

EEN KLEURMETHODE VOOR ZOÖSPOREN EN ZYGOTEN
VAN *SYNCHYTRIUM ENDOBIOTICUM* (SCHILB.) PERC.¹⁾

*With a summary: A staining method for zoöspores
and zygotes of Synchytrium endobioticum (Schilb.) Perc.*

DOOR

Ir G. VAN DEN ENDE

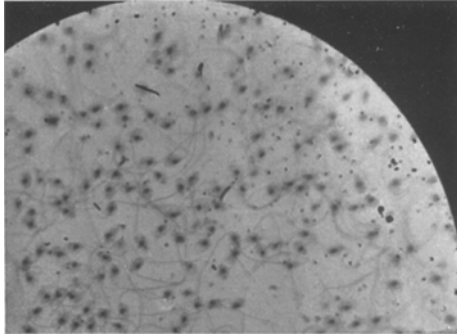
Phytopathologisch Laboratorium Willie Commelin Scholten, Baarn

De zoösporen en zygoten van *Synchytrium endobioticum* kunnen door kleuring en „Dunkelfeldbeleuchtung” zichtbaar gemaakt worden. Een onderzoek over de kleuring van de zoösporen en zygoten werd door mij verricht op de Plantenziektenkundige Dienst te Wageningen in de winter van 1948/49.

Alvorens tot de kleuring van de zoösporen kan worden overgegaan, moeten de zoösporen op een objectglas gebracht worden. We nemen hiervoor verse wratten die door middel van de methode LEMMERZAHL (1) verkregen waren. Het beste kan gebruik gemaakt worden van die wratstukjes die aan het licht hebben bloot gestaan en enigszins groen zijn. De wratten worden grondig onder de kraan afgespoeld. Vervolgens snijden we ze in kleine stukjes en wel zó, dat er op de stukjes voldoende sori voorkomen en bovendien ieder stukje een tamelijk plat vlak bezit. Deze kant wordt in een druppel water gelegd op een objectglas, zodat er gemakkelijk een waterfilm tussen objectglas en wratstukje aanwezig blijft. De snijvlakken mogen zo weinig mogelijk met het water in aanraking komen. Op de eerste plaats zouden we maar last hebben van de zetmeelkorrels, die uit het snijvlak vrijkomen en op de tweede plaats zou volgens KOHLER (3) de mogelijkheid tot zwermen geremd worden, indien sap uit de wratten in het kiemmedium terecht komt. Na 30 à 40 minuten, al naar gelang van de ouderdom van de sori, beginnen de sporangieën de zoösporen uit te stoten. Sommige stukjes doen het heel goed, andere matig en weer andere doen het in het geheel niet. De laatste zijn blijkbaar nog niet in het juiste stadium van ontwikkeling. Het uitleggen van de wratten moet bij niet te hoge temperatuur geschieden. Boven 19° C. lukte de uitzwerming van de zoösporen niet. Zeer goede resultaten bereikten we bij 10–13° C.

Wanneer er een voldoende dichte zoösporensuspensie verkregen was, werd tot fixatie en kleuring overgegaan. Twee fixatiemiddelen werden beproefd, nl. jodium en 1 %-ig alsook 2 %-ig osmiumzuur. Het gebruik van jodium is nogal omslachtig. We leggen het objectglas met de druppel zoösporen-suspensie naar beneden op een buis waarin zich jodiumkristallen bevinden. We verhitten nu de buis van onder zodat er sublimatie optreedt. Het jodium slaat neer in de suspensie-druppel en doodt onmiddellijk de zoösporen. Daarna moeten de jodiumkristallen weer uit de zoösporensuspensie verwijderd worden. Dit geschiedt door verwarming van de suspensie-druppel boven een gasvlam, waardoor de aanwezige jodiumkristallen verdampen. We moeten echter zeer voorzichtig zijn met dit verwarmen, want het kan gemakkelijk tot beschadiging aanleiding geven. Osmiumzuur (1 of 2 %) is veel handiger voor de fixatie. Hiervoor gebruiken we een wijdsmonds flesje, waarin we de osmiumzuur-oplossing brengen. We leggen het objectglas, met de zoösporen-suspensie naar beneden, op het flesje, zodat de damp van het osmi-

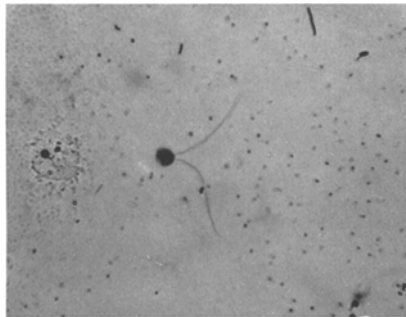
¹⁾ Ontvangen voor publicatie Juni 1951.



Afb. 1. Zoösporen van *Synchytrium endobioticum* (SCHILB.) PERC. (vergroting $\pm 1500 \times$); gekleurd volgens de hier beschreven methode.

Zoöspores of Synchytrium endobioticum (Schilb.) Perc. ($\pm 1500 \times$), stained after the method described.

(Foto Plantenziektenkundige Dienst Wageningen).



Afb. 2. Een zygote van *Synchytrium endobioticum* (SCHILB.) PERC. met 2 ciliën en 2 kernen, die tegen elkaar gelegen zijn (vergroting $\pm 1500 \times$).

A zygote of Synchytrium endobioticum (Schilb.) Perc. with 2 cilia and 2 nuclei ($\pm 1500 \times$).

(Foto Plantenziektenkundige Dienst Wageningen).

umzuur de druppel kan bereiken. We laten het objectglas vijf tellen liggen en nemen het dan weer van het flesje af. Aanvankelijk werd door mij 2%-ig osmiumzuur gebruikt, doch 1 %-ig osmiumzuur bleek even goed te zijn. Deze wijze van fixeren is veel minder omslachtig dan de fixatie met jodium. Bovendien behoeven we niet te verwarmen en hebben we geen last van de daarbij eventueel optredende beschadiging.

Na de fixatie komt de eigenlijke kleuring. De volgende kleurstoffen werden gebruikt: kristalviolet 0.005% en 0.001%, zure fuchsine 0.002 en 0.004%, methyleenblauw 0.001%, bovendien werd van kristalviolet en zure fuchsine een gemengde oplossing gemaakt en wel kristalviolet 0.0025% + zure fuchsine 0.001%, en kristalviolet 0.005% + zure fuchsine 0.002%. De beide concentraties van de gemengde kleurstof voldoen goed. Nadat een druppel kleurstof door middel van een glazen staafje in de suspensie gebracht was, werd het objectglas weggelegd ter verdamping van het vocht. Het beste is het vocht gewoon aan de lucht te laten verdampen. In de exsiccator bewaarde praeparaten bleken altijd veel meer beschadigde zoösporen te bevatten dan aan de lucht gedroogde. Het maakte geen verschil of er zwavelzuur dan wel calciumchloride in de exsiccator aanwezig was. Na de verdamping van het water, moeten de praeparaten gedifferentieerd worden. Het verdampen van het vocht duurt ongeveer twaalf uur. De zoösporen zijn dan volkomen egaal gekleurd; daarom differentiëren we de praeparaten met kruidnagelolie, die tot op de helft van zijn normale sterkte gebracht is met xylol. Bij het vermengen van de kruidnagelolie met xylol treedt een witte troebeling op, die echter door schudden verdwijnt. Een druppel kruidnagelolie wordt op het praeparaat gebracht en men laat deze enige tellen inwerken. Daarna schudden we snel de kruidnagelolie van het objectglas af en dompelen dit onder in een beker-glas met xylol. De kruidnagelolie mag men niet te lang laten inwerken want de ontkleuring is gauw te ver voortgeschreden; we controleren deze daarom steeds onder de microscoop (olie-immersie). Als het praeparaat goed gedifferentieerd is, zijn kern, cilium, blepharoplast en eventueel een oliedruppel te zien. Daarna kunnen we het praeparaat insluiten in canada-balsem.

De gemengde kleurstof in zijn sterkste concentratie (kristalviolet 0.005% + zure fuchsine 0.002%) is het beste om de verschillende delen van de zoösporen en zygoten zichtbaar te maken. De zwakke concentratie is ook goed te gebruiken; de differentiatie gaat echter sneller en vereist zodoende een grotere handigheid.

In het kort komt deze kleurmethode dus hierop neer:

1. Laat zoösporen uitzwermen door verse wratstukjes uit te leggen op een objectglas in een druppel water bij 10–13° C.
2. Fixeer de zoösporen door het objectglas, met de suspensie-druppel naar beneden, gedurende vijf tellen op een wijdmonds flesje te leggen waarin zich 1 %-ig osmiumzuur bevindt.
3. Breng hierna een druppel 0.005% kristalviolet + 0.002% zure fuchsine (oplos-middel: water) bij de suspensie-druppel.
4. Laat het praeparaat gedurende twaalf uur aan de lucht drogen.
5. Differentieer het praeparaat met een druppel kruidnagelolie, verdund met xylol in de verhouding 1 : 1. Laat deze druppel één of enige seconden inwerken.
6. Schud de druppel kruidnagelolie af en spoel het praeparaat in een beker-glas met xylol.
7. Controleer of de differentiatie ver genoeg heeft plaats gehad, zodat de structuur van de zoösporen resp. zygoten duidelijk te zien is.

8. Merk de plaats waar de zoösporen liggen.
9. Spoel de cederolie door middel van xylol van het objectglas en sluit de zoösporen in canadabalsem onder een dekglas in.

SUMMARY

Bring a small piece of potato wart-tissue in a drop of water on a slide at 10°–13° C. Fix the swarming zoöspores in the vapour of a 1 % osmic acid solution and stain in a mixture of crystal violet and acid fuchsin in water. Let the slide dry and differentiate in a drop of clove oil; wash in xylol and mount in canada balsam.

LITERATUUR

1. COTNER, Am. Journ. of Botany 17: 511, 1930.
2. CURTIS, The life-history and cytology of *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc., the cause of the wart-disease in potato. Philos. Transact. Roy. Soc. of London Series B, 210: 409–478, 1921.
3. KOHLER, Beobachtungen an Zoösporenaufschwemmungen von *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. Zentralblatt für Bakteriologie II, 82: 1, 1930.
4. KOHLER, Zur Biologie und Cytologie von *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. Phytopathologisch Zeitschrift 4: 43–56, 1932.
5. LEMMERZAHN, Neues vereinfachtes Infektionsverfahren zur Prüfung von Sorten auf Krebsfestigkeit. Der Züchter, 2: 288, 1930.

BOEKBESPREKING

BRAUN, H. und E. RIEHM – *Krankheiten und Schädlinge der landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturpflanzen und ihre Bekämpfung*. 6e Aufl., 345 p. mit 243 abb. in de tekst, 1950. 22. – DM., Uitg. Paul Parey, Berlijn

Dit boek, dat blijkens de titel het doel heeft de ziekten en plagen van land- en tuinbouwgewassen te behandelen, is grotendeels aan de landbouw gewijd. Slechts ongeveer een vierde gedeelte gaat over tuinbouwgewassen en wel bijna uitsluitend over het groot fruit. Dit boekje is dus eigenlijk alleen van nut voor landbouwers en fruittelers. Na een korte inleiding, waarin worden besproken het begrip ziekte, de ziekteoorzaken, de bestrijdingsmaatregelen en de organisatie van de „Pflanzenschutz“, volgen de ziekten en beschadigingen gerangschikt naar de gewassen. In elk hoofdstuk zijn deze naar de plaats, waar zij aantasten of waar de symptomen zichtbaar worden, verder onderverdeeld. Daarbij zijn in verband met de omvang de minder belangrijke parasieten weggelaten, hetgeen aan de overzichtelijkheid ten goede komt.

Het boek is bedoeld voor de practijk en voor studie; volgens onze mening is het in het bijzonder geschikt voor het lager en middelbaar landbouwonderwijs, terwijl het ook voor de practische landbouwer bruikbaar is. Voor hoger onderwijs is het, als gevolg van de te populaire opzet en de onvolledigheid, ongeschikt.

Hoewel de inhoud over het algemeen goed is, moeten enkele onderdelen als weinig geslaagd worden beschouwd. Zo is in het bijzonder het hoofdstukje over de