tumors and other malformations on certain *Nicotiana* hybrids.  
1930, Zentrbl. Bakt. II. 81. 244—260.
- Proteinreaktionen und Tumorbildungen.  
1931, Ztschr. Krebsforsch. 34. 65—79.
- LEEMANN, A. C., The problem of active plant immunity.  
1932, Zentrbl. Bakt. II. 85. 360—376.
- LEVINE, M., The mechanism of the formation of the leafy crown gall.  
1919, Bull. of the Torr. Bot. Club. 46. 447—452.
- 1922, Phytopath. 12. 56.

- LÖHNIS, M. P., Investigations upon the ineffectiveness of root-nodules on Leguminosae.  
1930, Zentrbl. Bakt. II. 80. 342—368.
- MAGRON, M. J., Reactions d'immunité des plantes vis-a-vis du Bact. tumefaciens.  
1935, C. R. d. séances d. l'Ac. d. Sc. 200. 256—258.
- MUNCIE, J. H. and PATEL, M. K., Studies upon a bacteriophage specific for *Ps. tumefaciens*.  
1930, Phytopath. 20. 289—305.
- NĚMEC, A., Bakterielle Wuchsstoffe.  
1930, Ber. dtsh. bot. Gs. 48. 72—74.
- QUIRK, A. J., Pure smooth and rough colony types at will.  
1931, Science 74.
- REDAELLI, P., Osservazioni su granulomi sperimentali da „Phytomonas tumefaciens (Smith en Townsend) Bergey, nelle Stapelie.  
1934, Giorn. di Batt. e Imm. 12.
- RIKER, A. J., BANFIELD, W. M., WRIGHT, W. H. and KEITT, G. W., The relation of certain bacteria to the development of roots.  
1928, Science (n. s.) 68. 357—359.
- ROBINSON, W. and WALKDEN H., A critical study of Crown Gall.  
1923, Ann. Bot. 37. 299—324.
- SCHIFF-GIORGINI, R., Untersuchungen über die Tuberkelkrankheit des Ölbaumes.  
1906, Zentrbl., Bakt. II. 15. 200—211.
- SCHLEMPER, P., Allotropie van bacteriën.  
1934, Diss. Utrecht.
- SILBERSCHMIDT, K., Studien zum Nachweis von Antikörpern in Pflanzen.  
1931, Planta: Arch. Wiss. Bot. 13. 114—168.
- SMITH, E. F., Bacteria in relation to plant diseases.  
1911, Carn. Inst. Wash. D. C. 2. 93—94.
- BROWN, N. A. and TOWNSEND, C. O.,  
Crown-gall of plants, its cause and remedy.  
1911, U. S. Dep. Agric., Bur. Pl. Ind. 213.
- Mechanism of tumor growth in crown gall.  
1917, Journ. Agr. Res. 8. 165—186.
- Effect of crown gall inoculations on Bryophyllum.  
1921, Journ. Agr. Res. 21. 593—598.
- STAPP, C., Der bakterielle Pflanzenkrebs und seine Beziehungen zum tierischen und menschlichen Krebs.  
1927, Ber. D. Bot. Ges. 45. 480—504.

- STAPP, C. und BORTELS, H., Der Pflanzenkrebs und sein Erreger, *Ps. tumefaciens*.  
 I Mitteilung: Konstitution und Tumorbildung der Wirtspflanze.  
 1931, (a) Ztschr. f. Parasitenk. 3. 654—663.
- 
- Der Pflanzenkrebs und sein Erreger, *Ps. tumefaciens*.  
 II Mitteilung: Ueber den Lebenskreislauf von *Ps. tumefaciens*.  
 1931, (b) Ztschr. f. Parasitenk. 4. 101—125.
- THUNG, F. H., Experimenten met *Bact. tumefaciens* Sm. et Town.  
 1929, Tijdschr. Pl. ziekten. 35—263.
- TOPLEY, W. W. C. and WILSON, G. S., The principles of bacteriology and immunity.  
 1931, Vol. 1 and 2.
- ZOJA, A., L'immunita nelle piante.  
 1925, Atti R. Inst. Bot. Univ. di Pavia, 2, 15—47.



# STELLINGEN

## I

Een onderzoek van de cultuurvloeistof van *Ps. tumefaciens* op het voorkomen van „groeistoffen” zal meer licht op de door deze bacterie veroorzaakte tumorgroei kunnen werpen dan de vele tot nu toe verrichte zuiver chemische onderzoeken van de afscheidingsproducten van dit organisme.

## II

Voor een volkomen analyse van de resistentieverhoging van planten tegen *Ps. tumefaciens*, die men op verschillende wijzen experimenteel kan teweegbrengen, is het allereerst noodzakelijk te weten, welke factoren het zijn, die de tumorgroei veroorzaken.

## III

De filtraten, die Weindling maakte van *Trichoderma lignorum* cultures waren niet steriel. Het is dus niet bewezen, dat de filtraten zelve toxisch werkten op *Rhizoctonia solani*.

(Weindling, R. *Phytopathology* 23, 1934)

## IV

Uit de proeven van Eglits blijkt, dat een plantendeel tengevolge van een locale wond of infectiehaard een algemeene temperatuurstijging ondergaat. Hierdoor is het waarschijnlijk geworden, dat dit deel onder deze omstandigheden als een geheel reageert.

(Eglits, M. *Phytopath. Ztschr.* 5, 1932)

## V

De gunstige invloed van suikers op de ontwikkeling van orchide-

deëenzaailingen is mede een gevolg van „groeistoffen”, die er als verontreiniging in aanwezig zijn.

(Burgeff, H. Ber. D. Bot. Ges. 52, 1934)

## VI

Met Wassink moet men aannemen, dat „reversibele beschadiging” van de ademhaling door te hooge temperatuur ontstaat, doordat een van de factoren, die het ademhalingsproces beïnvloeden, tijdelijk als beperkende factor optreedt.

(Wassink, E. C. Rec. trav. bot. 31, 1934)

## VII

De summatie-verschijnselen, die bij dwarsgestreepte Vertebraten-spiere optreden, kan men het beste verklaren, door aan deze spiere behalve elastische ook tonische eigenschappen toe te schrijven.

(Wachholder, K. Pflügers Archiv 233, 1934)

## VIII

De wijze, waarop Thomas de Angiospermenstempel opvat en dien afleidt van fossiele vormen, is onjuist.

(Thomas, H. H. New Phytol. 33, 1934)







19