

NEDERLANDSE
PLANTENZIEKTENKUNDIGE (PHYTOPATHOLOGISCHE) VERENIGING
TIJDSCHRIFT OVER PLANTENZIEKTEN

Onder redactie van Mej. H. L. G. DE BRUYN; Dr J. A. A. M. H. GOOSSENS;
Ir P. HUS en Dr A. J. P. OORT

Redactie-adres: Lab. voor Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen
Drukkers-Uitgevers: H. Veenman & Zonen - Wageningen

55e JAARGANG (1949)

2e AFLEVERING

MAART-APRIL

AANTASTING VAN ERWTEN DOOR MYCOSPHAERELLA PINODES
(BERK. ET BLOX.) STONE ¹⁾

With a summary: Attack of peas by Mycosphaerella pinodes (Berk. et Blox.) Stone

DOOR

Dr L. C. P. KERLING ²⁾

(Laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen)

INHOUD

	Blz.
1. Inleiding	42
2. Doel van het onderzoek	42
3. Literatuurbespreking	43
4. Methodiek	44
5. Resultaten van de inoculaties; het macroscopisch ziektebeeld	45
6. Het gedrag van de schimmel in een vochtige kamer	47
7. Het microscopisch ziektebeeld	48
8. Herisolatie van Mycosphaerella uit het epicotyl	51
9. De uitbreiding van het mycelium in de levende plant	51
10. De ontwikkeling der peritheciën	52
11. De rijping der peritheciën	54
12. Het kweken van peritheciën in reïncultuur	55
13. De perioden van sporenuittotting te velde	56
14. Correlatie tussen regenval, het uitstoten der ascosporen en de aantasting van het erwtengegewas	57
15. Invloed van de windrichting op de verspreiding der sporen	60
16. Overgang met zaad	60
17. Vatbaarheid van rassen	61
18. Conclusies	63
19. Summary	65
20. Literatuur	67

¹⁾ Ontvangen voor publicatie Maart 1949.

²⁾ In dit artikel is gebruik gemaakt van gegevens uit ongepubliceerde verslagen van L. J. J. VAN DER KLOES (1947), G. KRABBE (1947), J. VAN DER LINDE (1948), H. RIETBERG (1935) en van J. SWIERSTRA (1948).

1. INLEIDING

Bij het onderzoek van het vraagstuk der erwtenmoeheid in Nederland is gebleken, dat verschillende schimmels hier een belangrijke rol spelen (GERRETSEN, 13; PLANTENZIEKTENKUNDIGE DIENST, 45). De voorlopige indeling in veroorzakers van voetziekten en van vaatziekten (mondelinge mededeling van Mejuffrouw J. C. SCHREUDER, 1948) is echter nog geenszins bevredigend. Volgens GOOSSENS (19) „is het zeer moeilijk, om niet te zeggen ondoenlijk, de ziekteoorzaak naar de waarneembare ziekteverschijnselen te identificeren”.

Terwijl bij voetziekten in het algemeen stengelbasis en wortels uitwendig donker verkleurd zijn, waarbij de aantasting zich tot opperhuid en schors bepaalt, vindt men bij de vaatziekten een lichte of donkere, soms rode verkleuring der vaatbundels. Vaak komen beide symptomen samen voor. Uit zieke planten werd dan ook herhaaldelijk meer dan één organisme geïsoleerd, bv. *Ascochyta pinodella* tezamen met *Fusarium solani* (door Mejuffrouw J. C. SCHREUDER). Te Wageningen werd *Ascochyta pinodella* gevonden tezamen met resp. *Mycosphaerella pinodes*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum* en met *Botrytis cinerea*.

Het is de vraag in hoeverre een bepaald pathogeen als primaire ziekteoorzaak beschouwd kan worden. Het ziektebeeld, waarmee de plant reageert op elk der geïsoleerde schimmels en op combinaties daarvan, dient vastgelegd te worden, voor zover dit niet reeds is geschied. Volgens GERRETSEN (13) staat de rol van de schimmels behorend tot de *Ascochyta*-groep voor Nederland nog niet vast.

2. DOEL VAN HET ONDERZOEK

Hoewel in het vraagstuk der erwtenziekten in Nederland *Fusaria* en bodemstructuur een belangrijke rol spelen, werd op het Laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek te Wageningen een begin gemaakt met het bestuderen van de pathologie van *Mycosphaerella pinodes*. Deze schimmel onderscheidt zich van de eveneens voor erwten pathogene *Ascochyta pisi* en *Ascochyta pinodella* o.a. door het optreden van een geslachtelijke voortplanting, waardoor *Mycosphaerella* uit mycologisch oogpunt de interessantste van de drie is.

Door HARE en WALKER (21) is het ziekteverloop uitvoerig nagegaan in Wisconsin; onder in Nederland heersende omstandigheden is het verloop minder goed bekend. In sommige jaren komt *Mycosphaerella pinodes* hier te lande veel voor (LEENDERTZ, 33; GOOSSENS, 18). Volgens een mededeling van Mejuffrouw DR L. C. DOYER komt in de laatste jaren deze schimmel meer in zaad voor dan in vroeger jaren (zie LAMMERS, 31). Ook in 1948 was het erwtengegewas er hevig door aangetast. Hoewel veel voorkomend op hogere delen van de plant, op peulen en in zaad, kan *Mycosphaerella pinodes* slechts zelden uit zieke stengelvoeten geïsoleerd worden. NOLL (41) vermeldt, dat uit 257 stengelstukken met donker verkleurde schors slechts 32 x deze schimmel tegen 215 x *Ascochyta pinodella* geïsoleerd werd. Ook Mejuffrouw SCHREUDER isoleerde de schimmel slechts sporadisch.

SWIERSTRA kon evenmin uit stengelbases van planten, afkomstig van een zwaar met *Mycosphaerella* besmet proefveld de schimmel isoleren. Wel lukte het JONES (25) deze parasiet te isoleren uit geïnoculeerde planten; de isolatie beschreven door MARCHAL en FOËX (36) lijkt twijfelachtig.

Op grond van isolaties alleen kan men echter een microörganisme nog niet beschouwen als een meer of minder belangrijk pathogeen. Het kan immers zijn,

dat de schimmel na te weeg gebrachte schade sterft en secundaire organismen de plaats innemen. Wat de pathologie betreft, zijn er nog vele onopgeloste vragen: hoe komt het bv. dat de schimmel zo zelden uit zieke voeten te isoleren is, terwijl zaad voor een hoog % besmet kan zijn? Wat is de schade van de voetaantasting alleen en wat van aantasting der hogere delen van de plant? Volgens GERRITSEN en BURGMANS (14) is „het cardinale punt, de aantasting van het epicotyle stengeldeel, nog in onvoldoende mate nagegaan”. Ook de invloed van de schimmel op de plant is van belang: LINFORD (34) spreekt dit in een studie over „wilt” duidelijk uit: „any attempt to understand the process of pathogenesis must have as a basis a clear picture of the disturbances in physiology and structure which constitute the disease”.

Het doel van dit onderzoek is na te gaan:

1. Het gedrag van de schimmel in verschillende organen van de erwtenplant en de invloed van de schimmel op het weefsel.
2. Het verloop van het ziekteproces bij planten in de kas en te velde onder omstandigheden heersend in Nederland.
3. De vatbaarheid van verschillende rassen met behulp van een laboratorium-methode.

3. LITERATUUR

Na de beschrijving van *Mycosphaerella pinodes* (BERK. ET BLOX.) STONE, geeft JONES (25) een overzicht van het ziekteverloop. NOLL (41 en 42), SNYDER (48 en 49), WALKER en HARE (52) en HARE en WALKER (21) berichten hierover uitvoeriger. Aan wortelhals en stengelbasis treden roodbruine schorsverkleuringen op, evenals aan de stengel, voornamelijk bij de internodiën. Ook de stipulae, bladstelen, bladschijven, peulen en zaden kunnen donkere vlekken vertonen, waarin pycniden gevormd worden. De pycnosporen komen in een slijmmassa naar buiten en worden door de regen verspreid. Dat regen de aantasting doet toenemen is herhaaidelijk opgemerkt: JONES (25), GOOSSENS (16), BREMER (3), SNYDER (48), WALKER en HARE (52), RJACHOVSKY (47).

Op afstervende plantendelen ontstaan na woekering van het mycelium peritheciën, waarin asci, die bij rijpheid en na bevochtiging door regen, ascosporen doen vrijkomen. Deze worden door de wind verspreid, waardoor nieuwe infecties kunnen optreden. Rijpe peritheciën zijn gevonden op vroeg afgestorven planten in de zomer vóór de oogst, op stroresten van geoogste planten, die op het veld blijven liggen en op afgestorven opslagplanten in de herfst (HARE en WALKER, 21). De lege pycniden en peritheciën op overwinterd stro vormden volgens de laatst genoemde onderzoekers in het voorjaar geen nieuwe sporen. Wel zouden zich nieuwe verspreide peritheciën ontwikkelen, waardoor de jonge aanplant geïnfecteerd werd. Volgens SNYDER (48) overwinteren peritheciën op stro van de laatste oogst in een onrijp stadium; de sporen komen meestal vrij ten tijde dat de jonge planten op het veld staan.

Tot dusver was over de ontwikkeling en betekenis der ascosporen als infectiebron hier te lande nog weinig bekend. WEHLBURG (53) nam peritheciën van *Mycosphaerella pinodes* op afgestorven planten waar, terwijl besmetting van jonge planten in het voorjaar en van opslag in het najaar door vrijkomende ascosporen werd waargenomen door VAN DER KLOES en SWIERSTRA.

Overgang met zaad, zowel door uitwendig aanklevende sporen als door inwendige

besmetting, is herhaaldelijk waargenomen. Het binnendringen geschiedt door de peulwand heen, vooral wanneer tijdens de periode van rijping en oogst veel regen valt. (JONES, 25). De infectie geschiedt volgens SNYDER (48) op de plaats, waar het zaad in contact is met de peulwand: of hiermee de placenta bedoeld wordt, is de vraag. In Nederland is zaad vaak voor een hoog percentage besmet (DOYER, 8), waardoor de opkomst gedrukt wordt. Vanuit zieke planten krijgt de schimmel ook kans zich in het gewas te verspreiden.

Wat de vatbaarheid voor *Mycosphaerella pinodes* van in Nederland gekweekte erwtenrassen betreft, onderzoek hierover is gedaan door GERRITSEN en BURG-MANS (14) bij planten te velde en in de kas. Later zijn deze proeven gedeeltelijk herhaald door KRABBE en VAN DER LINDE. Een laboratoriummethode voor het testen van rassen op vatbaarheid voor *Mycosphaerella pinodes* werd beschreven door GOOSSENS (17).

Over het gedrag van de schimmel in de plant is weinig bekend. LUDWIG (35) nam het binnendringen van de kiembuizen door de cuticula waar, evenals WEHLBURG (53). Volgens de eerste onderzoeker dringt het mycelium door oplossen van de middenlamel tussen de epidermiscellen de schors binnen. HARE en WALKER (21) spreken van een binnendringen door de cuticula in de cellen. Volgens GILCHRIST (15) heeft het epicotyl van vatbare rassen een dunnere cuticula dan dat van minder vatbare rassen. Volgens deze onderzoekster stelt de endodermis mogelijk een grens aan de uitbreiding van de schimmel. Volgens JONES (25) hangt de snelheid van uitbreiding af van temperatuur en vochtigheid. Bij langer verblijf in een vochtige kamer neemt het aantal vlekken toe (HARE en WALKER, 21).

4. METHODIEK

Voor inoculatieproeven werden de volgende rassen gebruikt: Early Bird, Venlose Lage, Alaska, Kelvedon Wonder, William Hurst, Unica en Delicatesse. De inoculaties werden op verschillende wijzen uitgevoerd:

1. Twee weken oude planten gekweekt in gestoomde aarde werden met een dichte pycnosporen-suspensie bespoten en na een verblijf van twee dagen in een vochtige kamer verder in de kas opgeweekt. Ook bloeiende planten met rijpende peulen werden aldus behandeld.
2. Twee weken oude planten, waarvan het epicotyl omwonden was met repen cellophaan, werden op dezelfde wijze bespoten. Het cellophaan omhulsel was aan de bovenzijde met vette watten afgesloten, zodat geen druppels het epicotyl konden bereiken.
3. Vijf dagen oude kiemplantjes werden geplaatst in zand, gemengd met een sporensuspensie. Het zand diende slechts om de plantjes in de juiste stand te houden, zodat alleen het epicotyl met de suspensie in aanraking kwam. Na 2 dagen verblijf in de suspensie werden de planten in gestoomde grond uitgeplant. Bij deze methode werd gezorgd dat geen besmetting plaats vond van delen hoger dan het epicotyl.
4. Aan de basis van twee weken oude planten werd een watje met suspensie gebracht of een stukje agar met mycelium en chlamydosporen, tegen uitdrogen beschermd door een laagje aarde.
5. In buizen op filtreerpapier werden steriele planten gekweekt. Na 6 dagen werd het water vervangen door suspensie, waarbij gezorgd werd, dat alleen het epicotyl ondergedompeld werd. Na 2 dagen werd de suspensie voorzichtig

afgeschonken en vervangen door water. De buizen werden met cellophaan afgesloten, zodat geen verdamping meer kon plaats vinden en in het donker geplaatst bij 24° C.

De inoculaties werden uitgevoerd resp. in Januari en in Augustus, met totaal ongeveer 80 planten voor elk der groepen 1 en 4 en met totaal 40 planten voor de groepen 2 en 3. De onder 5 genoemde methode werd toegepast op een zestal rassen met totaal 240 planten, om na te gaan of er onder vergelijkbare omstandigheden verschillen in uitbreidingsresistentie aan het licht zouden komen.

De schimmel werd gekweekt op aardappelglucose-agar, haverhoutagar of houtagar, evenzo in kolfjes met een gesteriliseerd mengsel van aarde en havermeel (95 gr aarde, 5 gr havermeel, $\pm$ 12 cc water).

Voor het verkrijgen van de suspensies werden éénspurecultures van verschillende stammen gebruikt, resp. afkomstig van een veld van het Laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek te Wageningen en van een tuin in Edinburgh, Schotland. Verschillen tussen de éénspurecultures: vorming van veel mycelium of van veel pycniden, gingen bij overenting verloren, hetgeen ook door HARE en WALKER (21) waargenomen werd. BONDARTZEVA-MONTEVERDE en VASSILIEVSKY (2) berichten het voorkomen van 3 vormen in Rusland. Te Wageningen kon echter geen verschil in pathogeniteit tussen verschillende rassen waargenomen worden, ook niet wanneer met cultures verkregen uit ascosporen gewerkt werd.

De ontwikkeling werd gevolgd in vochtige kamers op aardappelglucose-agar.

Om het uitstoten van ascosporen te controleren werden sporen uit rijpe peritheciën op met vet bestreken objectglazen opgevangen. In het veld werden daartoe glaasjes verspreid opgesteld onder een hoek van 45° ter hoogte der planten, zoals dit door HARE en WALKER (21) is aangegeven. Op deze wijze werden slechts weinig sporen opgevangen. Om te controleren of uitspuiting inderdaad plaats had gevonden, werden stukjes stro met peritheciën eveneens op het veld op filtreerpapier uitgelegd in een petrischaal. Op $\pm$ 5 mm afstand werden op een horizontaal geplaatst bevet objectglas ascosporen opgevangen. Wel wordt de regen door het bovenliggende glaasje verhinderd het stro te bevochtigen, doch het filtreerpapier, dat buiten het glas uitsteekt, absorbeert voldoende water om het geheel nat te maken. Om verdrinken van het stro te voorkomen, werd het filtreerpapier gespannen over een stukje ijzergaas met omgebogen rand, dat in de petrischaal paste. Een dergelijke methode wordt ook gebruikt bij het onderzoek naar het tijdstip van het uitspuiten der ascosporen van de schurftzwam, *Venturia inaequalis* (VAN DE POL, 46). Stro, filtreerpapier en glaasjes werden tijdens de contrôle periode dagelijks verwisseld; de aanwezigheid van ascosporen werd nagegaan.

5. RESULTATEN VAN DE INOCULATIES; HET MACROSCOPISCH ZIEKTEBEELD

De planten van de eerste groep, geheel met suspensie bespoten, vertoonden na twee dagen reeds de eerste verschijnselen in de vorm van donkere puntjes op de bladschijven, bladstelen, stipulae en stengels. Bij hoge luchtvochtigheid breidden de puntjes zich snel uit tot vlekjes, waarin na 4 tot 5 dagen pycniden zichtbaar werden. Bij de knopen, waar de stipulae suspensiedruppels vasthielden, ontstonden roestbruine grotere vlekken, meestal zonder pycniden. Op deze plaatsen trad rotting op en de stengels braken hier gemakkelijk door, hetgeen in het bijzonder bij de lange stengels van Alaska het geval was. Later vertoonden de epicotylen

donkere verkleuringen, veroorzaakt door afstromend gietwater met pycnosporen. In het epicotyl werden geen pycniden gevonden. Bij hoge luchtvochtigheid gaan grote gedeelten van de bladschijf ten gronde; zijstengels komen tot ontwikkeling, doch ook zij worden geïnfecteerd. Delen boven een sterk aangetaste knoop sterven af. In drogere lucht verschrompelen de aangetaste delen van de bladschijf en de bladstelen en ook nu kunnen stengelgedeelten ten gronde gaan. Aangetaste delen hebben ook eerder van vorst te lijden dan gezonde. Hoe ouder de planten tijdens inoculatie, dus hoe dichter bij het natuurlijk afstervingsproces, hoe sneller de schimmel de dood van de plant kan veroorzaken. Verwelking en verkleuring der vaten in het epicotyl komt niet voor.

Bij de planten van de tweede groep kon de suspensie niet tot het epicotyl doordringen. De hoger gelegen delen werden als bij de vorige groep sterk aangetast en stierven af. Na verwijdering van het cellophaan bleek het epicotyl eronder nog fris groen te zijn. Uit de oksels der cotylen ontwikkelden zich zijspruiten.

De planten van de derde groep vertoonden twee dagen na inoculatie donkere puntjes aan wortelhals, hypo- en epicotyl, snel overgaand in donkere strepen in de lengterichting van de stengel. De strepen verenigen zich eerst tot een netwerk en tenslotte tot een donkere roodbruine vlek die om het gehele epicotyl heen kan lopen. Bij inoculatie met mycelium (vierde groep) verscheen de donkere vlek direct. Pycniden werden ook nu nooit onder de tweede knoop gevonden. Tijdens het opkweken in de kas breidden de vlekken zich niet verder uit, ze bleven scherp begrensd. Tussen de zieke en de contrôle planten was weinig verschil waar te nemen: de laatste hadden alle een lichtgroene voet zonder vlekken. GERRITSEN en BURGMANS (14) namen eveneens ongestoorde ontwikkeling waar bij planten met een donker verkleurd epicotyl. In enkel gevallen bleven de aangetaste planten kleiner dan de contrôles, door een korter blijven van de internodiën. Deze dwergvormen zijn herhaaldelijk waargenomen, o.a. door NOLL (41).

Anders was het verloop van de aantasting bij de planten van de vijfde groep. Reeds tijdens het afgieten van de suspensie zijn donkere puntjes zichtbaar, die zich snel uitbreiden tot strepen en vlekken. Na het verkleuren van het epicotyl wordt nu ook de stengel doorschijnend. Tenslotte wordt de gehele plant na ongeveer drie weken bruin, terwijl de contrôle planten ondanks de abnormale omstandigheden er fris, hoewel enigszins geëtioloerd uitzien.

Uit vergelijking van de tweede met de derde en vierde groep blijkt, dat de naam „voetziekte” voor *Mycosphaerella*-aantasting minder juist is. De grootste schade wordt aangericht aan de hogere gedeelten van de plant, ook wanneer de voet gezond blijft. Daarentegen kunnen planten met zieke voet zonder infectie der hogere delen normaal blijven opgroeien, indien de luchtvochtigheid niet te hoog is. Bij hoge luchtvochtigheid kan een infectie van het epicotyl echter snel schadelijk worden. Brengt men sterk aangetaste planten uit de cultuurbuizen met 100 % luchtvochtigheid over in de kas, dan komt de aantasting tot staan. De hoofdstengel groeit normaal verder en zijspruiten ontwikkelen zich. Hetzelfde geval doet zich voor in Washington, Idaho en enkele andere staten van de U.S.A. met droog klimaat, waar zaadgoed gekweekt wordt uit besmette erwten uit het Oosten. In droge jaren blijft de voetaantasting uit het zaad afkomstig, gelocaliseerd. De plant groeit door en levert gezonde peulen. In vochtige jaren daarentegen breidt de voetaantasting zich uit en dan zijn ook de peulen geïnfecteerd (SNYDER, 48). Reeds bij de aantasting van het eerste bladoksel boven de cotylen kan de hoofdstengel doorbreken, hetgeen ook door GERRITSEN en BURGMANS (14) is

waargenomen. Gebeurt dit afsterven pas later, dan kunnen bij gunstiger weersomstandigheden zijstengels de taak overnemen; de aantasting betekent dan slechts een vertraging in de ontwikkeling.

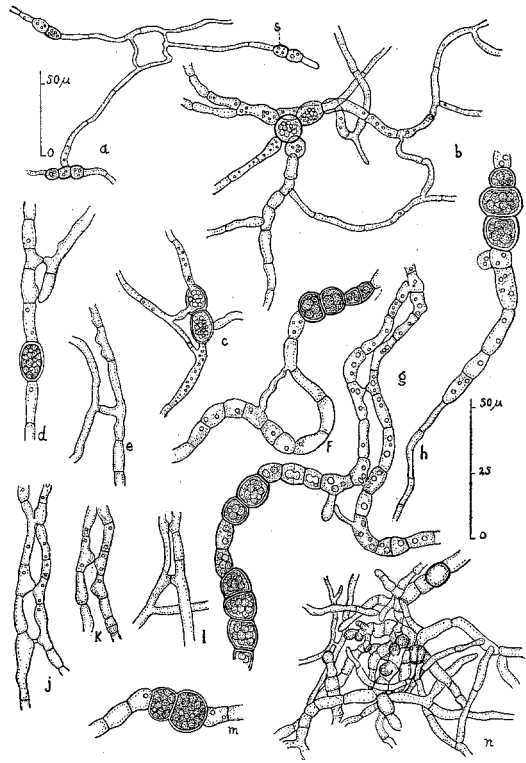
6. HET GEDRAG VAN DE SCHIMMEL IN EEN VOCHTIGE KAMER

Verschillende stammen gedragen zich enigszins verschillend. In de regel werden na ontkieming der pycnosporen 8–12 μ dikke hyphen gevormd, die slechts langzaam in de lengte groeien en waarvan 2, 4 of meer achter elkaar gelegen cellen overgaan in chlamydosporen (Fig. 1). Anastomosen tussen schimmeldraden van verschillende sporen en ook tussen die van eenzelfde spore kwamen voor. Na

Fig. 1

Cultuur in vochtige kamer. a: één dag oud; s: spore; b–m: 3–8 dagen oud, cel fusies, chlamydosporen; h: overgang van dikke naar dunne hyphen; n: 12 dagen oud; jong pycnidium.

Moist chamber culture. a: one day old (s: spore); b–m: 3–8 days old, note cell fusions, chlamydospores; h: transition of hyphae of the thicker type to the thinner. n: 12 days old culture with young pycnidium.



enkele dagen, bij sommige rassen ook wel onmiddellijk na de ontkieming, traden lange dunne hyphen op, soms twee of drie takken naast elkaar, ongeveer 2–5 μ dik, die snel een grote lengte bereikten, waarna weer korte, dikkere zijtakken gevormd werden. In de lange draden ontstaan plaatselijke delingen in de breedte waardoor onregelmatige lichamen ontstaan: de jonge pycniden. Ze liggen in rijen langs de dunnen draden, die door LUDWIG (35) „Suchhyphen” genoemd worden. De anastomosen zijn door LUDWIG en ook door JARIUS (23) beschreven, en wel voor *Ascochyta pisi*.¹⁾

¹⁾ Waarschijnlijk i. dit *Ascochyta pinodella* Jones of *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Stone geweest, daar beide onderzoekers spreken van wortelaantasting.

7. HET MICROSCOPISCH ZIEKTEBEELD

Het binnendringen van de parasiet

De kiembuizen der pycnosporen groeien over de cuticula, waarbij ze vooral de groeven tussen twee epidermiscellen opzoeken. Anastomosen zijn talrijk in vochtige omgeving: er wordt een netwerk op de oppervlakte gevormd. Door scheurtjes komen de hyphen onder de cuticula, die soms over een afstand van enige cellen

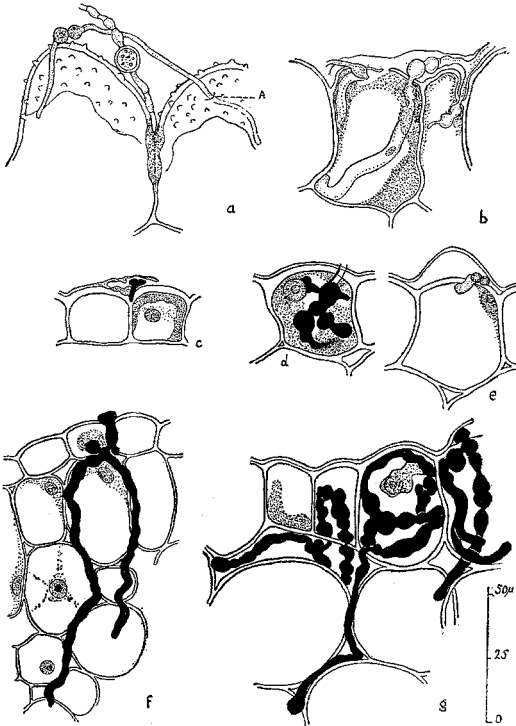


Fig. 2

Binnendringen van hyphen. a-c: in epicotyl van „William Hurst”, 1 tot 2 dagen na inoculatie, A: plaats, waar hyphen onder de cuticula verder groeit; d, e, g: in epicotyl van „Delicatesse”, 5 dagen na inoculatie; f: in blad van „Eminent”, 2 dagen na inoculatie

Entrance of hyphae. a-c: into the epicotyl of var. „William Hurst”, 2 days after inoculation. A: place where the cuticle has been penetrated; d, e, g: into the epicotyl of var. „Delicatesse”, 5 days after inoculation; f: into the leaf of var. „Eminent”, 2 days after inoculation.

opgelicht kan worden (Fig. 2). Onder de cuticula zetten de hyphen hun weg voort voornamelijk op de grens van twee cellen. De verdere groei hangt af van de omstandigheden waaronder de plant verkeert:

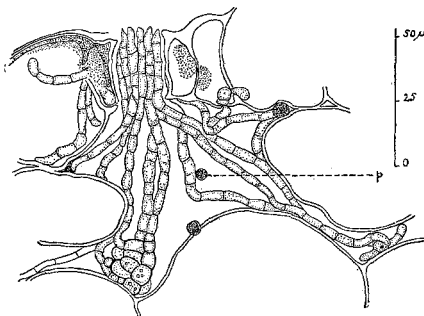
- Bij planten op het veld, waar op bladschijven macroscopisch kleine donkere puntjes zichtbaar waren, omringd door een lichte hof, konden microscopisch necrotische epidermiscellen waargenomen worden, onder de plaats waar het mycelium woekerde. Door een scheur in de dode epidermis, dringen de hyphen in de onderliggende intercellularen.
- Bij kasplanten dringen de hyphen door de buitenste wanden in de epidermiscellen (Fig. 2). Wel geschiedt dit meestal dicht bij een radiale wand, maar een oplossen van de middenlamel, zoals door LUDWIG beschreven, werd nooit waargenomen: twee epidermiscellen werden nooit door een myceliumdraad gescheiden gezien. In vele epidermiscellen werden myceliumdraden gevonden van het dikke type met veel chlamydosporen, de wanden volgend. Hier en daar werd de tangentiële binnenwand der cel doorboord (Fig. 2g),

- waardoor de hyphen toegang tot de onderliggende intercellularen verkregen.
- c. Bij planten bij een luchtvochtigheid van 100 % gekweekt, drongen de kiembuizen in bundels door de huidmondjes naar binnen (Fig. 3); de draden verspreiden zich in de intercellularen.

Fig. 3

Binnendringen in een huidmondje; epicotyl van „William Hurst”, één dag na inoculatie, bij 24 °C en 100 % luchtvochtigheid. Aanleg pycnidium. Microtoomcoupe, hyphen bij epidermis afgesneden. p: afbraakproduct.

Hyphae entering a stoma of the epicotyl of var. „William Hurst” one day after inoculation at 24 °C and high humidity. A pycnidium is developing. Microtomestide. The hyphae near the epidermis cut off. p: derivative of the cell walls.



Een mechanisch openscheuren en oplichten van de cuticula door hyphen is een bekend verschijnsel, o.a. bij *Septoria lycopersici* beschreven door KILLIAN (29); bij de schurftzwam, *Venturia inaequalis* (DUCOMET, 9; KEITT en JONES, 27; WILSON, 56; MARSH en WALKER, 37), en bij *Botrytis*: (BLACKMAN en WELSFORD, 1). Juist als bij *Mycosphaerella* volgen de *Botrytis*-hyphen aanvankelijk de weg van de minste weerstand, waarbij ze na doorboring der wanden in de epidermiscellen dringen. Wanneer een aantal draden aldus binnengekomen is, dringen de volgende direct door de huidmondjes, hetgeen misschien mogelijk wordt omdat zich vloeistof in de intercellularen verzamelt. JOHNSON (24) komt voor het binnendringen van *Colletotrichum Lindemuthianum* in een bonenblad tot dezelfde gevolgtrekking: hoewel de weg gewoonlijk door de cuticula genomen wordt „is it possible that both direct and stomatal penetration of the bean leaf may occur, but that the relative frequency of each may depend upon environmental conditions”. Ook hij komt tot de conclusie, dat bij hoog watergehalte van het blad de weg van de minste weerstand door de opstaande huidmondjes is.

De pathologische veranderingen der weefsels

Op de aangetaste plaatsen vertonen epidermis en onderliggende schorscellen een donkere wand en donkere gedesorganiseerde inhoud. Na binnendringen van de kiembuizen door de huidmondjes zijn deze necrotische cellen reeds een dag na inoculatie als donkere puntjes zichtbaar. In de intercellularen bevindt zich eveneens een donkere korrelige massa, waarin de hyphen ingebed liggen. De necrotische cellen liggen scherp gelocaliseerd temidden van gezond weefsel. Bij verse coupes in water, of na even opkoken, wordt de inhoud der gedesorganiseerde cellen geleidelijk lichter en ook de kleur van de intercellulaire substantie verbleekt als gevolg van een oplossen van een bruine kleurstof. De intercellulaire hyphen, omgeven door een nu lichtgele plastische stof, worden duidelijk zichtbaar. De draden volgen nauwkeurig de hoeken van de intercellularen. Ze liggen aangedrukt tegen de raakvlakken van twee cellen en nemen de plaats in van de lucht in het gezonde weefsel (Fig. 4). Bij de stippels vormt het mycelium uitbochtungen, zonder echter binnen te dringen. Het gedrag tussen de cellen is te vergelijken met dat bij het kruipen over de oppervlakte, waar ook celgrenzen worden opgezocht. Op de aangetaste plaatsen zwellen en vergelen de celwanden, zodat de ondiepe

stippels op de aanrakingsvlakken der cellen duidelijk zichtbaar worden. Waar hyphen de wanden raken, worden druppels gevormd, die tot de bovengenoemde geelbruine plastische massa samenvloeien (Fig. 3, 4 en 5). Na behandeling met water lost de intercellulaire substantie niet op in alcohol en kleurt zich niet met Soedan III noch met osmium-zuur. De stof heeft dus niet het karakter van een vet. Met ruthenium rood kleuren de kleine, nog tegen de celwanden aanliggende druppels zich rood, de grotere worden vuil-rood, terwijl de samengevloeide massa zich niet kleurt. Dit wijst erop, dat de druppels aanvankelijk nog het karakter van een pektaat hebben en later van samenstelling veranderen. De schimmel is blijkbaar in staat tot ontleden van de pektaten afkomstig van de buitenste lagen van de celwanden grenzend aan de intercellularen. Deze lagen, rijk aan pektaat (EAMES en MACDANIELS, 10) ontstaan uit de oorspronkelijke middenlamel (MARTENS, 38). Na een uur koken in 20 % kaliloog in een waterbad, is de substantie verdwenen, evenals na behandeling met SCHULZE's maceratie vloeistof. Beide reacties wijzen eveneens op het pektineachtig karakter van de stof. Met chloor-zinkjodium kleuren zich de secundaire verdikkingslagen der normale cellen blauw, die der zieke cellen geel vóór de behandeling met SCHULZE's maceratie vloeistof.

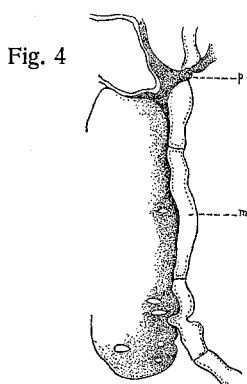


Fig. 4. Aangetaste cel; m: myceliumdraad in intercellulaire holte; p: afbraakproduct van de celwand.

Diseased cell; m: hypha in the intercellular space; p: derivative of the cell walls.

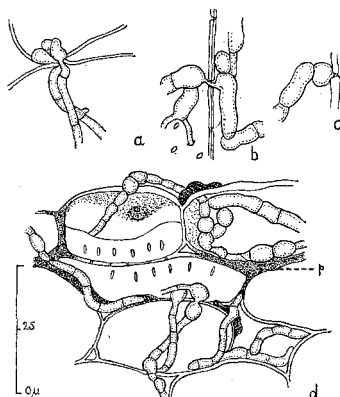


Fig. 5

Fig. 5. Intercellulaire en intracellulaire hyphen in schorsparenchym van „Kelvedon Wonder” en „Unica”, één dag na inoculatie, bij 24 °C en 100 % luchtvochtigheid. a, b, c: doorboringen van de stippelmembranen; p: afbraakproduct van de celwand.

Intercellular and intracellular hyphae in the cortex of vars. „Kelvedon Wonder” and „Unica” one day after inoculation at 24 °C and high humidity. a, b, c: hyphae piercing the pits; p: derivative of the cell walls.

Er na kleuren ook de wanden der zieke cellen zich blauw, hetgeen er op wijst, dat het gele afbraakproduct de uit cellulose bestaande lagen van de wand van de zieke cellen doortrekt. De vraag, welke rol de parasiet en welke de zieke cellen van de waardplant spelen, bij de afscheiding van de gele substantie, is nog niet opgelost. Of de hyphen alleen de primaire membranen aantasten, dan wel of zij ook van de celinhoud profiteren is moeilijk uit te maken: de cellen kunnen eerst gedood en dan als voedselbron gebruikt worden of omgekeerd. De necrotische

cellen zijn altijd in contact met hyphen, ze worden niet geïsoleerd en er ontstaat geen rotting.

Merkwaardig is het uitblijven van elke wondreactie van het weefsel om de necrotische plekken heen: na een mechanische verwonding daarentegen ontstaan suberine-afzettingen; celvergroting treedt op en delingswanden worden gevormd in het omringende weefsel.

In het midden van de vlekken verliezen de hyphen, die bedekt zijn door een dikke laag van het afbraakproduct, hun protoplasmatische inhoud. De hyphen aan de randen der vlekken behouden de inhoud, die zich met katoenblauw kleurt, langere tijd.

8. HERISOLATIE VAN MYCOSPHAERELLA UIT HET EPICOTYL

Zowel in het epicotyl als in stengel en blad is bij een levende plant in de kas de uitbreiding der vlekken aanvankelijk slechts gering, vooral in droge lucht. Tracht men de schimmel uit de donker verkleurde voet te isoleren, dan lukt dit soms al drie weken na de inoculatie niet meer, na twee maanden nog slechts bij uitzondering. Toch was de schimmel microscopisch nog tussen de schorscellen op te sporen, de hyphen waren echter leeg en geheel omgeven door het nu donkerbruine stofwisselingsproduct. Naast het aan de chlamydosporen duidelijk te herkennen *Mycosphaerella*-mycelium van het dikke type, werden andere schimmeldraden gevonden. *Verticillium* sp., *Botrytis cinerea* en *Fusaria* hadden toegang verkregen en konden geïsoleerd worden.

Ook in de literatuur zijn aanwijzingen te vinden, dat de necrosen veroorzaakt door schimmels van de *Ascochyta*-groep huisvesting kunnen verlenen aan andere micro-organismen. JONES (25) isoleerde o.a. *Fusarium* spp. uit door *Ascochyta* aangetaste zaden, waarbij hij opmerkt, dat in *Ascochyta*-vrije zaden deze schimmels zelden gevonden worden. Het samengaan van *Colletotrichum pisi* met *Ascochyta*, door WALKER en HARE (52) waargenomen, werd door OU (43) en OU en WALKER (44) nader bestudeerd. De eerste is een secundaire parasiet, die in *Ascochyta* vlekken binnendringt en daar acervuli vormt. Uit jonge aantastingen kunnen beide fungi geïsoleerd worden, later alleen nog *Colletotrichum*. Inoculaties met deze schimmel lukten alleen na verwonding of wanneer een sporenmengsel werd gebruikt, waarbij eerst *Ascochyta*-vlekken ontstonden en later *Colletotrichum* zichtbaar werd. Samen richten de zwammen veel schade aan.

In hoeverre secundaire parasieten door binnendringen in de necrotische weefsels van epicotyl of wortelhals een schadelijke invloed kunnen uitoefenen op de ontwikkeling van de plant zal nog nader uitgemaakt moeten worden. De donkere vlekken op het epicotyl, voortkomend uit zaadbesmetting, kunnen na door-groeien van de planten, zo weinig opvallen, dat secundair binnengekomen organismen gemakkelijk voor primaire veroorzakers gehouden kunnen worden. Dat geldt wellicht niet voor sterk pathogene stammen van *Fusarium* spp., wel voor vele half-parasieten.

9. DE UITBREIDING VAN HET MYCELIUM IN DE LEVENDE PLANT

Bij een luchtvochtigheid van 100 % gedraagt de schimmel in het epicotyl zich enigszins anders dan in drogere lucht: lange dunne draden groeien tussen de schorscellen in apicale richting. Hoewel zich meer mycelium ontwikkelt, blijft

de groei beperkt tot de buitenste schorslagen, onder het collenchym. In de hogere stengeldelen en in de bladeren is het intercellulaire mycelium ook bij matige luchtvochtigheid weelderiger dan in het epicotyl, terwijl bij hoge luchtvochtigheid de necrotische vlekken zich sterk vergroten. Vaten met bruine inhoud werden waargenomen; pycniden ontstaan. Evenals in cultures in een vochtige kamer ontstaan myceliumdraden van het dikke type bij geremde en van het dunne type bij grote groeisnelheid.

10. DE ONTWIKKELING DER PERITHECIËN

Voor het begin van het natuurlijk afstervingsproces van de erwtenplanten zijn in de regel scherp begrensde vlekken op bladeren en stengels te vinden. Zo gauw de plastiden der schorscellen verbleken, treedt een sterke myceliumwoekering op vanuit de randen der necrotische plekken, waar nog levende hyphen in de intercellulaire aanwezig zijn. Van hier breiden de hyphen zich waaivormig uit (Fig. 6). Ze doordringen de wanden der afstervende cellen, waarbij soms een vernauwing wordt waargenomen, op de plaats waar een draad zich door een stippel van een schorscel of van een houtvat boort (Fig. 5 en 7). Eenmaal in de cel, volgen de draden de celwanden; soms lopen twee of drie draden over enige afstand parallel, waarna ze zich herhaaldelijk vertakken. De richting van uitbreiding is in hoofdzaak tangentiëel, zodat onder epidermis en collenchym een netvormig mycelium ontstaat, dat aanleiding geeft tot afscheiding van deze lagen als een zilverachtig vliesje. Hieronder vermeerderd zich de schimmel zo sterk, dat men van een stroma zou kunnen spreken.

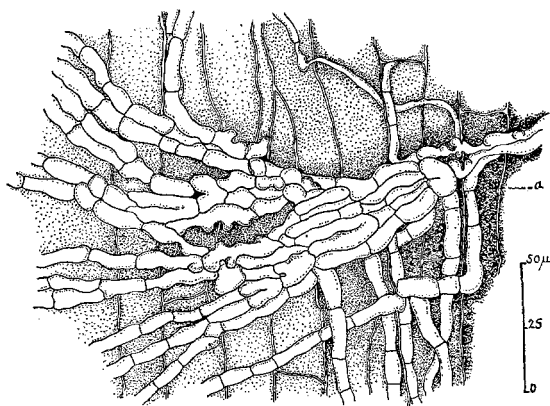


Fig. 6

Woekend mycelium in stengel van „Rondo”, 3 dagen na bevroren. a: necrotische cellen, reeds voordien aanwezig.

Mycelial proliferation in stem of var. „Rondo”, 3 days after freezing. a: necrotic cells from an old lesion.

Het tijdstip waarop de woekering begint, is soms nauwkeurig aan te geven: bij opslag van Rondo verwoestte een plotselinge, vrij strenge nachtvorst de oudste, zwaar geïnfecteerde bladeren en stengelgedeelten. De dag daarop was het begin der woekering waar te nemen. De woekering moet beschouwd worden als inleiding tot de peritheciën-vorming, want na twee dagen werden deze organen aangelegd op enige afstand van de oorspronkelijke donkere vlekken, voornamelijk in de bladstelen en in de stengels.

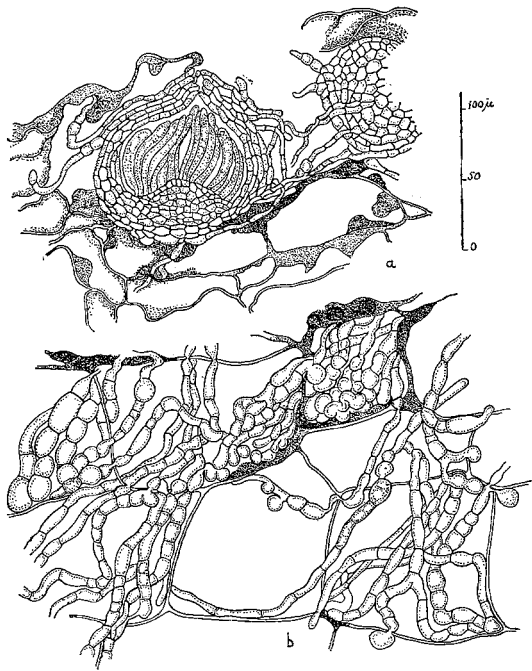
Wanneer als gevolg van ongunstige omstandigheden weefsels verzwakt zijn of afsterven, kan men bij een ogenschijnlijk gezonde plant ook doorwoekering van

cellen waarnemen. Als een eerste begin van dit proces kan men het binnendringen beschouwen in sommige epidermiscellen; nadat deze door het subcuticulaire mycelium verzwakt zijn. Ook in het epicotyl van planten bij hoge luchtvochtigheid gekweekt, vindt men nu en dan intracellulair mycelium (fig. 5). Hoe langer een plant aan de ongunstige omstandigheden weerstand kan bieden, hoe langer het doorwoekeren op zich laat wachten. Verzwakte of juist gedode cellen zullen de schimmel kans tot doorwoekering en vervolgens tot peritheciën-vorming bieden. Ook de proeven van RIETBERG kunnen hiermee verklaard worden: met *Mycosphaerella pinodes* geïnoculeerde planten werden aan aetherdampen blootgesteld. In de behandelde planten breiden de vlekken zich aanmerkelijk meer uit dan in de onbehandelde; waarschijnlijk vond ook hier celdoorwoekering plaats.

Fig. 7

Afgestorven schorscellen uit stengel van „William Hurst”. a: jonge peritheciën; b: mycelium woekering in schorscellen, 3 weken na inoculatie.

Dead cells of the cortex of var. „William Hurst”. a: young perithecia; b: mycelial proliferation in cells of the cortex 3 weeks after inoculation.



Het is onjuist, dat het mycelium in dit stadium woekert in het weefsel, dat het zelf gedood heeft (SNYDER, 48); de schimmel is niet als een perthophyt maar als een saprophyt te beschouwen. Evenmin groeit het saprophytische mycelium over het oppervlak der afgestorven plantendelen (HARE en WALKER, 21). Het gedrag van *Mycosphaerella* is anders dan dat van *Ophiobolus*, waar „runnerhyphae” over de oppervlakte der afgestorven tarwewortels groeien (GARRETT, 11), doch meer in overeenstemming met dat van *Venturia inaequalis*, waar na het afvallen der bladeren vanuit de randen der schurftplekken myceliumwoekering plaats vindt. In het midden van de aangetaste plekken is het mycelium te protoplasma-arm. Niet ver van de oorspronkelijke vlek ontstaan ook hier peritheciën (WILSON, 56).

11. DE RIJPING DER PERITHECIËN

Daar het tijdstip van aanleg afhankelijk is van de tijd van afsterven der weefsels zijn de peritheciën der lagere, vroeger afstervende stengelgedeelten en bladstelen al ver ontwikkeld, op het tijdstip dat de hogere peritheciën aangelegd worden. De rijping heeft dan ook niet gelijktijdig plaats, te meer daar niet alle planten in hetzelfde stadium verkeren. Bovendien zijn de asci in één perithecium van zeer ongelijke ontwikkeling: er werden er 48 tot 54 geteld, waarvan sommige met rijpe sporen, andere met ongedifferentieerde inhoud of nog maar pas aangelegd. Het uitspuiten der sporen uit de rijpe asci geschiedt op de wijze door STONE (51) beschreven. Fig. 8 geeft de verandering van een ascus aan tijdens het strekkingsproces benevens kiemende ascosporen. Een zelfde ongelijkheid in rijping van de peritheciën komt voor bij *Venturia inaequalis* (KNOPPIEN en VLASVELD, 30). Hier is het tijdstip van bladval van invloed.

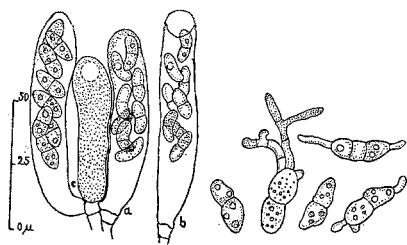


Fig. 8

Asci met rijpe sporen en kiemende ascosporen, uitgespoten 28 Dec. 1948, afkomstig van opslag „Rondo”. a en b: zelfde ascus, voor en na openspringen; c: lege ascus.

Asci with ripened spores and germinating ascospores, discharged Dec. 28th 1948 from volunteer plants of var. „Rondo”. a and b: the same ascus before and after opening of the pore; c: empty ascus.

De omstandigheden zijn van grote invloed op de duur der ontwikkeling. JONES (25 en 26) geeft 15–25 dagen op; HARE en WALKER (21) vinden een rijpingstijd van 25–30 dagen bij 16°, 35–40 dagen bij 12°, 55–60 dagen bij 8° en 90–100 dagen bij 4° C. Deze uitkomsten komen overeen met hetgeen te Wageningen gevonden werd: in het laboratorium waren peritheciën bij $\pm 16^\circ$ ongeveer drie weken na de aanleg rijp. Van peritheciën die op 25 November 1948 buiten waren aangelegd en die zich op planten buiten ontwikkelden, konden de eerste asci op 28 December in het laboratorium tot uitspuiten der sporen gebracht worden; op 3 Januari 1949 geschiedde het uitstoten ook buiten. De tijd tussen aanleg en rijping bedroeg dus 33 dagen bij een gemiddelde temperatuur van 2–4° C. Zwaar aangetaste opslag, die in November 1946 bevroor, bleef in de daaropvolgende strenge winter onder de sneeuw bedolven. Gedurende Maart 1947 ontwikkelden zich de sporen in de jonge asci en op 12 April werden de eerste rijpe sporen opgevangen. Nu verstreken er ruim vier maanden tussen het tijdstip waarop de peritheciën werden aangelegd en het rijpen der ascosporen. De gemiddelde temperatuur was gedurende de maanden December 1946, Januari, Februari en Maart 1947 resp. -0.5° , -1.5° , -5.8° en 3.8° C.

Niet alleen de temperatuur maar ook de regen kan in het minimum zijn: SWIERSTRA nam half Juli 1947 jonge peritheciën op afstervende erwtenplanten waar. De rijping had echter pas plaats, toen er na de droge zomer weer regen viel. Geregelde contrôles wezen uit, dat op 9 September voor het eerst sporen uitgestoten werden; de tijd tussen aanleg en rijping bedroeg ongeveer twee maanden. Lage temperatuur in de winter en droogte in de zomer zullen remmend werken op de voortgang van de processen, die zich achtereenvolgens afspelen, zoals aanleg van asci, sporenaanleg en rijping. De optimale omstandigheden waaronder deze processen plaats vinden, zijn nagegaan voor *Venturia*

inaequalis door WILSON (56); het temperatuur-optimum is lager voor de aanleg en voor de groei van de asci dan voor de rijping. Wellicht geldt iets dergelijks voor de peritheciën van *Mycosphaerella pinodes*. Een onderzoek ingesteld door VAN DER LINDE maakt dit waarschijnlijk: Stukjes stro met peritheciën, in November nog op het veld te vinden, werden uitgelegd bij verschillende temperaturen, droog en vochtig, in het licht en in het donker, zowel buiten als in het laboratorium. In alle gevallen werd een uitspuiten der sporen tussen 15 Maart en 30 April geconstateerd. Het snelst rijpten de peritheciën, die van 26 November tot 26 Januari aan buitenlucht en licht blootgesteld waren geweest en die vervolgens resp. twee weken bij 12 °C en vier weken bij 18 °C bewaard waren. Volgens VAN DER LINDE varieerde de diameter der peritheciën tussen 50 μ en 160 μ in November; in het voorjaar was geen verschil in vergelijking met het uitgangsmateriaal waar te nemen (± 150 metingen). „Klein en groot” is blijkbaar niet synoniem met „minder of meer ontwikkeld”. Tijdens de aanleg wordt blijkbaar de grootte direct bepaald. De aanleg geschiedt waarschijnlijk slechts éénmaal tijdens het afsterven van de erwtenplanten. Nieuw aangelegde peritheciën werden op het oude stro niet gevonden. Dit is niet in overeenstemming met wat HARE en WALKER (21) hierover opmerken.

12. HET KWEKEN VAN PERITHECIËN IN REINCULTUUR

Het lukte aan HARE en WALKER (21) peritheciën te kweken op havermoutagar, niet echter aan WEHLBURG (53), die zijn cultures op gesteriliseerde erwtenstengels en op verschillende agarbodems aan afwisselend hoge en lage temperatuur blootstelde. Te Wageningen werden op havermoutagar slechts een enkele maal peritheciën gevonden, die echter degenereerden zonder de sporen tot rijpheid te brengen. Meer succes hadden HANSEN en SNYDER (20) en SNYDER en HANSEN (50), die peritheciën konden kweken op verse erwtenstengels, ontsmet door propyleen-oxyde, waarvan men een kleine hoeveelheid in een afgesloten ruimte deed verdampen. Waarschijnlijk wordt het schorsparenchym door deze bewerking in een zodanige toestand gebracht, dat het mycelium de cellen gemakkelijk doorwoekeren kan.

Nu werd te Wageningen op andere wijze hetzelfde bereikt. Planten gedurende een paar weken in wijde buizen steriel opgekweekt, werden gedurende 16 of 24 uur aan aetherdamp blootgesteld (1 of 2 druppels per buis van 50 cc inhoud). Andere steriele planten verbleven 16 uur bij -20°C. Stengelgedeelten van de aldus behandelde planten en van onbehandelde steriele planten werden uitgelegd in petrischalen met havermoutagar naast ongeveer vijf dagen oude kolonies van *Mycosphaerella pinodes*. De onbehandelde stengelstukjes vertoonden na één dag bruin verkleurde plekken, waarop zich na korte tijd oppervlakkig luchtmycelium ontwikkelde. Na enkele dagen waren hier pycniden te vinden. De schorsparenchymcellen waren op deze plaatsen niet doorwoekerd; andere stengelgedeelten waren soms nog fris groen. De schimmel gedroeg zich hier in overeenstemming met hetgeen reeds bij levende planten werd waargenomen. Anders was het beeld dat de behandelde stengelstukjes vertoonden: zij werden zonder voorafgaande verkleuring direct door het mycelium doorwoekerd. Bij de stengels die de intensiefste behandeling met aether ondergaan hadden, begon de doorwoekering pas na drie tot vijf dagen. In alle gevallen onstond plaatselijk een stroma in het schorsparenchym; een groot aantal peritheciën werd aangelegd. Ongeveer

vijftien dagen na het begin van de doorwoekering bevatten zij asci met rijpe sporen. SNYDER en HANSEN (50) vermelden eveneens dat peritheciënvorming samengaat met spaarzame ontwikkeling van luchtmycelium. Zij vermelden echter het slechts microscopisch waarneembare stroma in het schorsparenchym niet.

13. DE PERIODEN VAN SPOREUITSTOTING TE VELDE

In Fig. 9 is het verloop van de sporeuitstotingen schematisch weergegeven, zoals dit na twee jaren waarneming te Wageningen werd vastgesteld. De jonge planten worden in het voorjaar besmet. Na uitbreiding der vlekken, pycnidenvorming en herhaalde pycnosporen-infecties, heeft een vroegtijdig afsterven van de zieke planten in Juli plaats. Er worden peritheciën aangelegd, die ongeveer eind Augustus rijp zijn en sporen uitstoten tot ongeveer half October. Daarna rijpen op dit oude stro nog enkele peritheciën na, waardoor voornamelijk in het voorjaar nog enkele uitstotingen te verwachten zijn. Stroresten en peritheciën zijn in Juli vergaan. Door de najaarsuitstoting kan eventueel aanwezig opslag geïnfecteerd worden. Deze planten sterven na een zware nachtvorst en er worden dan peritheciën aangelegd, meestal laat in de herfst. Na een langzame rijping tijdens de wintermaanden vinden in het voorjaar sporeuitstotingen plaats, waardoor het jonge gewas weer besmet wordt. Ook deze stroresten vergaan in Juli. Evenmin als bij de schurftzwam is hier direct verband tussen de ontwikkelingstoestanden van gastheer en van parasiet (KEITT en JONES, 27). In het voorjaar 1947 had sporeuitstoting overvloedig plaats ten tijde, dat het jonge gewas op het veld stond.

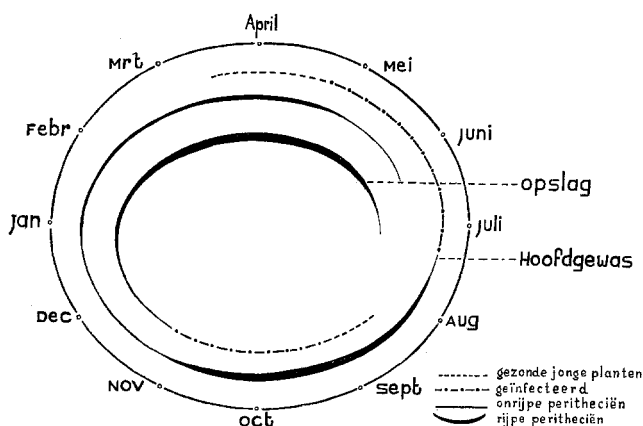


Fig. 9.
Schema van het ziekteverloop bij ascosporen-infectie.

*Scheme of the life-cycle of *Mycosphaerella pinodes* on plants of the main crop (hoofdgewas) and on volunteer plants (opslag). Infection by ascospores.*

Dat een dergelijk samentreffen voor Nederland „meestal” plaats vindt, zoals SNYDER (48) voor Wisconsin aangeeft, is onwaarschijnlijk. Na de zachte winter 1947-1948 waren nog slechts weinig ascosporen in April aanwezig: de vluchten hadden reeds eerder plaats gevonden. Ook in 1949 zette het uitstoten der rijpe sporen zich gedurende de wintermaanden voort; in April zullen waarschijnlijk nog slechts sporadisch peritheciën met gevulde asci te vinden zijn.

14. CORRELATIE TUSSEN REGENVAL, HET UITSTOTEN DER ASCOSPOREN EN DE AANTASTING VAN HET ERWTENGEWAS

Onderzoek naar deze correlatie werd gedaan in het voorjaar 1947 en het najaar 1948, in analogie met het *Venturia*-onderzoek. (VAN DE POL, 46; KNOPPIEN en VLASVELD, 30). In het voorjaar 1947 werd op een veld van 4 x 200 m van het Laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek een groot aantal erwtenrassen tussen besmette opslag van het vorige jaar uitgezaaid. Van begin April tot half Juni werden dagelijks waarnemingen verricht door VAN DER KLOES. Een tweede uitvoerige dagelijkse controle vond plaats van half September tot eind October 1948. Om in deze periode over voldoende „opslag” te beschikken werden begin September Rondo-erwten dicht uitgezaaid in rijen op 20 cm afstand op een veld van 5 x 13 m. Tussen de goed opgekomen, gezonde planten werd op afstanden van 1 m stro met rijpe peritheciën van de vorige oogst uitgelegd.

In beide perioden bleken op vrijstaande glaasjes minder sporen opgevangen te worden dan op die welke boven uitgezochte stukjes stro geplaatst waren. (p. 45). Telling was in beide gevallen niet goed mogelijk, niet alleen door het soms zeer grote aantal, maar vooral door de zeer onregelmatige verspreiding. Door schatting werd in beide perioden onderscheid gemaakt tussen „weinig, matig en veel.” Uiteraard zijn de aantallen bij de qualificatie „veel” op glaasjes direct boven stro geplaatst, veel groter dan bij dezelfde qualificatie op vrij staande glaasjes. Op de eerste werd onder „weinig” enkele verspreide sporen verstaan, onder „matig” enige tientallen, onder „veel” honderden. De regencijfers werden ter beschikking gesteld door de Meteorologische Afdeling van het naburige Laboratorium voor Natuurkunde van de Landbouwhogeschool.

De mate van aantasting der planten werd gewaardeerd door het geven van een indexcijfer lopend van 0–100, in navolging van de methode van HARE en WALKER (21). De volgende schaal werd opgesteld:

- 10 Licht verkleurde puntjes op de bladeren.
- 15 Donkere puntjes, al of niet met lichte hof, hoogstens vijf per blad.
- 20 Donkere puntjes, meer dan tien per blad, op twee tot vijf bladeren per plant. De puntjes duidelijk gescheiden.
- 25 Als 20, doch de puntjes vergroten zich tot lichte vlekken.
- 30 Als 25, doch de vlekken zijn groot en donker.
- 35 De vlekken vloeien samen tot necrotische bladgedeelten. Pycniden aanwezig.
- 40 Op de drie onderste bladeren komen deze vlekken met pycniden voor.
- 45 Op de vijf onderste bladeren komen deze vlekken met pycniden voor.
- 50 Op de zeven onderste bladeren komen deze vlekken met pycniden voor. Voorkomen van vlekken op bladstelen en stengels.
- 55 Op de negen onderste bladeren komen grote vlekken met pycniden voor. Internodiën over grote afstand donker gekleurd.
- 65–75 Alle bladeren aangetast, behalve de hoogste. Vlekken tot $\frac{1}{3}$ van de bladoppervlakte beslaand. Stengels sterk aangetast.
- 80–90 Verdorren en afsterven der onderste bladeren en bladstelen. Stengels met grote roestbruine plekken, zeer veel kleine en grotere vlekken over de gehele plant verspreid. Aanleg van peritheciën op de oudste bladstelen.
- 95–100 De gehele plant sterft af. Mycelium woekering en aanleg van peritheciën tot op de hoogste bladstelen.

De moeilijkheid bij het opstellen van deze tabel ligt hierin, dat drie verschillende processen zich tegelijkertijd voltrekken. 1. Het optreden van steeds meer geïsoleerde donkere puntjes wordt veroorzaakt door het toenemen van het aantal infecties door afzonderlijk aanwaaiende ascosporen. Elke binnendringende kiembuis vormt een necrotisch vlekje. (index 10-20) 2. Deze vlekjes vergroten zich wanneer het mycelium is binnengedrongen (index 25-35). 3. Na pycniden-vorming komen nu ook infecties door pycnosporen tot stand, die zich in tegenstelling tot de ascosporen-infecties direct als onregelmatige licht bruine vlekken voordoen. Wanneer nl. met spattende regendruppels een slijm massa met veel pycnosporen op een plantendeel terecht komt, dringt een groot aantal kiembuizen onder de cuticula, waardoor veel epidermiscellen afsterven en een diffuus beeld ontstaat. Deze infecties vinden het eerst bij de grond plaats en komen later over de gehele plant voor (index 40-75). Tenslotte sterven de sterk aangetaste delen af en peritheciën worden aangelegd. Een plant, die al in een ver stadium is gekomen, bv. met een index van 50, kan op de hoogste bladeren juist weer nieuwe ascosporen infecties vertonen in stadium 10 of 15. In dat geval werd toch het cijfer 50 gegeven.

Fig. 10 en 11 geven voor beide proefseries de correlaties tussen regenval, aantal opgevangen sporen en ziekte-index. Het blijkt, dat de ascosporen-vluchten altijd plaats vinden na regenval. De hoeveelheid regen is niet van belang: een bui van ruim 2 mm op 23 April 1947 (Fig. 10) deed veel en een bui van 15 mm op 4 Mei deed slechts weinig sporen vrij komen. Dat na regen soms weinig of in het

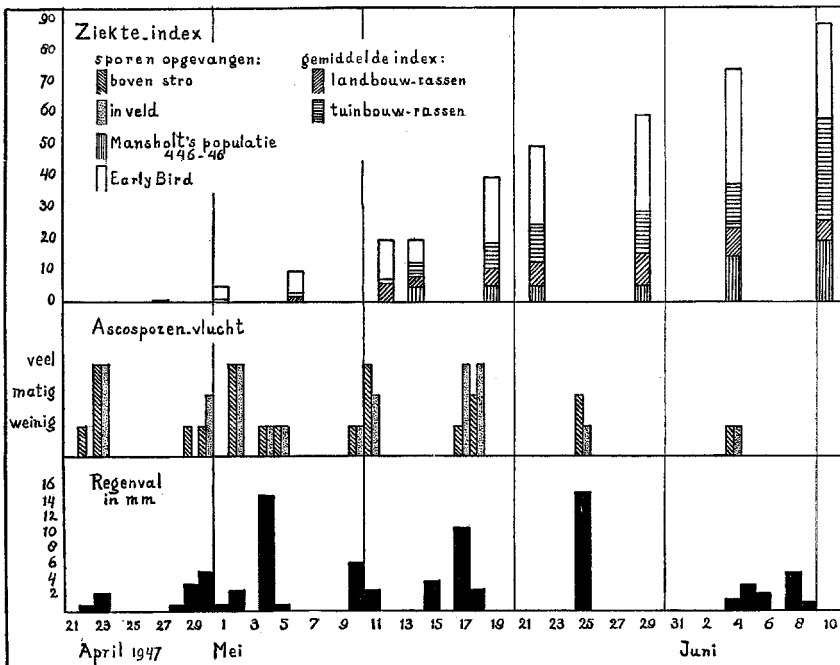


Fig. 10. Correlatie tussen regenval, ascosporen-vlucht en ziekte-index bij 34 erwten-rassen (naar Van der Kloes).

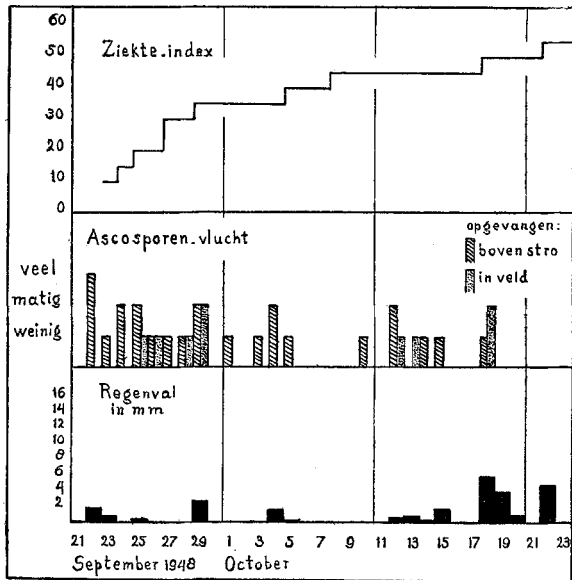
Correlation between rainfall, discharge of ascospores and the incidence of disease for 34 varieties of peas (after Van der Kloes).

geheel geen sporen uitgestoten worden, zoals op 28 April, 1 en 15 Mei het geval was, kan verklaard worden uit de regens van vorige dagen. De aanwezige rijpe asci hadden alle hun sporen reeds uitgestoten. De regen na 5 Juni 1947 en na 19 October 1948 had evenmin enig effect: de peritheciën waren leeg, zoals na onderzoek bleek. In een droge periode, zoals tussen 6 en 9 Mei 1947, hebben de asci gelegenheid tot rijpen, zodat vele in het stadium komen, waarop na bevochtiging, sporen uitgestoten kunnen worden. De regen van 10 en 11 Mei deed dan ook veel sporen vrijkomen. Een dergelijk massaal gebeuren, voorafgegaan door een tegenhouden van de ontwikkelingsprocessen door bepaalde uitwendige omstandigheden, komt ook elders voor: het gelijktijdig bloeien van Duifjes-orchideeën (COSTER, 5) en van het Chocolade-bloempje (KERLING, 28) in de tropen is tot een gelijksoortige combinatie van factoren terug te voeren.

Fig. 11

Correlatie tussen regenval, ascosporen-vlucht en ziekte-index bij „Rondo”.

Correlation between rainfall, discharge of ascospores and the incidence of the disease (var. „Rondo”).



Dat ook zware dauw de asci tot uitspuiten der sporen kan brengen, bleek op 26, 27 en 28 September en op 1 en 3 October 1948 (Fig. 11), toen het stro 's morgens door druppels bedekt was. Op 10 October had misschien een toevallige druppel enkele peritheciën bereikt. Tengevolge van de grote vochtigheid in het najaar verliep de gehele ascoporen-uitstoting sneller dan in het voorjaar, toen droge perioden het uitstoten tegenhielden. Na 18 October 1948 konden geen sporen meer opgevangen worden. Dit is in overeenstemming met een waarneming van SWIERSTRA, die in 1947 uitstotingen vond tussen 8 September en 13 October.

Reeds twee dagen na de eerste sporenvluichten waren de eerste symptomen op de plantjes waarneembaar. In April en begin Mei 1947 liep de ziekte-index aanvankelijk slechts weinig op. Na 15 Mei, toen pycniden gevormd waren, steeg de index echter snel en een epidemie, zoals deze optrad bij de gevoelige en vroege „Early bird”, zou zeker ook andere rassen geteisterd hebben, als de zomer van 1947 niet buitengewoon warm en droog was geweest. De ziekte kwam daardoor vrijwel tot staan, de peulen waren slechts weinig aangetast, hoewel sterker dan bij overeenkomstige rassen op andere, niet besmette velden. RJACHOVSKY (47)

vermeldt eveneens, dat een betrekkelijk kleine hoeveelheid neerslag voldoende is om de eerste ziekte-symptomen, die aan een epidemie voorafgaan, te voorschijn te brengen.

Tijdens de tweede periode van waarneming, in het najaar van 1948, liep de ziekte-index van het opslag direct zeer snel op (Fig. 11). Toch deed het optreden van pycniden vanaf 29 September de index slechts weinig meer stijgen, daar tussen deze datum en 12 October een droge periode optrad. De aanwezige vlekjes werden wat groter, doch de nieuw gevormde blaadjes waren vrij van infectie. De regens vanaf 12 October deden weer sporen vrijkomen, die op de nu juist opgevouwen blaadjes vlekjes veroorzaakten. De verdeling van de regen in de afgelopen periode weerspiegelde zich in de verdeling van de vlekjes over de planten! De oudere vlekken breidden zich na enkele dagen uit, waardoor de index verhoogd werd. Tenslotte bleef het bij de index 50: geen ascosporen kwamen meer vrij en lage temperatuur belette de verdere ontwikkeling, zowel van de plant als van het mycelium.

15. INVLOED VAN DE WINDRICHTING OP DE VERSPREIDING DER SPOREN

In het najaar 1948 was de invloed van de wind op de infectie duidelijk te zien. Van de zes rijen erwten ten Noorden van een bundel besmet stro vertoonde de eerste aanvankelijk een hoger ziekte-index dan de tweede; deze weer hoger dan de derde. De vierde rij had de laagste index, terwijl de vijfde en zesde weer onder invloed van de volgende strobundel stonden en daardoor een iets hoger index hadden (Fig. 12). Toen de pycnosporen-infectie de overhand kreeg, werden

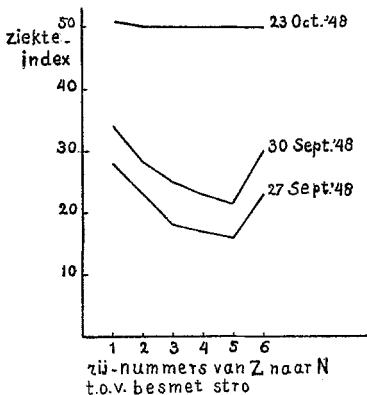


Fig. 12

Verloop van de ziekte-index van de rijen 1-6, resp. van Zuid naar Noord tussen twee besmette strobundels.

Change in the disease incidence of rows 1-6. Rows running from South to North between two infected heaps of pea refuse.

de verschillen genivelleerd. De afstand waarover de sporen door de wind vervoerd kunnen worden, is niet bepaald. Volgens HARE en WALKER (21) zou deze ongeveer 400 m bedragen.

16. OVERGANG MET ZAAD

Van de rassen Mansholt G. E. K., Eminent en Venlose Lage werden, toen het gewas op ruiters stond, peulen uitgezocht, die nog goed gesloten waren en waarvan de buiknaad vlekken van *Mycosphaerella pinodes* vertoonde. De peulen werden uitwendig met sublimaat ontsmet en vervolgens geopend. De nog geheel blanke zowel als de reeds bruin verkleurde jonge erwten en de funiculi werden gehalveerd en op agar uitgelegd. Uit alle drie genoemde groepen kon *Mycosphaerella* geïso-

leerd worden, benevens andere fungi: *Botrytis cinerea*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium solani*, *Ascochyta pinodella*. Hieruit blijkt, dat blanke erwten uit zieke peulen toch besmet kunnen zijn o.a. met *Mycosphaerella pinodes*. Mogelijk dringt de schimmel vanuit de peulwand door de funiculi de jonge erwten binnen, doch het is moeilijk uit te maken of de geïsoleerde schimmels zich buitenop of in de funiculi hebben bevonden.

Voor de zaadteelt is dus keuring van de peulen te velde aan te raden (DOYER, 7), daar ook zaad zonder uiterlijk zichtbare symptomen besmet kan zijn. Zaadontsmetting helpt hiertegen niet. (CROSIER, 6; NOLL, 42; SNYDER, 48; LEACH en SNYDER, 32).

17. VATBAARHEID DER RASSEN

In het voorjaar 1947 werden op een veld van het laboratorium tussen besmette opslagplanten van het ras Rondo, een 130-tal verschillende rassen uitgezaaid, die verkregen waren door tussenkomst van de Peulvruchten Studie Combinatie. De bedoeling was, de vatbaarheid dezer rassen voor *Mycosphaerella pinodes* na te gaan. Om de volgende redenen kon echter geen betrouwbaar resultaat verkregen worden:

1. De besmette opslagplanten stonden onregelmatig over het veld verdeeld.
2. Op de plaatsen, waar het vorige jaar ruiters gestaan hadden, bleek de invloed van het oude stro op de jonge planten duidelijk.
3. Het zaaizaad was soms voor een hoog % ziek.

Tengevolge van deze omstandigheden kon een ras op de ene plaats hevig aangetast zijn, terwijl een herhaling elders er gunstig voorstond. Toch was het duidelijk, dat de landbouwerwten minder vatbaar zijn dan de tuinbouwerwten. Van de eerste groep waren Stijfstro en enkele Mansholt-kruisingen het minst vatbaar. Vatbaarder waren Unica, Parel, Conservo en Rondo, terwijl Zelka, Gruno en Hala tot de vatbaarste behoorden. Van de tuinbouwrassen zijn Early Bird, Kelvedon Wonder, Eminent, Venlose Lage en Delicatesse het sterkst vatbaar, Lincoln en Senator iets minder (SWIERSTRA). Voor zover dezelfde rassen getoetst zijn, is dit resultaat in overeenstemming met dat van GERRITSEN en BURGMANS (14). In het veld kunnen de omstandigheden, waaronder de infectie plaats vindt, niet voor alle groepen gelijk gehouden worden. Toevallige regenverdeling heeft grote invloed (WEIMER, 54). GERRITSEN en BURGMANS (14), GOOSSENS (17), KRABBE en VAN DER LINDE werkten daarom met kasplanten, die beter onder contrôle te houden zijn. De resultaten dezer onderzoekers komen hierin overeen, dat een inoculatie-methode, die de planten hevig ziek maakt, bv. het brengen van mycelium in een wond aan de voet, geen verschillen in vatbaarheid tot uiting brengt. Na inoculatie met een pycnosporen-suspensie vond KRABBE dat bij Mansholt's G. E. K., Manholt's Pluk, Unica en Stijfstro de vlekken meer geïsoleerd bleven bij slechts geringe stengelaantasting. Bij Hala, Gruno, Vinco en Zelka stierven vele planten af na sterke vlekuitbreiding. Ook hier bleek Venlose Lage tot de vatbaarste tuinbouwrassen te behoren. VAN DER LINDE, die deze proeven nog eens herhaalde, nam duidelijk waar, hoezeer het tot stand komen van een infectie van omstandigheden afhankelijk is: een druppel suspensie, die op een toevallige plaats blijft liggen, geeft juist daar een sterke aantasting. Rassen met komvormige stipulae hebben kans op aantasting bij de knopen; liggende stengels

krijgen eerder vlekken dan rechtopstaande. Kelvedon Wonder gekweekt als rijserwt is aanmerkelijk minder ziek dan liggend op het veld.

Getracht werd de planten te testen onder zo constant mogelijke omstandigheden volgens de methode genoemd onder 5e (p. 44). De omstandigheden waren voor alle gevallen gelijk: 100 % luchtvochtigheid, 24 °C, donker, gelijke dichtheid en tijd van inwerking van de suspensie. Wel ontwikkelden de planten zich in een abnormale omgeving, doch de controle-planten waren na drie weken, op het ogenblik, dat de geïnoculeerde afstierven, nog bleekgroen en fris. Een ander verschil met de vroegere inoculatieproeven is het volgende: nu werd niet het al of niet indringen van de kiembuizen gecontroleerd, maar getracht werd verschil te vinden in uitbreidingsresistentie bij aantasting van het epicotyl. Een andere waardering werd gebruikt voor deze voetaantasting dan die voor ascosporenbesmetting te velde. Het verloop was als volgt:

1. Epicotyl, soms ook hypocotyl en wortel met lichtbruine nauwelijks zichtbare puntjes.
2. Epicotyl, soms ook hypocotyl en wortel met duidelijke bruine puntjes, overgaand in vlekjes.
3. Indien wortel aangetast: hals lichtbruin; stengel tot zover de suspensie reikte met donkere vlekken, die overgaan in strepen.
4. Wortelaantasting als 3. Vlekken en in de lengte verlopende strepen op de stengel vloeien samen tot een bruine verkleuring.
5. Wortel, indien aangetast, donker bruin. Stengel tot zover de suspensie reikte, donkerbruin. Internodiën er boven licht.
6. Wortel als 5. Stengel tot zover de suspensie reikte bruin doorschijnend met bruine vloeistofdruppels die naar buiten komen. Eerste internodium bruin.
7. Wortel als 5. Stengel tot aan 3e internodium verkleurd.
8. Als 7. Jonge blaadjes en top verschrompelen.
9. Als 8. Gehele stengel bruin of verschrompelend.
10. Plant geheel bruin of vaalgroen, afgestorven.

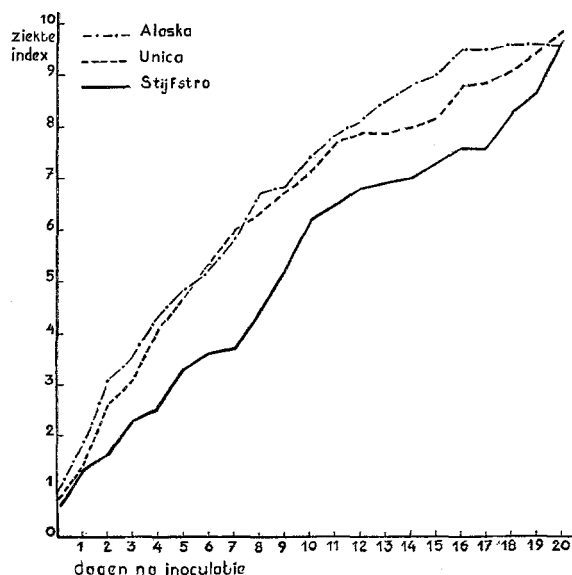


Fig. 13

Ziekte-verloop bij de rassen Alaska, Unica en Stijfstro na inoculatie van kiemplanten, gehouden bij 24 °C en hoge luchtvochtigheid.

Progress of disease incidence in varieties „Alaska, Unica and Stijfstro”. Inoculated seedlings kept at 24 °C and high humidity.

De ziekte-index liep snel op van 1 tot 4, een direct gevolg van intercellulaire myceliumontwikkeling. Na een week beginnen de cellen neiging tot afsterven te vertonen en intracellulaire hyphen treden op. Bij een snel groeiende variëteit als Alaska blijft de stengel voor en de aantasting komt niet verder dan 7; bij andere, gevoeliger voor de abnormale omstandigheden, verlangzaamt het tempo der aantasting slechts tijdelijk. De stadia 8 en 9 worden snel doorlopen, waarna de planten sterven. De verschillen in uitbreidingsresistentie tussen de onderzochte rassen zijn slechts klein (Fig. 13). Ook nu blijken de tuinbouwrasen minder resistent dan de landbouwrasen. Van deze zijn Mansholt's G. E. K. en Stijfstro weer resistenter dan bv. Unica.

18. CONCLUSIES

Mycosphaerella pinodes kan op alle delen van de erwtenplant vlekken veroorzaken. De hyphen dringen onder de cuticula en bereiken op verschillende wijzen, afhankelijk van de omstandigheden, de intercellulair van het onder de epidermis aanwezige parenchym. De vlekken op jonge stengels, bladeren, bladstelen en peulen vergroten zich sterk bij hoge luchtvochtigheid, waarbij pycniden gevormd worden. De pycnosporen, verspreid door regen, veroorzaken nieuwe infecties. Nooit werd een inwendige uitbreiding van het mycelium waargenomen, ver van de plaats van infectie in een levenskrachtige plant. In droge lucht breiden de vlekken zich weinig of niet uit, de aangetaste blad- en stengelgedeelten blijven als necrotische plaatsen zichtbaar. Bij een infectie van het epicotyl heeft geen vorming van pycniden plaats. Het mycelium ligt hier tegen de geheel gedesorganiseerde cellen van het schorsparenchym aan, daar waar twee cellen aan elkaar grenzen, echter zonder binnen te dringen. De in een vers praeparaat moeilijk op te sporen hyphen zijn ingebed in een bruine korrelige massa, een product van de celwanden en mogelijk van de celinhoud, onder invloed van de schimmel gevormd. Het is de vraag of hier enzymwerking in het spel is. Bij pectinase-vormers, zoals *Rhizopus nigricans*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium coeruleum*, e.a. (HARTER en WEIMER, 22; CHONA, 4; MENON, 39), worden cellen op een afstand van de hyphen door het enzym aangetast, waarna de schimmel zich in het dode weefsel kan uitbreiden. Bij *Mycosphaerella* hebben necrotische cellen echter altijd contact met hyphen. Indien de cellen inderdaad door een enzym eerst gedood en dan pas als voedselbron gebruikt worden, zou *Mycosphaerella* een *perthophyt* zijn in de zin bedoeld door MÜNCH (40).

In het oudste gedeelte van de aantasting van het epicotyl verliezen de hyphen hun protoplasma, slechts uit de randen valt de schimmel nog te isoleren. Bij een oudere plant, die in matig vochtige omgeving groeit, lukt dit enkele weken na inoculatie in het geheel niet meer. De aantasting van het epicotyl is daardoor van minder betekenis dan die van hogere delen. Wel breidt het mycelium zich in het epicotyl bij jonge planten bij hoge luchtvochtigheid uit in de intercellulair, maar de uitbreiding blijft beperkt tot enkele cm in de lengterichting van de stengel. In radiale richting blijven de hyphen in de buitenste schorslagen, en zelfs onder extreme omstandigheden komen ze zelden tot aan de endodermis. Dat deze remmend zou werken op de uitbreiding, zoals GILCHRIST (15) veronderstelt is uitgesloten. Welke factoren hier de uitbreidingsresistentie bepalen is moeilijk uit te maken. Wondreacties werden niet waargenomen. Mogelijk is hier sprake van een zelfvergiftiging van de parasiet, die giftige stoffen uit celinhoud en celwand vrij

maakt, waarin de schimmeldraden tenslotte afsterven. Deze hypothese acht GÄUMANN (12) mogelijk, maar moeilijk te bewijzen.

Vaak is dwerggroei een gevolg van voetaantasting: de internodiën der zieke planten blijven kort. Volgens WENT (55) vormen de wortels een stof, caulocaline, die door de levende cellen in apicale richting vervoerd wordt en die tezamen met auxine, de lengtegroei der internodiën veroorzaakt. Mogelijk houdt de necrotische cylinder, gevormd door de aangetaste buitenste schorslagen, dit vervoer tegen.

Welke rol secundaire parasieten spelen, die later in het necrotische weefsel binnendringen, is onbekend.

Tijdens het natuurlijk afstervingsproces van de erwtenplant verandert de schimmel van karakter. Vanuit de randen van de vlekken begint een sterke ontwikkeling van de nog levende draden, die de verblekende schorscellen over grote afstand doorwoekeren. Het nu intracellulaire mycelium vormt een stroma onder epidermis en collenchym in stengels en bladstelen. Peritheciën worden enkele dagen na het begin van de woekering aangelegd. In dit stadium is *Mycosphaerella* een saprophyt. De in de zomer aangelegde peritheciën kunnen niet alleen een besmettingsbron zijn voor het nog te velde staande gewas, maar ingeval meerdere generaties erwten naast of na elkaar geteeld zouden worden, zoals de conserven-industrie wenst, zouden de ascosporen ook naburige velden kunnen besmetten. Bij één oogst per jaar heeft alleen de opslag hiervan te lijden.

Of *Mycosphaerella pinodes* door het voorkomen van twee soorten sporen zich beter kan handhaven dan bv. *Ascochyta pinodella*, die alleen over pycnosporen beschikt, is de vraag. Uit de literatuur blijkt, hoe wisselend het voorkomen dezer beide fungi is in verschillende jaren. De ascosporen zijn geen zekere bron van besmetting, zoals bij *Venturia inaequalis*, waar de peritheciën zich gedurende de winter ontwikkelen en de sporen tussen Maart en Juni uitgestoten worden, zodat er altijd kans op infectie in het daarvoor gevoelige knopstadium bestaat. Bij *Mycosphaerella pinodes* verloopt tussen de aanleg der peritheciën en de rijping der ascosporen in ons klimaat een periode, schommelend tussen drie weken en vier maanden. Het hangt van de weersomstandigheden af, of in het voorjaar een periode met sterke en veelvuldige sporenuitselingen samen valt met het voorkomen van jonge planten op het veld. In de praktijk zullen de algemeen toegepaste hygiënische maatregelen dit samentreffen echter onmogelijk maken. Er is een correlatie tussen sporen-uitslating en regenval. De grootste schade wordt wel veroorzaakt door zaadbesmetting, niet alleen door minderwaardig worden van erwten met bruine vlekken als handelsartikel, maar ook door de sterk verminderde opkomst van besmet zaaizaad. Kiemplanten, die door de infectie heengroeien, zijn een gevaar voor de omgeving. Helaas beschikken wij niet over droge gebieden om ons zaaizaad te telen, zoals de U.S.A. Het verraderlijke is, dat ook op het oog gezonde erwten besmet kunnen zijn: mogelijk komt de schimmel door de funiculus binnen. In dat geval is echter wel de peulwand donker verkleurd. Voor het verkrijgen van meer betrouwbaar zaaizaad zou dan ook keuring van het gewas te velde aanbeveling verdienen, niet alleen op aantasting der peulen door *Mycosphaerella pinodes*, maar ook op vlekken door de zeer schadelijke *Ascochyta pisi* veroorzaakt.

19. SUMMARY

1. Knowledge of the life cycle of *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Stone has been established in the U.S.A. (JONES, 25; HARE and WALKER, 21) and in Germany (NOLL, 42). The object of this paper is to study the effect of the fungus on the pea plant and to study its life cycle under conditions prevailing in the Netherlands. The rôle it plays among the many other pathogens causing pea diseases is not yet clear.

2. Inoculation experiments showed that a necrosis of the epicotyl is relatively harmless, although a slight dwarfing may be expected. However, if the stem and leaves are inoculated, the necrotic spots which develop are often responsible for an early death of the plant. Attack is most severe under extreme conditions of humidity, when pycnidia develop abundantly. If the plants are inoculated at the base of the stem and are kept in closed glasstubes at high humidity, necrotic spots develop and quickly increase in diameter. By coalescence of these spots the epicotyl turns dark brown. Pycnidia are never found on the epicotyl.

3. Microscopical examination showed that the mycelium enters the tissues by ruptures in the cuticle (Fig. 2). Under moist conditions the hyphae enter also through the stomata. The hyphae penetrate the outer tangential walls of the epidermal cells near the corners and may fill up these cells with a dense mass of hyphae 7–9 μ in diameter, bearing chlamydospores. They then penetrate the inner cell walls and enter the intercellular spaces. Here the hyphae follow the borders of two adjacent cells (Fig. 4), but they never dissolve the primitive membrane between two cells. Hence the cells keep in contact. The contents of the cells surrounded by hyphae are discoloured. In the intercellular spaces a yellow substance is produced, which can be dissolved in hot potassium hydroxide and in other maceration fluids (Fig. 3, 4 and 5). In the earlier stage of fungal parasitism this substance can be stained, but later on it loses its staining capacity. Probably it is a pectin derivative, originating from the outer layer of the cell walls and rendered soluble by the enzymatic action of the fungus. It is also possible that substances from the protoplasts are broken down, the fungus behaving as a real parasite. If the cells are killed by enzymatic action before the hyphae reach them, *Mycosphaerella* has to be considered as a perthophyte in the sense of MÜNCH. However, it is not likely as the diseased cells are always found in contact with hyphae.

4. Two or three weeks after inoculation whatever the experimental conditions, the fungus could no longer be isolated from the cortex of the epicotyl. The hyphae, covered by the yellow-brown substance in the intercellular spaces, lose their protoplasmic contents and die. Toxic constituents may kill the fungus. In the stems and leaves the fungus survives more readily. Wound reactions, such as those observed after mechanical injury, are never found. The lesions at the stem base allow secondary fungi to enter; *Verticillium* sp., *Botrytis cinerea* and *Fusarium* spp. could be isolated. The extent of the damage which may be caused by these fungi is not yet known.

5. At the time the plants with ripened pods begin to die back, the surviving hyphae suddenly change their character. Their hyphae, 3–7 μ in diameter penetrate the pits in the cell walls and enter the lumens (Fig. 5, 6 and 7). A dense layer of mycelial strands extends in a tangential direction beneath the collenchyma layer, separating the epidermis and outer layers from the inner cortical layers. In immature plants, individual cells may also be penetrated in this way if they

are weakened, e.g. by frost, by an excess of humidity or by narcotics. Perithecia are initiated after two days of such mycelial proliferation. In this stage the fungus behaves as a true saprophyt.

6. Perithecia could be cultivated *in vitro* on frozen stems of young sterile pea plants and on stems of sterile plants previously treated with ether. Parts of the stems of these plants were placed near the border of colonies of *Mycosphaerella pinodes* in petridishes on oatmeal agar. The mycelium invaded the cortex. A sub-epidermal stroma was formed with locally a high number of perithecia. They ripened after about fifteen days at a temperature of 15 °C.

7. Under moist conditions, maturation of the ascospores occurs after three weeks at 16 °C; after five weeks at 2.4° C and after four months during the severe winter of 1947. Lack of water inhibits maturation. In autumn ascospores from pea refuse may infect volunteer plants; after these plants are killed by frost, perithecia are initiated on them. If the development of the ascospores is checked by a severe winter, they ripen during April and May, and then cause infection of the young plants of the new pea crop (Fig. 9). After a mild winter the ascospores are expelled too early to cause infection.

8. In the spring of 1947 a correlation was found between rainfall, ejection of ascospores and the increase in the number of leaf spots caused by the windborne ascospores (Fig. 10). The infection spread in the direction of the prevailing winds, the severity of the attack diminishing in proportion to the distance from the infected pea refuse (Fig. 12). A fortnight after infection took place, pycnidia developed in the spots: the water-borne pycnidiospores caused a further increase of the disease rate. In the summer of 1947 an epidemic would probably have resulted had the lack of rain not stopped further development. In the autumn of 1948 the correlation mentioned above was recorded again: at this season the low temperature stopped further development (Fig. 11).

9. Work has been carried out on the subject of host resistance. Former experiments (GERRITSEN and BURGMANS, 14; GOOSSENS, 17; WEIMER, 54) have shown, that conditions in the field and even in the glass-house are too unstable to enable comparisons to be made between the behaviour of different varieties. A laboratory technique therefore has been devised for this purpose: The epicotyls of five-day-old plants were exposed to a spore suspension of the fungus. After two days the suspension was replaced by water and the plants were kept in closed glass jars in an incubator at 24 °C. After the first day of incubation all varieties showed necrotic spots on the epicotyl. There was, however, a slight difference in the time required for expansion of these spots (Fig. 13). After about seven days' incubation the spots stopped enlarging, but owing to the high humidities which prevailed in the jars the weakened cells of the cortex were penetrable by the fungus, this causing the death of the plant. In some varieties this took place more rapidly than in others. After three weeks the controls were still healthy in spite of the unfavourable conditions. The rate of expansion of the epicotyl spots and the severity of the attack may be used as criteria of varietal susceptibility.

10. Hygienic precautions are important: control of the disease by seed disinfection may help to a certain extent in so far as spores or mycelium are carried on the seed coat. However, the fungus may also be present in the cotyledons of peas which do not show any outwardly visible injury. Probably the fungus can enter the seed from infected pods via the funicle; plants with healthy pods should be selected for seed.

20. LITERATUUR

1. BLACKMANN, V. H. and WELSFORD, E. J., *Ann. Bot.* 30: 389–398, 1916.
2. BONDARTZEVA-MONTEVERDE, Mme V. N. en VASSILIEVSKY, N. I., U.S.S.R. Acad. Sci. Press. Moscow, 1937. (*Rev. Appl. Myc.* 17: 427, 1938).
3. BREMER, H., u.a *Zeitschr. Pflanzenkr.* 50: 577–584, 1940.
4. CHONA, B. L., *Ann. Bot.* 46: 1033–1050, 1932.
5. COSTER, CH., *Ann. Jard. bot. Buitenzorg* 35: 125, 1926.
6. CROSIER, W. F., *Proc. Ass. Off. Seed Anal. N. Amer.*, 101–107, 1936. (*Rev. Appl. Myc.* 16: 435, 1937).
7. DOYER, L. C., *Cultura* 31: 382–385, 1919.
8. ———, *Leitfaden zur Unterzuchung des Saatgutes auf seinen Gesundheitszustand*. Wageningen, 1938.
9. DUCOMET, V., Thèse, Guillemin et Voisin, Rennes, 1907.
10. EAMES, A. J. and MACDANIELS, L. H., *An introduction to plant anatomy*. McGraw-Hill Book Comp., New York and London, 1947.
11. GARRETT, S. D., *Root disease fungi*. Chron. Bot. Comp., Waltham, Mass. U.S.A., 1944.
12. GÄUMANN, E., *Pflanzliche Infektionslehre*. Verl. Birkhäuser, Basel, 1945.
13. GERRETSEN, F. C., *Meded. Landbouwvoorlichtingsdienst*, Juli 1944.
14. GERRITSEN, J. D. en BURGMANS, H., *Tijdschr. Pl. ziekten* 46: 58–81, 1940.
15. GILCHRIST, G. G., *Phytopathology* 16: 269–276, 1926.
16. GOOSSENS, J. A. A. M. H., *R.K. Boeren- en Tuindersstand* 11: 11, 1932.
17. ———, *Techn. Bericht der Peulvruchten Studie Combinatie* 18, 1942.
18. ———, *Techn. Bericht der Peulvruchten Studie Combinatie* 27, 1943.
19. ———, *Mededelingenblad van de Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen*, 3e jg., extra nummer, 22–26, 1948.
20. HANSEN, H. N. and SNYDER, W. C., *Phytopathology* 37: 369–371, 1947.
21. HARE, W. W. and WALKER, J. C., *Agr. Expt. Sta. Univ. Wisconsin, Madison, Res. Bull.* 150: 1–31, 1944.
22. HARTER, L. L. and WEIMER, J. L., *Amer. Journ. of Bot.* 10: 245–258, 1923.
23. JARIUS, M., *Bibliotheca Bot.* IV: h. 34, 1–22, 1896.
24. JOHNSON, J., *Phytopathology* 37: 403–417, 1947.
25. JONES, L. K., *New York St. Agr. Expt. Sta. Bull.* 547, 1–46, 1927.
26. ———, *Phytopathology* 17: 44, 1927.
27. KEITT, G. W. and JONES, L. K., *Agr. Exp. Sta. Univ. Wisconsin, Madison Res. Bull.* 73: 1–104, 1926.
28. KERLING, L. C. P., *Ann. Bot. Garden Buitenzorg*, 51: 1–43, 1941.
29. KILLIAN, K., *Zeitschr. f. Pflanzenkrankh.* 30: 1–17, 1920.
30. KNOPPIEN, P. en VLASVELD, W. P. N., *Tijdschr. Pl. ziekten* 53: 145–180, 1947
31. LAMMERS, R. P., *De Peulvruchten Studie Combinatie in 1947*, 1947.
32. LEACH, L. D. and SNYDER, W. C., *Phytopathology* 34: 1007, 1944.
33. LEENDERTZ, A. C., *Techn. Ber. Peulvruchten Studie Combinatie* 27, 1943.
34. LINFORD, M. B., *Phytopathology* 21: 797–826, 1931.
35. LUDWIG, O., *Beiträge z. Biol. d. Pflanzen* 16: 465–510, 1928.
36. MARCHAL, P. et FOËX, E., *Rapport phytopath. pour l'année 1930. Ann. des épiphyties* 17: 1–112, 1931 (*Rev. Appl. Myc.* 11: 94, 1932).
37. MARSH, R. W. and WALKER, M. M., *Journ. of Pomology and Hort. Science* 10: 71–90, 1932.

38. MARTENS, P., Beih. Bot. Centralbl. Abt. A, 58: 349–364, 1938.
39. MENON, K. P. V., Ann. Bot. 48: 187–210, 1934.
40. MÜNCH, E., Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. 39: 276–286, 1929.
41. NOLL, W., Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. 49: 385–431, 1939.
42. ———, Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. 50: 49–71, 1940.
43. OU, S.H., Phytopathology 34: 1010, 1944.
44. OU, S. H. and WALKER, J. C., Phytopathology 35: 365–370, 1945.
45. PLANTENZIEKTENKUNDIGE DIENST, Versl. en Meded. 92, 6e druk, 1947.
46. POL, P. H. VAN DE; GERSONS, L.; BARTELDs, B. K.; KROFT, W. G. VAN DER; GERRITSEN, J. D.; BOSMA, B. en KERS, D., met samenvatting door QUANJER, H. M., Tijdschr. Pl.ziekten 47: 197–230 en 48: 33–60, 1942.
47. RJACHOVSKY, H. A., Mededelingen van de Lenin Academie voor Landbouw-wetenschappen 1: 31–33, 1947 (Russisch).
48. SNYDER, W. C., Seedworld 52: 7 en 8, 1942.
49. ———, WESTERN CANNER and PACKER, March issue, 1943.
50. SNYDER, W. C. and HANSEN, H. N. Phytopathology 37: 420–421, 1947
51. STONE, R. E., Ann. Myc. 10: 564–592, 1912.
52. WALKER, J. C. and HARE, W. W., Agr. Expt. Sta. Univ. Wisconsin, Madison, Res. Bull. 145: 1–32, 1943.
53. WEHLBURG, C., Onderzoekingen over erwtenanthracnose. Diss. Baarn, 1932.
54. WEIMER, J. L., Journ. Agr. Res. 75: 181–190, 1947.
55. WENT, F. W., Plant physiol. 13: 55–80, 1938.
56. WILSON, E. E., Phytopathology 18: 375–418, 1928.