

BEPALING VAN DE VITALITEIT VAN DE CYSTE-INHOUD
VAN HET AARDAPPEL-CYSTENAALTJE
(*HETERODERA ROSTOCHIENSIS* WOLL.)
DOOR FLUOROCHROMEREN MET ACRIDINE ORANGE¹⁾

*With a summary: Viability Test of the Cyst Contents of the Potato Root Eelworm
by Fluorescent Staining with Acridin Orange*

DOOR

P. A. VAN DER LAAN

Laboratorium voor Phytopathologie te Wageningen ²⁾

EN

J. D. BIJLOO

Plantenziektenkundige Dienst te Wageningen ²⁾

INLEIDING

Als een akker besmet is met het aardappelcystenaaltje, komen in deze grond cysten van verschillende ouderdom voor. De jonge, pas gevormde exemplaren bevatten vaak 500 tot 700 met larven gevulde eieren en het vermogen van deze cysten om aardappelplanten te infecteren, is dus zeer groot. Daarnaast komen oudere cysten voor, uitwendig weinig of niet verschillend van de jongere; ze bevatten soms maar enkele gevulde eieren en zijn dus nog slechts weinig infectieus. Tussen de jonge en oude cysten bestaan vele overgangen.

De beste methode om het infectievermogen van de cysten te bepalen, is de zgn. „lokproef”, waarbij de cysten in het secreet van de aardappelwortels worden gelegd. In dat wortelsecreet bevindt zich een – tot nu toe nog steeds niet chemisch geheel geanalyseerde – stof, die de eieren in de cyste doet uitkomen, waarna de larven via de vroegere vulva de cyste verlaten. Het infectievermogen wordt bepaald door deze larven te tellen. Omdat de larven geleidelijk te voorschijn komen, moeten deze tellingen minstens 6 tot 8 weken worden voortgezet. Per bepaling worden wegens de grote variabiliteit meestal 100 cysten gebruikt. Ook na 8 weken zijn nog niet alle eieren uitgekomen; een deel (10 tot 30 %) laat zich niet lokken, maar blijft in een rusttoestand in de cyste achter en komt pas in volgende jaren naar buiten.

De lokproef geeft een zuiver beeld van het infectievermogen (maar niet van de vitaliteit) van de cysten en is voor het onderzoek over cystenaaltjes onmisbaar. Het blijft echter een zeer bewerkelijke methode.

Men heeft getracht, het aantal levende eieren en larven in een cyste op een eenvoudiger wijze te bepalen, OOSTENBRINK (1950) drukt de cysten één voor één stuk, het aantal larven en eieren dat in dat geval te voorschijn komt, geeft een indruk van de vitaliteit van de cyste. Dit aantal wordt geschat en men krijgt een snelle, doch oppervlakkige indruk omtrent het infectievermogen. FENWICK (1952) brengt de cysten in bleekpoeder, na ze opengesneden te hebben. De

¹⁾ Ontvangen voor publicatie: 25 Nov. 1954.

²⁾ Onderzoek uitgevoerd in het kader van de Werkgroep Onderzoek Bestrijding Aardappelcystenaaltje T.N.O.

eischaaltjes lossen dan op en de larven komen vrij. Het aantal larven per 100 cysten geeft dan een maat. Helaas is deze methode niet bruikbaar voor bepaling van het aantal nog levende larven en eieren aan met chemicaliën behandelde cysten, daar alle larven door het bleekpoeder gedood worden. Zelf maken wij gebruik van de homogenisator methode (BIJLOO, 1954), waar bij de inhoud van de tevoren doorgesneden cysten vrijkomt in een waterige suspensie. Volle en lege eieren, alsmede larven, kunnen daarmee bepaald worden. Deze methode geeft dus een inzicht in de samenstelling van de cyste-inhoud.

Het leek ons van belang ook de fluorescentie-methodiek volgens HOMEYER (1953) nader te onderzoeken. Deze methode berust hierop, dat men de nematoden fluorochromeert, d.w.z. kleurt met een vitaalkleurstof, waardoor de organismen gaan fluoresceren in doorvallend ultraviolet licht. Voor allerlei weefsels van planten en dieren is dit reeds uitvoerig door STRUGGER (1949) onderzocht.

HOMEYER bracht stengel- en bladaaltjes (*Ditylenchus* en *Aphelenchoides*) in een oplossing van de vitaal-kleurstof acridine orange (1 op 5000 delen aq. dest.); per 100 cc van deze oplossing werden enige druppels KOH 10 % toegevoegd. De kleuring duurde 20 tot 30 minuten. De levende aaltjes namen dan weinig kleurstof op en zagen er, bekeken onder een fluorescentiemicroscoop, groen uit; dode aaltjes namen meer kleurstof op en fluoresceerden rood. De rode aaltjes bewogen nooit, terwijl infectieproeven ermee niet slaagden; groene aaltjes daarentegen maakten duidelijke bewegingen en waren in staat infecties te weeg te brengen. Soms werd een aaltje geobserveerd, dat aan een uiteinde gewond was, en daar rood kleurde, terwijl de rest van het lichaam nog groen was! De doding geschiedde door verhitting, met logen of zuren, met ammoniak en alcohol, dus steeds met sterke vergiften.

METHODIEK

HOMEYER gebruikte bij zijn onderzoek een fluorescentiemicroscoop. Deze apparaten zijn echter zeer kostbaar. Voor ons doel gebruikten wij een zgn. „Stab-Analysenlampe” van Hanau van zeer eenvoudige constructie (fig. 1). Deze kwartslamp wordt vaak gebruikt om vervalsingen aan schilderijen, postzegels, e.d. aan te tonen. Wij plaatsten deze lamp onder een gewone microscoop en voorzagen het oculair van een „Sperrfilter”, dat de ogen beschermt tegen het ultraviolette licht.

De kleuring geschiedde als volgt: Cysten werden opengesneden en de inhoud werd er zo volledig mogelijk uit geprepareerd. Men kan hier ook de homogenisator voor gebruiken. De inhoud der cysten werd gedurende 60 minuten in een oplossing van acridine orange (Edw. Gurr.) 1 : 3000 gelegd. Enige proeven werden ook genomen met „acridin yellow” in dezelfde concentratie, en ook met acridine-orange-oplossingen bij verschillende pH; bij een pH van ongeveer 7, bleek de eerstgenoemde werkwijze het beste. Het kleurverschil was ook zichtbaar bij gebruik van „acridin yellow”, doch acridine orange beviel ons op de duur beter. Vervolgens werden de larven en eieren overgebracht in een druppel water, er werd een dekglas op gelegd en het preparaat werd ingesloten met was. Daarna bleef het preparaat de nacht over liggen en de volgende dag werd het bekeken onder de fluorescentie-apparatuur. Met behulp van twee handtelapparaatjes werden de levende en dode eieren geteld, waarbij lege eieren eveneens

als levend golden; larven werden niet meegerekend. Voor elke bepaling werden twee preparaten gemaakt en in elk preparaat werden minstens 500 eieren geteld.

De cijfers betreffende de uitlokking door aardappelwortelsecreet werden als volgt verkregen. De cysten werden een week in water voorgeweekt en dan in aardappelwortelsecreet gebracht. De uitkomende larven werden tweemaal per week geteld en dit werd voortgezet tot er practisch geen larven meer uitkwamen, hetgeen na $2\frac{1}{2}$ à 3 maanden het geval was. Na afloop werd met de homogenisatormethode uit een ander deel van hetzelfde preparaat het totaal aantal oorspronkelijk aanwezige eieren bepaald. Op deze wijze was van elke partij het aantal dode en levende eieren bekend. Het bleek, dat in elke partij cysten, al of niet behandeld, 7–12 % dode eieren voorkomen, benevens 10–30 % eieren, die in een rusttoestand achterblijven. Deze aantallen, primair reeds dode en niet-uitkomende eieren, in de blanco bepaald, werden afgetrokken van het aantal dode eieren der met nematiciden of op andere wijze behandelde series. Op deze wijze kan het dodingspercentage, dat uitsluitend het gevolg is van de behandeling, bepaald worden.

BEPALING VAN DE VITALITEIT AAN DOOR SCHIMMELS GEINFECTEERDE CYSTEN

Op de volgende wijze werd de methodiek getoetst. Wij namen een suspensie van de larven van het aardappelpystenaaltje in water, waarvan het aantal per cc bekend was, deelden deze in tweeën en doodden de ene helft door ze in kokend water te brengen. Daarna werden beide hoeveelheden weer dooreen gemengd en er werd een preparaat van gemaakt. Als we dit fluorochromeerden, bleek direct, dat 50 % der aaltjes rood kleurde en 50 % groen. We konden dus HOMEYER's resultaten bevestigen. Maakten we suspensies, waarin 25 % of 70 % der aaltjes gedood was, dan konden we dit na telling ook gemakkelijk en snel terug vinden. Dit gelukte eveneens voortreffelijk met de eieren van *Heterodera*, die daartoe uit de cysten geprepareerd werden. De door verhitting dode eieren kleuren intensief rood; bij de eieren met levende inhoud kleurt de schaal rood, doch de inhoud schijnt er groen doorheen (fig. 2).

Vervolgens werden de cysten geïnfecteerd met een parasitaire schimmel, in dit geval *Phialophora heteroderae* VAN BEYMA. Ook nu bleek, dat de door de schimmel uitgezogen en gedode eieren bij fluorochromeren veel intensiever kleurden dan de levende, en er goed van te onderscheiden waren. Niet altijd zagen de dode eieren er rood uit, soms waren ze wit, geel of heldergroen gekleurd, doch steeds was de intensiteit van de kleuring zoveel sterker, dat bij telling geen twijfel behoefde te bestaan. Ter controle van de juistheid der tellingen, werden een aantal malen bij een pas geteld preparaat, de als „levend” getelde eieren aangeprikt. Aan het vrijkomende aaltje kan dan bepaald worden, of het levend is, door het doormidden te snijden. Bij levend aaltjes is de tonus der spieren intact en komt de lichaamsinhoud bij het doorsnijden naar buiten. Bij dode aaltjes is dit niet het geval.

Op deze wijze toegepast, bleek de fluorescentiemethode een zeer bruikbaar hulpmiddel te zijn bij het bepalen van de vitaliteit der cyste-inhoud. Bij het onderzoek naar de werkzaamheid van de voor aaltjes parasitaire *Phoma*-soort ¹⁾ (VAN DER LAAN, 1953) werd de methodiek dan ook reeds gebruikt.

¹⁾ Inmiddels door het Centraal Bureau voor Schimmelcultures te Baarn gedetermineerd als *Phoma tuberosa* MELHUS, ROSENBL. & SCHULTZ.

Als illustratie geven wij hieronder enkele cijfers.

TABEL 1. Dodingspercentage bepaald door telling van 2×500 eieren
Table 1. Percentage killed eggs estimated by counting 2 groups of 500 eggs

Schimmel Fungus	Dodingspercentage Percentage killed				Gemidd. % dood Mean % killed
<i>Pseudeurotium ovalis</i> STOLK	47	53	40	36	44
<i>Metarrhizium anisopliae</i> SOROKIN	23	18	34	31	26
<i>Heterosporium spec.</i>	14	12	12	10	12

Pseudeurotium ovalis (STOLK, 1955) heeft bijna de helft der eieren gedood, *Metarrhizium anisopliae* ongeveer een kwart, terwijl *Sporotrichum spec.* niet werkzaam is geweest.¹⁾

Deze cijfers zijn niet direct vergelijkbaar met die van een uitlokkingsproef, daar immers bij de lokking niet alle levende eieren uitkomen. De lokkingsproef bepaalt het infectievermogen, de kleurreactie de vitaliteit der cysten. Het percentage gelokte larven zal altijd lager liggen dan het met de kleurmethoediek getelde aantal levende eieren. Dit bleek ook werkelijk zo te zijn, zoals tabel 2 laat zien.

TABEL 2. Analyse van de cyste-inhoud volgens verschillende methoden. Aantallen en percentages larven en eieren per cyste

Table 2. Analysis of the cyst contents by different methods. Numbers and percentages of larvae and eggs per cyst

	Methode Method	Oude cysten Old cysts		Nieuwe cysten New cysts	
1. Totaal aantal gevulde en lege eieren Total number of filled and empty eggs	Homogenisator Homogenizer	202	100%	337	100%
2. Aantal larven na lokking gedurende 8 weken Number of larvae after eight week's hatching	Toevoegen aardappelwortel secreet Adding of potato root diffusate	50	25%	241	72%
3. Aantal dode eieren Number of dead eggs	Fluorescentie Fluorescence	129	64%	54	16%
4. Rest der eieren, niet gelokt, niet dood Rest of the eggs, not hatched, not killed	Geen, berekend None, reckoned	23	12%	42	12%

Bij deze proef werden twee partijen cysten vergeleken. Partij I bestond uit betrekkelijk oude cysten, partij II bevatte jonge cysten. Met 100 cysten van beide partijen werd een lokproef ingezet, die 8 weken duurde. Het totaal aantal gelokte larven staat onder (2) vermeld. Daarna werden de cysten doorgesneden en met de homogenisator-methode werd het totaal aantal eieren + lege doppen geteld (1), dat oorspronkelijk in de cyste aanwezig was. De eiersuspensie werd vervolgens gekleurd in acridine orange en het aantal dode eieren werd geteld onder de fluorescentiemicroscoop (3). Door de cijfers onder (2) en (3) van die onder (1) af te trekken, krijgt men het aantal eieren, die niet gelokt zijn, doch die volgens de kleurmethoediek ook niet dood zijn (4). Dit zijn de eieren, die pas het volgende jaar zullen uitkomen. In beide partijen bedroeg dit aantal 12 %.

¹⁾ De werking der parasitaire schimmels op de cysten van *Heterodera rostochiensis* zal in een volgende publicatie nader besproken worden.

Tot zover konden wij dus de resultaten van HOMEYER bevestigen en uitbreiden tot de inhoud van *Heterodera*-cysten. Voor het onderzoek naar de chemische bestrijding van de aaltjes was het echter van groot belang, na te gaan of de fluorescentie-methode ook te gebruiken was bij het onderzoek naar de nematicide werking van chemische stoffen. Deze methode zou een grote tijdsbesparing kunnen geven op de thans gebruikelijke uitlokkingsmethode. Oriënterende proeven hadden reeds aangetoond, dat direct na de behandeling met de nematiciden de verschillen in kleuring onduidelijk waren te zien, zodat bij deze proef de cysten 3 maanden na de behandeling werden gekleurd.

Vervolgens werden porties van 100 cysten met 4 concentraties van 3 verschillende nematicide stoffen behandeld. Daartoe werden de concentraties zo gekozen, dat de hoogste het merendeel der eieren doodde, terwijl de laagste een groot aantal eieren in leven liet. We kregen dus 12 partijen van 100 cysten, waaraan als 13e een blanco werd toegevoegd. Telkens 50 cysten ervan werden aan een uitlokkingsproef onderworpen, de andere 50 cysten ervan werden met behulp van de fluorescentie-methode onderzocht.

Reeds dadelijk was gebleken, dat larven en eieren van *Heterodera*, die gedood zijn met nematiciden, niet rood fluoresceren, doch groen blijven. Wel kleuren ze intensiever groen dan de levende exemplaren, doch het onderscheid is veel moeilijker te zien dan bij de door verhitting of door schimmels gedode nematoden.

In de bijgaande diagrammen (fig. 3) staat in de linkerkolom steeds het gevonden dodingspercentage, bepaald met de kleurmethodiek, terwijl rechts de uitkomst van de lokkingsproef is weergegeven. Bij de laatste bepaling is de doding in de blanco-serie op nul gesteld, bij de fluorescentie-methode bleek echter, dat de blanco-serie reeds 11 % dode eieren bevatte. Zelfs indien we dit percentage dode eieren verwerken in de cijfers van de lokproef, dan blijkt nog de overeenstemming tussen de uitkomst van beide methoden slecht te zijn.

De uitlokkingsmethode geeft veel hogere dodingspercentages dan de kleurmethode. Wel kwamen er bij de kleurmethode verschillen te zien tussen de nematiciden onderling en ook tussen de concentraties van hetzelfde nematicide, maar steeds blijven deze cijfers laag.

Nu bleek ons verder, dat ook bij de cysten behandeld met een groot aantal chemische verbindingen, vlak na de behandeling op het oog geen onderscheid was te vinden tussen levende en dode eieren. Merkwaardig genoeg bleek, dat bij aanprikken van de eieren met een zeer fijne naald, bij behandelde en onbehandelde eieren dezelfde reactie optrad. In beide gevallen sprongen de larven bij de minste aanraking uit de eieren en stroomden er na beschadiging van de larve lichaamsinhoud naar buiten. Indien behandelde cysten enige maanden droog, of in de grond bewaard waren, werd een onderscheid merkbaar; de eieren springen dan niet of niet volledig meer open.

In tegenstelling tot deze langzame doding met de nematiciden, die ook steeds in zó lage concentraties toegediend worden, dat het effect juist lethaal is, is de doding door verhitting veel rigoureuzer. Daar treedt de dood van het aaltje dadelijk op. Dit moet ook het geval geweest zijn bij de proeven van HOMEYER, toen hij de stengel-aaltjes doodde met logen, zuren en alcohol.

Een volgende proef werd nog genomen met het nematicide DD (dichloor-

propaan + dichloorpropyleen). Series van 200 cysten werden behandeld met oplossingen van 25 p.p.m., 50 p.p.m. en 100 p.p.m. DD, terwijl een vierde serie onbehandeld bleef. Met 100 cysten van elke serie werd een lokproef genomen, de andere 100 cysten werden drie maanden bewaard en dan gefluoresceerd. Het percentage achtergebleven eieren werd bepaald met de homogenisator-methode. (Tabel 3).

TABEL 3. Fluorchromering en lokking met materiaal, behandeld met DD
Table 3. Fluorescent staining and hatching tests with cysts treated with DD

	Blanco check	25 ppm	50 ppm	100 ppm	
Lokking	70,4	45,9	42,2	0,01	% gelokt
Hatching					% hatched
Homogenisator	29,6	54,1	57,8	99,99	% achtergebleven
Homogenizer					% not hatched
Fluorochr.	27	30	60	69,5	% dood
Fluor. staining					% killed

Wederom zijn met de fluorescentie-methode lagere cijfers verkregen. Zelfs, waar practisch 100 % der eieren bij lokking (2½ maand doorgezet!) niet uitkomt, geeft de kleurmethode nog maar 70 % dood.

De conclusie moet dus luiden, dat deze fluorchromering, in tegenstelling met de verwachtingen door HOMEYER eraan gesteld, niet bruikbaar is voor het toetsen van de werking van nematiciden op cysten van *Heterodera*-soorten.

SUMMARY

In 1953 it was found by HOMEYER that nematodes of the genera *Ditylenchus* and *Aphelenchoides*, treated with the vital stain Acridin Orange and observed under a fluorescence microscope, behaved as follows: Living specimens absorbed a very small amount of the stain and became green in colour, while dead eelworms absorbed more of the stain and became red. The nematodes were killed by treatment with acids, basic solutions, ethanol, or by heating.

Since the determination of the viability of nematodes is difficult, due to the fact that they may remain for a long time in a lethargic condition, it was hoped this method would also work with cyst-nematodes.

The ordinary way of bioassay of *Heterodera*-cysts is done by the hatching test; bringing the cyst in potato-root diffusate and counting the larvae hatching during the following 6 to 8 weeks, a very laborious process.

We used an ordinary microscope supplied with a quartz lamp and a „Sperrfilter” (Fig. 1) for our observations of the fluorescence.

A comparison of the contents of living cysts and of cysts killed by hot water showed the marked colour difference. Dead eggs were intensively coloured with red, light green, yellow or white, while the living ones were coloured dark green with a red scale (Fig. 2). The viability of the contents of cysts killed by parasitic fungi which penetrate into the cyst, could also be tested by the colouring method (Table 1). By using also the hatching test and the homogenizer method (BULLO, 1954) a very accurate analysis of the cyst contents was possible (Table 2). The first author uses the method in connection with his work on biological control of *Heterodera rostochiensis*.

However it was highly important to know if the screening of the numerous

chemicals for their nematicidal qualities against *Heterodera*-cysts, could also be done by the colour test. So cysts were treated by different lethal and sublethal doses of various nematicides, including DD. One group of cysts was then tested by the hatching test, the other group by the fluorescence method.

Immediately after treatment no clear difference between treated and untreated cysts was shown by the colour test. A difference became visible only three months later, but all figures of percentage-killing were distinctly lower than the figures obtained at the same time using the hatching test (Fig. 3; table 3).

Apparently the killing by chemicals progresses very slowly. So it was not possible to obtain a good viability test with the fluorescence method to evaluate the effect of nematicides.

NASCHRIFT

Nadat bovenstaand manuscript was afgesloten, kwam ons de publicatie van BUDZIER (1954) onder ogen, die eveneens de bruikbaarheid van HOMEYER's methode voor het nematiciden-onderzoek aan het aardappelcystenaaltje onderzocht heeft. Hij werkte met larven die uit cysten geprepareerd waren, behandelde deze op diverse manieren en onderzocht de intensiteit en de kleur van de fluorescentie. De aantallen getelde larven worden niet genoemd. Een duidelijk onderscheid werd gevonden na doding door verhitting of door verwonding en ook bij natuurlijk afgestorven larven. Hier acht BUDZIER echter onderzoek door middel van fluorescentie niet nodig, daar het ook met een gewone microscoop zichtbaar is. Geen betrouwbare verschillen werden gevonden na behandeling met sterke concentraties HCl, KOH, alcohol, formaline, forbiat (methylaether van dimethyldithiocarbaminezuur), dichloorpropeen en dichloorbuteen, zodat ook deze schrijver concludeert, dat deze methode voor het onderzoek van nematiciden bij *Heterodera rostochiensis* niet bruikbaar is. Onze uitkomsten wijzen in dezelfde richting, maar zijn toch minder negatief ten opzichte van de bruikbaarheid van de methode (Tabel 1). BUDZIER werkte niet met eieren van de aaltjes, niet met parasitaire schimmels, toetste geen nematiciden in concentraties, die in de praktijk gebruikelijk zijn, en bepaalde geen correlaties met behulp van uitlokkingsproeven.

LITERATUUR

- BUDZIER, H. H., - 1954. Untersuchungen über die Primär- und Secundär-fluoreszenz der Larven des Kartoffelnematoden *Heterodera rostochiensis* WOLLENWEBER unter Verwendung von Akridinorange. Wiss. Zeitschr. Univ. Rostock. 3: 221-229.
- BIJLOO, J. D., - 1954. A new Method for estimating the Cysts Contents of the Potato-root Eelworm *Heterodera rostochiensis* WOLLENWEBER. Journ. Helminth. 28: 123-126.
- FENWICK, D. W., - 1952. The estimation of the Cyst Contents of the Potato Root Eelworm, *Heterodera rostochiensis* WOLLENB. Journ. Helminth. 26: 55-68.
- HOMEYER, B., - 1953. Die Unterscheidung lebender und toter Stockälchen (*Ditylenchus dipsaci* KUEHN) durch Fluorochromierung mit Akridin orange. Nachr. Bl. Deutsch. Pflanz.sch. Dienstes (Braunschweig) 5: 8-9.
- HOMEYER, B., - 1953. Die fluoreszenzoptische Vitalanalyse inaktiver Nematoden. Anzeig. Schädl.kunde 26: 137-140.
- LAAN, P. A. VAN DER, - 1953. Een schimmel als parasiet van de cyste-inhoud van het aardappelcystenaaltje (*Heterodera rostochiensis* WOLLENW.) Tijdschr. Pl.ziekten 59: 101-103.
- OOSTENBRINK, M., - 1950. Het aardappelaaltje. Versl. Med. Pl.ziektenkundige dienst 115: 1-230.
- STOLK, AMALIA C., - 1955. The Genera *Anixiopsis* HANSEN and *Pseudeurotium* VAN BEYMA. Anthonie van Leeuwenhoek 21: 65-79.
- STRUGGER, S., - 1949. Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Verlag M. & H. Schaper, Hannover 194 pp.