

HET UITWENDIG STERILISEREN VAN PLANTEN BIJ FYTOPATHOLOGISCH ONDERZOEK¹

With a summary: External disinfection of plant parts

DOOR

G. J. SAALTINK

Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen

Wanneer een pathogene schimmel uit een waardplant moet worden geïsoleerd, wordt deze meestal eerst uitwendig met een desinfectans behandeld. Het doel van deze ontsmetting is op het oppervlak der planten zoveel mogelijk micro-organismen te doden, teneinde naast de pathogene schimmel zo weinig mogelijk andere schimmels te zien verschijnen op het voedingsmedium waarop aangetaste plantedelen worden uitgelegd. Als op deze wijze een schimmel is geïsoleerd, wordt daarna door middel van infectieproeven nagegaan of deze inderdaad pathogeen is.

In de tweede plaats wordt een uitwendige ontsmetting herhaaldelijk toegepast wanneer het er om gaat aan te tonen of een bepaalde pathogene schimmel al of niet in de plant aanwezig is (BROCH, 1948; BUXTON, 1955; HENDRIX & NIELSEN, 1958; SCHEFFER & WALKER, 1954).

In het eerste geval stelt men bij het isoleren slechts als voorwaarde dat de groei van een parasitaire schimmel weinig zal worden gehinderd door de aanwezigheid van andere organismen; de buitenzijde van het materiaal behoeft dan dus niet volkomen steriel te zijn. Anders is het in het tweede geval; hier dient een volledige uitwendige steriliteit te worden nagestreefd. In literatuur wordt gewoonlijk volstaan met de vermelding dat de planten werden gedesinfecteerd, zonder aan te geven of met de toegepaste methode werkelijk een steriel oppervlak werd verkregen.

In de bacteriologie is vrij veel onderzoek verricht over de werking van verschillende middelen, maar in de fytopathologische literatuur zijn hierover weinig gegevens te vinden.

Hieronder volgen een aantal proeven die genomen werden met het doel de werking na te gaan van diverse ontsmettingsmiddelen op sporen van *Fusarium oxysporum*, die vooraf op lupineplanten waren aangebracht. Deze proeven hielden verband met een kwantitatief onderzoek over de uitbreiding van deze schimmel in de plant, waarbij het noodzakelijk was alle zich buiten op de plant bevindende ziektekiemen (sporen en/of mycelium) zoveel mogelijk uit te schakelen.

Bij de eerste proeven werden gezonde lupineplanten in sporensuspensies gedompeld en, nadat de suspensie was opgedroogd, ontsmet met verschillende middelen. Daarna werden stukjes van de plant op een agar-voedingsbodem uitgelegd. Het bleek dat zelfs na ontsmetting bij kamertemperatuur gedurende 5 minuten in sublimaat 0,2 % of 10 minuten in ethanol 96 % nog *Fusarium* op enkele van de uitgelegde stukken groeide.

Ook andere ontsmettingsmiddelen werden beproefd, zoals natriumhypo-

¹ Aangenomen voor publikatie 15 mei 1959.

chloriet, zilvernitraat en jodium, doch ook hier was de ontsmetting niet volledig. Men zou dan hogere concentraties of een langere inwerkingsduur kunnen toepassen, maar daarbij moet dan rekening worden gehouden met een sterker binnendringen, hetgeen uiteraard bij kwantitatief werk ongewenst is, daar dan een deel van het *in* de plant aanwezige mycelium gedood kan worden.

Om het effect van de ontsmetting beter te kunnen bepalen werd tot een andere methode overgegaan. De planten werden op dezelfde wijze behandeld, maar na het ontsmetten werd een stuk van elke plant in een waring blender in water gemalen. Daarna werd van de verkregen suspensie een hoeveelheid gemengd met peptonagar en uitgegoten in petrischalen. Het aantal kolonies dat dan opkomt vormt een maat voor de hoeveelheid nog levende *Fusarium*-sporen die zich op de plantjes bevonden.

De resultaten van een aantal proeven zijn samengevat in tabel 1. In de niet ontsmette objecten van deze proeven varieerde het aantal kolonies van 203 tot 2772. In de verschillende proeven werd iedere behandeling in 3-, 4- of 7-voud uitgevoerd.

TABEL 1. Uitwendige ontsmetting van planten met verschillende middelen.

External disinfection of plant parts by various compounds.

Ontsmettingsmiddelen <i>Disinfectants</i>	Duur van de behandeling <i>Period of treatments</i>	Percentage opgekomen kolonies <i>Numbers of colonies developed as percentage of control</i>							
Niet ontsmet / <i>Not disinfected</i>		100	100	100	100	100	100	100	100
0,2% sublimaat <i>corrosive sublimate</i>	2 min.	11,3		0,6	5,9				
0,2% sublimaat met <i>corrosive sublimate</i> 0,03% tween L80 <i>with tween L 80</i>	2 min.	13,2	1,3	2,0					
4% natriumhypochloriet <i>sodium hypochlorite</i>	2 min.	6,1		0,3	2,0				
96% ethanol	2 min.				12,8	2,6	12,0	8,0	20,0
96% ethanol	4 min.						2,0	2,5	5,2
96% ethanol	6 min.				5,4		0,5	0,3	3,0
96% ethanol	10 min.				1,5				
70% ethanol	2 min.	13,9	5,5	4,9		4,3			
50% ethanol	2 min.					5,5			

Uit deze gegevens blijkt dat het moeilijk, zo niet onmogelijk is de sporen voor 100 % te doden. Er is geen sprake van geweest, dat de plant sporen heeft opgenomen, want indien hiertegen voorzorgsmaatregelen werden getroffen, bijvoorbeeld door de wortels vooraf met paraffine te bedekken, waren de resultaten hetzelfde.

De invloed van desinfectantia werd ook bij enkele andere schimmels onderzocht. De sporen van *Mucor* sp., *Alternaria tenuis* en *Colletotrichum lindemuthianum* werden, nadat ze op lupineplantjes waren gebracht, niet voor 100 % gedood door toepassing van sublimaat 0,2 % gedurende 2 minuten bij kamertemperatuur.

Om het effect van de temperatuur op de ontsmetting te bestuderen werden planten, met *Fusarium*-sporen aan de buitenzijde, gedompeld in ethanol 96 %

van verschillende temperatuur. Het verschil in werking blijkt uit de gegevens die in tabel 2 zijn vermeld.

TABEL 2. Ontsmettende werking van ethanol 96% bij verschillende temperaturen.
Disinfection by ethanol 96% at different temperatures.

Behandelingen / <i>Treatments</i>	Percentage opgekomen kolonies <i>Number of colonies developed as percentage of control</i>
Niet ontsmet / <i>Not disinfected</i>	100
96% ethanol, 2 min., 15°C	8,8
96% ethanol, 2 min., 20°C	1,1
96% ethanol, 2 min., 25°C	0,3

Het te verwachten effect – betere werking bij een hogere temperatuur (McCULLOCH, 1946) – is hier duidelijk te constateren. De verschillen in werkzaamheid van de behandelingen uit tabel 1 moeten achteraf bezien waarschijnlijk voor een groot deel aan verschillen in temperatuur bij de ontsmetting worden toegeschreven. De ontsmetting werd nl. bij wisselende kamertemperatuur uitgevoerd.

Voor het bepalen van de werking van ontsmettingsmiddelen wordt in de bacteriologie vaak de methode van RIDEAL & WALKER (1905) gebruikt. Hierbij worden gesuspenderde bacteriën gemengd met oplossingen van ontsmettingsmiddelen. Wanneer men dit doet met *Fusarium*-sporen, dan blijken deze bij 18°C reeds na 10 seconden in ethanol 50 % gedood te worden. Blijkens de gegevens van de tabellen 1 en 2 zijn deze sporen op de plant veel minder gevoelig; hiervan blijven zelfs na een meer rigoureuze behandeling verscheidene in leven. Dit kan een gevolg zijn van het feit dat de sporen op de wortels zich in droge toestand bevinden en dus minder permeabel zijn. Ook zouden de sporen in groepjes bijeen kunnen liggen, zodat zij elkaar bedekken of zouden zij bv. in groefjes van het oppervlak met een luchtmantel omgeven kunnen zijn.

Om een algehele uitwendige ontsmetting te verkrijgen zou men dus de concentratie, de tijdsduur of de temperatuur dienen op te voeren. Maar speciaal bij kwantitatief werken doet zich dan de vraag voor of het ontsmettingsmiddel niet te sterk zal binnendringen en met de plantecellen niet ook het mycelium van de parasiet, die men wil bestuderen, zal worden gedood. Teneinde hierover nadere gegevens te verkrijgen werden met behulp van een injectienaald sporen van *Fusarium oxysporum* door het hypocotyl in de wortels van één maand oude lupineplanten gebracht (dikte wortels 2 tot 3 mm). Wanneer de wortels gedurende 4 minuten bij kamertemperatuur met ethanol 96 % waren behandeld, kon – vergeleken met onbehandeld – in geen enkel geval een afneming van het aantal opgekomen kolonies worden geconstateerd. Bij een behandeling van 6 minuten werd *Fusarium* in de wortels soms gedood, bij nog langer behandeling was de doding door binnendringen sterker.

SUMMARY

To demonstrate the presence of a fungus in plant tissue, parts of plants are often placed on agar plates. In this case it is necessary to be certain that the fungus does not occur on the outside of the plant.

In the present study it is demonstrated that some common methods of disinfection are not sufficient to kill all conidia of *Fusarium oxysporum* which are present on the outside of plants. We give the results of experiments with the following disinfectants: 0,2 % corrosive sublimate – 2 min., 50 % to 96 % ethanol – 2 tot 10 min., and 4 % sodium hypochlorite – 2 min. It is probable that these results also hold true for other fungi.

LITERATUUR

- BROCH, R. D., – 1948. The nature of *Fusarium* wilt resistance in the tomato variety Pan America. J. Austral. Inst. agr. Sci. 14: 78–80.
- BUXTON, E. W., – 1955. *Fusarium* diseases of peas. Trans. Brit. myc. Soc. 38: 309–316.
- MC CULLOCH, E. C., – 1946. Disinfection and sterilization. Philadelphia.
- HENDRIX, F. F. & L. W. NIELSEN, – 1958. Invasion and infection of crops other than the forma suscept by *Fusarium oxysporum* f. batatas and other formae. Phytopath. 48: 224–228.
- RIDEAL, S. & J. T. A. WALKER, – 1903. Standardisation of disinfectants. J. roy. San. Inst. 24: 424–437.
- SCHEFFER, R. P. & J. C. WALKER, – 1954. Distribution and nature of *Fusarium* resistance in the tomato plant. Phytopath. 44: 94–101.