

DE ONTWIKKELING VAN *FUSARIUM OXYSPORUM* IN RESISTENTE EN VATBARE RASSEN VAN *LUPINUS LUTEUS*¹

With a summary: The development of Fusarium oxysporum in resistant and susceptible varieties of Lupinus luteus

DOOR

G. J. SAALTINK²

Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen

INHOUD

1. ALGEMENE INLEIDING	5
2. MATERIAAL EN METHODEN	6
21. <i>Materiaal</i>	6
21.1. De plant	6
21.2. De schimmel	6
22. <i>Kweekmethoden</i>	7
22.1. Het kweken van de planten	7
22.2. De betekenis van de omstandigheden in de kas	8
22.3. Het kweken van de schimmel	8
23. <i>Inoculatiemethoden</i>	9
23.1. Het mengen van inoculum met de grond	9
23.2. Het dompelen van de wortels in sporensuspensie	9
23.3. Het bedruppelen van de wortels met sporensuspensie	10
23.4. Het inspuiten van de wortels met sporensuspensie	11
24. <i>Het aantonen van de schimmel in planten</i>	12
24.1. Anatomisch onderzoek	12
24.2. Het uitleggen van plantendelen	12
24.3. De mixertechniek	13
24.4. Het uitwendig desinfecteren van planten	15
3. PROEVEN OVER DE ONTWIKKELING VAN DE PARASIEET IN DE PLANT	17
31. <i>De ontwikkeling van de schimmel in planten op het veld</i>	17
31.1. Inleiding	17
31.2. De mate van uitbreiding in vatbare en resistente planten van het veld	17
31.3. De sterke toename in resistente planten na de bloei	18
31.4. Het verband tussen de bruinkleuring van vaten en de hoeveelheid mycelium in resistente planten	19
31.5. Samenvatting en bespreking	20
32. <i>De ontwikkeling van de schimmel in de wortel van planten in de kas</i>	21
32.1. Inleiding	21
32.2. De optimale dosis inoculum	21
32.3. De toename van het schimmelniveau (SN) in de wortel van een vatbaar ras	23
32.31. Inleiding	23
32.32. De afname van SN gedurende de eerste 2 dagen na inoculatie	24

¹ Aangenomen voor publikatie 11 februari 1963.

² Tegenwoordig adres: Laboratorium voor Bloembollenonderzoek, Lisse.

32.33. De toename van SN van de 2e tot de 5e dag na inoculatie	25
32.34. De toename van SN vanaf de 5e dag na inoculatie	27
32.4. Gezond gebleven planten en de ontsnapping aan infectie	27
32.5. De invloed van verwonding bij injectie op de uitbreiding van de schimmel	28
32.6. De toename van SN in de wortel van planten van een resistente selectie	28
32.61. Inleiding	28
32.62. De toename van SN in resistente planten vóór de bloei	28
32.63. De toename van SN in resistente planten na de bloei	30
32.64. De afname van SN bij resistente planten na injectie van een supra- optimale dosis	30
32.7. Samenvatting en bespreking	31
33. <i>Het verband tussen de hoeveelheid Fusarium en de verwelking der planten</i>	32
33.1. Inleiding	32
33.2. Het <i>Fusarium</i> -niveau in verwelkende planten van verschillende grootte	33
33.3. Samenvatting en bespreking	33
34. <i>De ontwikkeling van de schimmel in het hypocotyle stengeldeel (van planten in de kas)</i>	35
34.1. Inleiding	35
34.2. Het ziekteverloop na infectie van het hypocotyl	36
34.3. De toename van SN na infectie van vatbare planten	36
34.4. De toename van SN na infectie van resistente planten	37
34.5. De toename van SN in vatbare planten na binnendringen vanuit de wortel	37
34.6. Samenvatting en bespreking	39
35. <i>De betekenis van de wortel voor de ontwikkeling der ziektesymptomen</i>	39
35.1. Inleiding	39
35.2. Infectie van de wortel van entcombinaties	41
35.3. Infectie van uitsluitend het hypocotyl bij entcombinaties	42
35.4. Proeven met tweelingenten van vatbare- en resistente planten	43
35.5. Het transport van sporen naar de stengel	43
35.6. De betekenis van de uitbreiding van de schimmel in de wortel	44
35.7. De groeimogelijkheid van de schimmel op verschillende plaatsen in de plant	45
35.8. Samenvatting en bespreking	48
4. ORIENTEREND ONDERZOEK NAAR DE AARD VAN DE RESISTENTIE	50
41. <i>Het anatomisch onderzoek</i>	50
41.1. Inleiding	50
41.2. De bouw van de plant	50
41.3. De kleurmethode	51
41.4. Het voorkomen van de schimmel in de lupineplant	51
41.5. Samenvatting en bespreking	53
42. <i>De reactie van lupineplanten op cultuurfiltraten van Fusarium oxysporum</i>	54
42.1. Inleiding	54
42.2. Eigen onderzoek	54
42.3. Samenvatting en bespreking	55
43. <i>Proeven met extracten en bloedingsvocht van resistente en vatbare planten</i>	56
43.1. De groei van de schimmel op perssap en op bloedingsvocht	56
43.2. Aminozuren	56
43.3. Phenolen	59
43.4. Bepaling van de polyphenoloxylase activiteit bij resistente planten	60
43.5. Enkele oriënterende proeven over enzymactiviteiten van <i>Fusarium oxysporum f. lupini</i>	61
43.6. Samenvatting en bespreking	62
5. ALGEMENE SAMENVATTING	64
6. SUMMARY	66
7. LITERATUUR	73

1. ALGEMENE INLEIDING

Van vele plantensoorten is een aantasting door *Fusarium oxysporum* bekend. Over deze ziekten is in Europa, Amerika en India vanaf omstreeks 1900 regelmatig onderzoek verricht, waarbij de laatste jaren voornamelijk in twee richtingen werd gewerkt. Enerzijds zocht men naar de oorzaak van de verwelkingssymptomen, anderzijds naar de oorzaak van de resistentie. In verschillende samenvattende artikelen zijn de resultaten van dit onderzoek, dat vooral betrekking heeft op de gewassen: banaan, erwten, katoen en tomaat, vermeld (DIMOND, 1955; GÄUMANN, 1957 en LUDWIG, 1960).

De resistentie bleek niet te berusten op ongevoeligheid voor producten van de schimmel, want deze geven na toediening aan vatbare en resistente planten geen verschil in de mate van verwelking. Wel werd verschil gevonden in de werking van wortel-exudaten op de groei van de schimmel bij vatbare en resistente planten van erwten en banaan (BUXTON 1957b, 1962), terwijl BECKMANN et al. (1962) constateerden dat bij banaan een deel van de resistentie zou kunnen berusten op een blokkering van sporetransport in xyleemvaten tengevolge van visceuse producten. Dat door de schimmel op gesteriliseerde resistente plantedelen minder pectolytische en cellulolytische enzymen worden geproduceerd dan op vatbare plantedelen werd aangetoond door DEESE (1961), waaruit hij concludeerde dat de symptomen bij resistente planten uitblijven door onvoldoende enzymwerking. Het verminderen van ziektesymptomen na het toedienen van een remstof voor pectinasen (1,4 dioxyantrachinon-sulfonzuur), is voor GROSSMANN (1962) aanleiding tot de veronderstelling dat in resistente planten remming van enzymactiviteit plaats vindt.

Het doel van dit onderzoek was nadere gegevens te verkrijgen over de betrekking tussen parasiet en waardplant, ondermeer door planten van vatbare en resistente rassen te vergelijken. Hiervoor werd *Lupinus luteus* gebruikt omdat resistente selecties van de Stichting voor Plantenveredeling en vatbare handelsrassen beschikbaar waren en de aantasting in ons land voorkomt. Bij het onderzoek nam het meten van de groei van de schimmel in vatbare en resistente planten een belangrijke plaats in. Hiervoor is een methode ontwikkeld waarbij de hoeveelheid schimmel wordt bepaald in een weefselsuspensie die met behulp van een waring-blendor van plantedelen is gemaakt. In hoofdstuk 2 wordt deze methode besproken.

De groei van de schimmel in planten van het veld en in wortel of hypocotyl van planten onder meer controleerbare omstandigheden in de kas wordt in hoofdstuk 3 beschreven. Daarbij werden gegevens verkregen over een verband tussen de hoeveelheid *Fusarium* en het optreden van ziektesymptomen, en over de betekenis van de wortel van de vatbare plant voor de ontwikkeling van de schimmel.

In hoofdstuk 4 zijn de resultaten van een oriënterend onderzoek naar de aard van de resistentie gegeven.

2. MATERIAAL EN METHODEN

21. MATERIAAL

21.1. *De plant*

Dit onderzoek is uitgevoerd met de lupinesoort: *Lupinus luteus* L. Enerzijds zijn planten van het vatbare ras Neven gebruikt, bestaande uit een mengsel van zuivere lijnen waarin geen resistentie tegen de ziekte voorkomt. Anderzijds zijn planten gebruikt van resistente selecties. In het veld zijn verschillende resistente selecties beproefd, terwijl in kasproeven vrijwel uitsluitend gebruik is gemaakt van selectie 147, die door LAMBERTS (1955) als lijn is gekweekt uit een natuurlijke populatie van *Lupinus luteus* van Portugese herkomst. Deze resistente lijn 147 en de weinig gebruikte lijn 169 zijn vanaf 1956 voor dit onderzoek in eigen beheer vermeerderd, waarbij uitsluitend zaad is geoogst van zelfbestoven bloeiwijzen. Het materiaal van 147 was toen al op een besmet veld voor 100% resistent, van 169 vielen aanvankelijk nog planten weg. De resistente lijnen worden aangeduid met R147 en R169.

21.2. *De schimmel*

Isolaties van *Fusarium oxysporum* Schlecht. *f. lupini* Sn. et H., in het vervolg veelal kortweg aangeduid als *F.o. lupini*, zijn verkregen door het uitleggen van plantedelen op een voedingsbodem. Éénsporeculturen van één isolatie vertoonden onderling verschillen in kleur, sporengrootte en in pathogeniteit.

Op agar vormt de schimmel overvloedig microconidien en in mindere mate chlamydosporen. Sommige isolaties vormen sclerotien. Sporodochien ontstaan overvloedig buiten op de stengels van afgestorven planten.

De grootte der micronidien is voor diverse isolaties niet gelijk. Bovendien is deze afhankelijk van het medium, waarin de schimmel groeit. Zo waren de afmetingen voor microconidien van de isolatie 195 gegroeid op pepton-glucose-agar $7,2-11,2 \times 3,0-4,2$ micron en voor dezelfde isolatie gegroeid in vloeistofcultuur (Czapek Dox) $9,6-13,6 \times 4,2-5,7$. Vele isolaties werden op een klein toetsortiment op hun pathogeniteit onderzocht. Daarbij werden alleen bekende fysio's gevonden. Vermeld dient nog te worden dat enkele isolaties bij 21 °C niet pathogeen waren voor het vatbare ras Neven, maar wel bij 27 °C. Het is niet te zeggen of de temperatuur hier de pathogeniteit heeft verhoogd, dan wel de resistentie tegen deze isolaties heeft gebroken. Na 1 of 2 jaren voortkweken op kunstmatig medium gaven deze isolaties bij 27 °C geen symptomen meer in het vatbare ras.

In 1955 is de pathogene éénsporecultuur 195 uitgekozen en daarmee zijn gedurende vier jaren vrijwel alle kasproeven uitgevoerd. Volgens het toetsortiment van LAMBERTS (1955) behoort deze isolatie tot fysio 2. Deze tast selectie R147 niet aan. Nadat de isolatie gedurende 2 jaren op kunstmatig medium was gekweekt, werden 10 éénsporeculturen gemaakt, waarvan de pathogeniteit gelijk bleek te zijn. In 1959, dus na 4 jaren, werd een vermindering van de pathogeniteit waargenomen. Na het uitzaaien van een sporensuspensie op agar konden 2 typen onderscheiden worden die morfologisch verschilden. Een van deze beide typen kwam overeen met de oorspronkelijke groeivorm en was in dezelfde mate pathogeen. Met een nieuwe éénspore-isolatie van dat type werd het onderzoek voortgezet.

RICHTER (1941) kwam tot de conclusie dat de schimmel niet groeit beneden 6 °C en niet boven 36 °C. De optimumtemperatuur ligt volgens hem bij 27 °C. Deze gegevens werden bevestigd (fig. 1), alleen lag de optimumtemperatuur in ons geval iets hoger nl. bij 30 °C. Bij 3 en 5 °C heeft in 7 dagen geen zichtbare groei plaats.

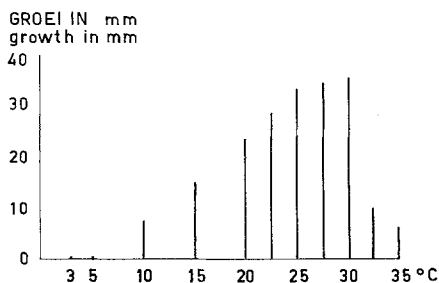


FIG. 1.
Lineaire groei van *Fusarium oxysporum* f. *lupini* bij verschillende temperaturen.
Linear growth of *Fusarium oxysporum* f. *lupini* at different temperatures.

22. KWEEKMETHODEN

22.1. Het kweken van de planten

Voor het onderzoek in de kas werden de planten op de volgende wijze gekweekt. De zaden werden gedurende 5 minuten gesteriliseerd in sublumaat 0,2%, afgespoeld met leidingwater en uitgezaaid in gesteriliseerde grond. *Fusarium*-sporen, die aan de buitenzijde van het zaad zouden kunnen voorkomen worden op deze wijze gedood. De kweekbakken stonden tijdens de kieming van de zaden en bij het opkomen der planten bij een temperatuur van circa 20 °C. Wanneer de planten de eerste blaadjes ontplooid hadden, werden zij verder bij lagere temperaturen opgekweekt om stevige planten te verkrijgen; in de winter in een kas die alleen vorstvrij werd gehouden en van vroeg in het voorjaar tot laat in de herfst buiten, daar lupineplanten vrij veel nachtvorst kunnen verdragen. De plantjes zijn voor kasproeven gebruikt als ze 1 maand oud waren, ze hebben dan ongeveer 4 blaadjes en het hypocotyl is omstreeks 4 cm lang. De planten werden dan uit de kweekbakken genomen en na een inoculatie of andere behandeling uitgeplant in de kas in bakken van 15 cm diep. Aanvankelijk is de grond in deze bakken vochtig gehouden door begieten. Later bleek de vochtigheid beter te regelen door water te geven in een cylinder, die in het centrum der bak is geplaatst en doorloopt tot de bodem, waar hij rust op een laagje glaswol of turfmolm. Een juiste vochtvoorziening geeft een betere groei van de plantjes, zodat het dan bijvoorbeeld niet nodig is, geënte of zelfs gestekte plantjes onder dubbel glas op te kweken. Nog een voordeel van deze methode is dat de grond niet zo dicht slaat als bij gieten bovenop de grond het geval is. De bakken in de kas werden gevuld met een mengsel van gesteriliseerde tuinaarde en rivierzand of met gesteriliseerd rivierzand waaraan regelmatig voedingsoplossing werd toegevoegd. De temperatuur van de grond in de bakken kan min of meer constant worden gehouden door ze in tanks met water van constante temperatuur te hangen (Wisconsin-tanks). De grondtemperatuur bedroeg 's winters 19–21 °C, 's zomer 20–22 °C. Deze temperatuur is voor het ziekteverloop

ongeveer optimaal, hetgeen wil zeggen dat bij een hogere bodemtemperatuur geen groter aantal planten ziek wordt, alleen de snelheid van het ziekteverloop wordt beïnvloed.

22.2. De betekenis van de omstandigheden in de kas

Vooraf in de wintermaanden is aanvankelijk veel last ondervonden van het wegvallen van planten door een andere oorzaak dan *Fusarium oxysporum*. Het hypocotyl wordt daarbij glazig en de plant valt korte tijd later om. Uit planten met dit ziektebeeld werden *Pythium sp.* en *Botrytis sp.* geïsoleerd. Het vermoeden lag voor de hand dat een tekort aan licht bij een relatief te hoge temperatuur de plantjes verzwakt en het bepaalde parasieten mogelijk maakt deze aan te tasten. Daarom is door bijverlichting en het laaghouden van de kastemperatuur getracht deze hinderlijke aantasting te voorkomen. Een bijverlichting van 125 watt/m² met Philips HPL lampen gaf geen verbetering, maar met 250 watt/m² op 35 cm hoogte gedurende 11 uren, kwam de aantasting niet meer voor. Daarbij is de kastemperatuur zo mogelijk op 15 °C of lager gehouden. Behalve dat de planten niet meer aan *Pythium* of *Botrytis* te gronde gingen, bleek ook de groei door bijverlichting veel beter te zijn, vooral het wortelstelsel ontwikkelde zich sterker. Dit is van groot belang voor stek- en entenproeven.

22.3. Het kweken van de schimmel

Aanvankelijk werd de schimmel gekweekt op kerse-agar. Het bleek dat de schimmel op dit substraat behalve een normaal mycelium, soms ook een merkwaardige groei kan vertonen. Daarbij wordt weinig luchtmycelium gevormd en de hyfen maken de indruk te verslijmen. Het beeld doet sterk denken aan een verontreiniging door bacteriën, maar deze werden nooit uit dergelijke culturen gekweekt. APPEL en WOLLENWEBER (1910) beschreven eenzelfde verschil in groei, hetwelk volgens hen zou samengaan met het enten van het substraat met sporen of met mycelium. Bij *F.o. lupini* is dit echter niet geconstateerd. Waarschijnlijk is in dit geval de samenstelling van het voedingsmedium van invloed op de groei, omdat op kerse-extract van verschillende herkomst één *Fusarium*-isolatie beide typen van groei kan vertonen. Wanneer *Fusarium*-isolaties op kerse-agar geen luchtmycelium vormden, toonden zij wel een weelderige groei met veel luchtmycelium en overvloedige sporenvorming op een peptonglucose-agar van de volgende samenstelling: 10 g glucose, 1 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 5 g pepton, 20 g agar en 1 liter water (pH 4,5).

De schimmel groeit heel goed op voedingsoplossing. Daarvoor werd Czapek Dox gebruikt, die als volgt is samengesteld: 2 g NaNO₃, 1 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄, 0,01 g Fe₂(SO₄)₃, 30 g glucose en 1 liter water. Op een stilstaande voedingsoplossing vormt de schimmel een vlies. In een schudcultuur ontstaan korte myceliumdraden en zeer veel microconidien, die voor een deel als spruitconidien worden gevormd. Sporensuspensie werd in het algemeen gemaakt door een cultuur op een vast agar medium met water af te spoelen.

23. INOCULATIEMETHODEN

Voor de inoculatie kwamen verschillende methoden in aanmerking, die op hun bruikbaarheid werden onderzocht.

23.1. *Het mengen van inoculum met de grond*

Bij het toepassen van deze methode bleek dat zeer veel *Fusarium* in de grond moet worden gebracht om ziektesymptomen te doen ontstaan. Bovendien trad bij deze infectiemethode een grote variatie op bij het ziek worden van de planten, waarschijnlijk als gevolg van antagonistische of concurrerende micro-organismen.

23.2. *Het dompelen van de wortels in sporensuspensie*

Een algemeen gebruikte inoculatiemethode is het dompelen van de wortels van planten in sporensuspensie. De planten worden daarbij gedurende een bepaalde tijd in een suspensie geplaatst. De duur van het onderdompelen heeft invloed op het aantal sporen dat aan de wortels wordt vastgehouden. In enkele proeven kon dit worden vastgesteld (tabel 1). De wortels waren geparaffineerd om er zeker van te zijn dat geen sporen in de vaten zouden worden binnengezogen, het hypocotyl werd onderzocht. Behalve de tijdsduur van

TABEL 1. Invloed van de duur van onderdompelen op het aantal sporen op het hypocotyl. Mixertechniek, 2×5 planten per object.

TABLE 1. *Influence of the duration of dipping in a spore suspension on the number of spores on the hypocotyl. Analysis by application of mixertechnique, 2×5 plants per treatment*

Duur van onderdompelen <i>Duration of dipping</i>	2 sec.	15 min.	60 min.
Gemiddeld aantal kolonies <i>Average number of colonies</i>	240	611	2730

dompelen zal ook de grootte van het wortelstelsel bepalen hoeveel sporen worden vastgehouden. Bepaalt men de hoeveelheid vloeistof die aan het wortelstelsel van plantjes van 1 maand oud blijft hangen, dan krijgt men waarden, die uiteenlopen van 0,01 tot 0,05 ml. Om mogelijke variatie in de hoeveelheid inoculum door de ontwikkeling van het wortelstelsel op te heffen kan men de suspensie in de vorm van kleine druppels op de wortels aanbrengen. Deze methode wordt in de volgende paragraaf besproken.

Inplaats van dompelen giet men ook wel sporensuspensie in het plantgat direct naast de wortels. In tabel 2 is de gemiddelde ziekte index voor beide behandelingen op verschillende data vermeld. Daarbij is de graad van aantasting plant voor plant bepaald volgens een schaal van 0 (alle planten gezond) tot 3 (alle planten dood). Het ziekteverloop blijkt dan ongeveer gelijk te zijn aan dat na dompelen. Bij het toedienen van suspensie in het plantgat zal de reactie samenhangen met de sporenconcentratie en de hoeveelheid suspensie; bij het dompelen met de concentratie en de tijdsduur.

Wanneer een suspensie 3 dagen na het planten wordt toegediend door deze in een holte naast de wortel te gieten, is de reactie veel zwakker. Deze methode is dus voor ons doel onbruikbaar.

TABEL 2. Vergelijking van verschillende inoculatiemethoden. Ziekteverloop uitgedrukt in de ziekte index. 30 planten per object.

TABLE 2. Comparison of various inoculation techniques. Disease severity expressed as disease index, 30 plants per treatment.

	Aantal dagen na inoculatie Number of days after inoculation				
	9	14	21	28	37
Dompelen in suspensie gedurende 15 minuten <i>Dipping in suspension during 15 minutes</i>	0,17	1,37	2,25	2,55	2,80
Bij uitplanten 15 ml suspensie naast wortel in plantgat <i>15 ml suspension beside root in plant hole</i>	0,02	0,80	2,72	2,90	2,98
3 dagen na planten 15 ml suspensie naast de wortel gieten <i>Three days after planting 15 ml suspension in a hole close to the root</i>	0,0	0,05	0,28	0,65	0,90

23.3. Het bedruppelen van de wortels met sporensuspensie

Om de hoeveelheid sporen nauwkeurig te doseren en de invloed van de grootte van het wortelsysteem op te heffen, kan per plant een bepaalde hoeveelheid sporensuspensie op de hoofdwortel worden aangebracht. Dit kan worden uitgevoerd met een micropipet of micro-injectiespuit. Het best voldeed een micro-injectiespuit, waarmee 5 of 10 druppeltjes van 0,002 ml goed over een wortel kunnen worden verdeeld. Door het toepassen van deze methode werd een goede infectie van de planten verkregen, hetgeen tabel 3 toont. Tevens blijkt uit deze tabel, dat bedruppelen met sporen minder effect heeft dan dompelen, waarbij immers werd vastgesteld, dat 0,01 tot 0,05 ml suspensie aan de wortels blijft hangen. De objecten: bedruppelen met 17.400 sporen en dompelen in 1.740.000 sporen per ml, zijn dan ongeveer gelijk wat betreft het aantal sporen op de wortel, maar tonen verschillende reacties.

TABEL 3. Vergelijking van verschillende inoculatiemethoden. Inoculatie door het plaatsen van 10 kleine druppels van een sporensuspensie op iedere wortel (1, 2, 3 resp. 17.400, 57.400 en 174.000 sporen/plant) of door 3 sec. dompelen van de wortels in een sporensuspensie (4) die 1.740.000 sporen per ml bevat (17.400 sporen/plant).

TABLE 3. Comparison of different inoculation techniques. Inoculation by placing 10 small drops of spore suspension on every root (1, 2, 3 resp. 17,400, 57,400 and 174,000 spores/plant) or by dipping the roots in a spore suspension (4) containing 1,740,000 spores per ml. (17,400 spores/plant).

Behandeling Treatment	Ziekte index op verschillende tijdstippen na inoculatie Disease index at different times after inoculation				
	10 dg. days	20 dg. days	30 dg. days	40 dg. days	50 dg. days
1	0,1	0,9	1,1	1,1	1,3
2	0,1	1,4	2,2	2,2	2,2
3	0,3	1,9	2,3	2,7	2,8
4	0,2	1,9	2,6	2,8	2,8
Onbehandeld Untreated	0	0	0	0	0

Een oorzaak van dit verschil kan zijn, dat bij het dompelen in suspensie de verdeling anders is doordat de zijwortels en de nog aanwezige haarwortels ook met sporen worden bezet.

Het laten opdrogen van suspensie doet de kiemkracht van sporen sterk afnemen (tabel 4). Hieruit volgt dat bij een inoculatie door dompelen of bedruppelen de planten vóór het uitplanten in een vochtige omgeving moeten worden bewaard.

TABEL 4. Invloed van het opdrogen van een suspensie op de kiemkracht van de conidiën. Toediening op het hypocotyl. Mixertechniek.

TABLE 4. *Influence of drying of Fusarium conidia on their germination. Application on hypocotyl. Mixertechnique.*

Duur van droog bewaren in min. <i>Time of drying in min.</i>	Aantal kolonies per plant <i>Number of colonies per plant</i>			
	Proef 1 <i>Experiment 1</i>	Proef 2 <i>Experiment 2</i>	Proef 3 <i>Experiment 3</i>	Proef 4 <i>Experiment 4</i>
0	386	452	739	237
15	—	—	66	4
60	72	44	58	—

23.4. *Het inspuiten van de wortels met sporensuspensie*

Om allerlei variabele factoren, die bij het aanbrengen van sporen buiten op de plant kunnen optreden, te vermijden werd een methode uitgewerkt, waarbij de sporen in de plant werden gebracht. Bij deze infectiemethode wordt met behulp van een AGLA micro-injectiespuit 0,001 ml van een sporensuspensie in de wortels gebracht. De hoeveelheid inoculum is op deze wijze nauwkeurig te doseren. Tengevolge daarvan wordt de variatie van het schimmelniveau tussen afzonderlijke planten kleiner, hetgeen blijkt uit tabel 5. Een ander voordeel van deze methode is dat de uitbreiding van de schimmel direct vanaf het moment van inoculatie met behulp van de nog te beschrijven mixer-techniek kan worden gevolgd (zie 24.3). De methode geeft een regelmatig ziek worden van de geïnfecteerde planten, zelfs bij een veel lager inoculatie-niveau dan bij de beide andere beschreven methoden. Over deze methode moeten nog enkele bijzonderheden worden vermeld. De sporen bezinken in de injectiespuit vrij snel. Om dit tegen te gaan wordt een klein kogeltje of enkele stukjes dekglas aan de sporensuspensie toegevoegd. Tussen iedere injectie wordt de spuit dan enige malen omgekeerd waarbij het kogeltje door heen en terug vallen een roering geeft. Tevens wordt tussen iedere injectie een druppeltje van 0,001 ml uit de naald geperst en afgetikt om een mogelijke verstopping van de naald te kunnen vaststellen.

Door met kleurstofoplossing, inplaats van sporensuspensie te injecteren, kan worden nagegaan of de injecties op de gewenste plaats komen. Hoewel de injectie de planten beschadigde, was hiervan geen nadelige invloed te constateren, mits de planten goed werden verzorgd. Vooral een juiste watervoorziening en extra verlichting in de winter bleken van groot belang te zijn.

TABEL 5. Vergelijking van verschillende inoculatiemethoden (12 proeven). Monsters van 25 planten die in groepen van 5 werden geanalyseerd. Mixertechniek.

TABLE 5. Comparison of different inoculation techniques (12 experiments). Samples of 25 plants, analysed in groups of 5. Mixertechnique.

Inoculatie <i>Inoculation</i>		Aantal dagen na inoculatie <i>Number of days after inoculation</i>	Gemiddeld aantal kolonies per 5 planten <i>Average number of colonies per 5 plants</i>	$\bar{S}_x$ in %
Onderdompelen	V	9	3700	45%
<i>Dipping roots in a</i>	R	10	930	30%
<i>spore suspension</i>	R	21	150	29%
Bedruppelen	V	11	6600	24%
(0,01 ml/plant)	V	9	7300	32%
<i>0,01 ml of a spore</i>	R	7	1000	39%
<i>suspension/root</i>				
<i>(dripping)</i>				
Inspuiten van	V	8	2000	20%
sporensuspensie	V	6	3100	14%
(0,001 ml)	V	6	3800	21%
<i>0,001 ml of a spore</i>	V	6	3000	22%
<i>suspension applied</i>	V	14	5900	20%
<i>internally (injection)</i>	R	8	1100	20%

V = Vatbaar ras / *Susceptible variety.*

R = Resistent ras / *Resistant variety.*

24. HET AANTONEN VAN DE SCHIMMEL IN PLANTEN

24.1. Anatomisch onderzoek

Door anatomisch onderzoek kan men inzicht krijgen in de verdeling van het mycelium in de weefsels. Deze methode leent zich echter niet voor kwantitatief onderzoek, omdat zij voor een bepaling op grote schaal te tijdrovend is en mede omdat kleine hoeveelheden mycelium niet steeds worden waargenomen. Herhaaldelijk kon namelijk wel schimmel worden aangetoond door het uitleggen van plantedelen op een voedingsmedium, als in coupes van aangrenzende delen geen schimmel viel waar te nemen. Het anatomisch onderzoek is vooral toegepast om inzicht te verkrijgen in de wijze van voorkomen van de schimmel in de plant en om na te gaan in hoeverre de hierna te bespreken methoden een betrouwbare maat vormen voor de hoeveelheid schimmel. Waarnemingen over de wijze van voorkomen in de plant worden in hoofdstuk 4 vermeld.

24.2. Het uitleggen van plantedelen

Door het uitleggen van plantedelen op een agarmedium, in het bijzonder schijfjes van wortel en stengel, kan men een indruk verkrijgen van de aanwezigheid van het mycelium in de plant. De mate van groei op de weefselstukjes is echter niet te gebruiken als maat voor de hoeveelheid mycelium in de plant, omdat de verkregen verschillen bij weinig en veel mycelium te klein zijn. Een groot bezwaar van het aantonen van de schimmel door middel van de uitlegmethode is dat men er zeker van moet zijn dat de parasiet niet aan de buiten-

zijde van de uitgelegde delen voorkomt. Bij stengeldelen kan men door het nemen van voldoende voorzorgsmaatregelen bij het inoculeren, planten en gieten een uitwendige besmetting wel voorkomen, zodat een uitwendige desinfectie minder moeilijkheden oplevert. Bij de wortels moet men, vooral wanneer wordt geïnoculeerd door dompelen of bedruppelen, met een belangrijke uitwendige besmetting rekening houden. Bij het desinfecteren van dergelijke plantedelen is gebleken, dat buiten op de plant aanwezige sporen alleen voor 100% gedood worden bij behandeling met een middel dat ook de wortel sterk binnendringt en, afhankelijk van de dikte van de wortels, ook het mycelium in de plant dus ten dele of geheel kan doden. Bij een niet te krachtige uitwendige desinfectie heeft men dus bij het groeien van schimmel op wortelstukjes geen zekerheid omtrent de herkomst. De uitwendige desinfectie zal na de bespreking van de mixertechniek worden behandeld.

24.3. De mixertechniek

Omdat het niet mogelijk was de hoeveelheid *Fusarium* in de planten vast te stellen door het uitleggen van plantedelen, werd naar een andere methode gezocht om deze te meten (SAALTINK, 1955). De volgende methode maakt een kwantitatieve bepaling mogelijk. Een plantedeel wordt in een mixer (Waring blender) in water fijn gemalen. Van de verkregen suspensie wordt een hoeveelheid met agar gemengd en in petrischalen uitgegoten. Het aantal kolonies dat opkomt, vormt dan een maat voor de hoeveelheid *Fusarium* in de plant. Deze methode die in deze publikatie als mixertechniek wordt aangeduid, zal hieronder uitvoerig worden beschreven. De planten worden in hun geheel gedesinfecteerd. Planten van het veld zijn 2 minuten gedompeld in sublimaat 0,2% of 5 minuten in natriumhypochloriet 4%. Planten uit de kas worden 4 minuten gedompeld in alcohol 96% van 19 °C. Voor het onderzoek van de planten van het veld zijn stukken van het bovenste deel van de wortel (2 cm) of van de stengel gebruikt. Van de planten uit de kas is voorzover niet anders is vermeld, de gehele wortel of het gehele hypocotyle stengeldeel gebruikt. Wanneer wordt gesproken van het aantal kolonies per plant (schimmelniveau) heeft dit altijd betrekking op het onderzochte deel van de plant. Vóór het malen worden de planten onder zo steriel mogelijke omstandigheden in stukjes gesneden. Het malen vindt plaats in een mixer, merk Turmix, met een toerental van circa 16.000 per minuut. Het glas waarin de plantedelen worden gemalen, wordt telkens voor het vullen inwendig ontsmet door daarin alcohol rond te schudden en het glas vervolgens minstens 30 seconden half gevuld met alcohol 96% te laten staan. Daarna wordt het glas 5 keer goed gespoeld met leidingwater. In het aldus gereinigde glas worden de plantedelen met 250 ml water gedurende 2 minuten gemalen. In het begin is steriel water gebruikt, later bleek dat leidingwater voor dit werk voldoende steriel is. Door langer dan 2 minuten te malen, tot 10 minuten toe, wordt weliswaar 10-30% meer kolonies verkregen, doch om praktische redenen (warm lopen van de lagers enz.) is de tijdsduur op 2 minuten gehouden. Niet meer dan 10 plantjes uit de kas zijn tegelijk gemalen, omdat de mixer dit niet verwerken kan. De grootste hoeveelheid materiaal van planten van het veld was per 250 ml water niet meer dan 6 gram. Van de aldus verkregen weefselsuspensie wordt met een steriele pipet met wijde uitloop een monster genomen van 15 ml. Dit monster wordt zorgvuldig gemengd met 30 ml pepton-glucose-agar van

40-50 °C, en daarna verdeeld over drie petrischalen. De dikte van de agar-laag bleek geen invloed te hebben op het aantal opgekomen kolonies.

Om na te gaan of de weefselsuspensie in het mixerglas vrij homogeen is, werden uit één glas 9 monsters genomen, ieder 15 ml groot. Deze leverden de volgende aantallen kolonies: 191, 181, 183, 210, 200, 195, 213, 203 en 208. De variatie is niet groter dan wanneer monsters van een sporensuspensie worden genomen. Op de vrij heldere pepton-glucose-agar maakt *Fusarium* kleine dichte kolonies, die gemakkelijk zijn te herkennen en niet snel door elkaar heen groeien. In het begin werd kerse-agar gebruikt, doch hierop groeit de schimmel niet steeds op dezelfde wijze, doordat het kerse-extract geen constante samenstelling heeft. Indien de voedingsbodems met *Fusarium*-suspensie bij 27 °C worden geplaatst, kan na 2 dagen het aantal kolonies worden geteld.

Soms voegt men aan voedingsmedia stoffen toe om de schimmelgroei te remmen, bijvoorbeeld bepaalde detergents. Dit zou van belang kunnen zijn, omdat dan een groter aantal kolonies per schaal kan worden geteld. Van een aantal beproefde producten lag de dosis, die nog enige groeiremming gaf echter te dicht bij de grens, waarbij een deel van de schimmel wordt gedood.

Een vraag die zich nog voordoet is: hoeveel kolonies kunnen per schaal voorkomen, zonder dat ze door een te grote dichtheid niet meer afzonderlijk te tellen zijn? Door verschillende aantallen sporen in de schalen te brengen en na 2 dagen het opkomstpercentage te bepalen, werd bepaald, dat de grens omstreeks 500 kolonies per schaal is. Bij het gebruik van weefselsuspensie zijn de kolonies minder regelmatig van grootte dan bij sporensuspensie, waarschijnlijk als gevolg van de aanwezigheid van myceliumstukjes en planteweefsel. Bij weefselsuspensies is daarom 300 kolonies per schaal als grens aangehouden, daarboven wordt een telling dus onnauwkeurig genoemd. Wanneer meer dan 1000 kolonies per 3 petrischalen werden verwacht, is steeds een verdunningsreeks gemaakt. Bij suspensies van veldmateriaal bleek herhaaldelijk bij het tellen van de kolonies een vrij sterke afwijking van de toegepaste verdunning op te treden. Er werd nagegaan of deze afwijking alleen bij het veldmateriaal voorkomt of ook bij kasplanten. Wanneer de weefselsuspensie van kasmateriaal bij herhaling van 1 op 7 wordt verdund, blijken de gevonden aantallen kolonies zich telkens te verhouden als 1 op 6 à 7. Er worden bij verdunning dus iets meer kolonies gevonden dan werd verwacht. Bij veldproeven was de afwijking groter. Dit verschil in afwijking van de verdunningsfactor tussen veld- en kasplanten zou te maken kunnen hebben met de bouw van de planten, die van het veld hadden nl. een veel dikkere centrale cylinder met veel libriform.

Naast *Fusarium*-kolonies verschenen vaak eveneens bacteriekolonies op het voedingsmedium. Aanvankelijk is de bacteriegroei onderdrukt door 50 ppm terramycine in het agarmedium te brengen. Later bleek het als gevolg van het optreden van nog andere bacteriën nodig bovendien 100 ppm streptomycine toe te voegen. Deze doseringen van beide antibiotica beïnvloedden de groei van *Fusarium oxysporum* niet.

Als het aantal kolonies, dat uit weefseldelen is verkregen, wordt vergeleken met gegevens van een anatomische bewerking van aangrenzende delen van dezelfde planten, blijken deze goed te correleren. Dit was het geval bij jonge geïnoculeerde plantjes uit de kas en oudere planten van een besmet veld. Hier wordt als voorbeeld gegeven een veldproef, waarbij van iedere plant met be-

hulp van de mixertechniek de hoeveelheid schimmel in de wortelbasis werd bepaald door 2 cm te malen. Een stengelstuk van 2 cm daarboven en het overgebleven wortelstuk werden gefixeerd voor anatomisch onderzoek. Hier- van werden coupes gemaakt en de hoeveelheid schimmel werd zo goed moge- lijk geschat. In het totaal werden 22 planten bekeken. De resultaten zijn ver- meld in tabel 6. Mede op grond van deze resultaten kan worden aangenomen

TABEL 6. Verband tussen de hoeveelheid mycelium in anatomische preparaten en het aantal kolonies verkregen met de mixertechniek.

TABLE 6. *Relation between amount of mycelium in sections and the number of colonies found by using the mixertechnique.*

Aantal planten <i>Number of plants</i>	Aantal kolonies per plant (mixertechniek) <i>Number of colonies per plant (mixertechnique)</i>	Hoeveelheid mycelium (anatomisch onderzoek) <i>Amount of mycelium (histological observations)</i>	
	2 cm wortel (A) <i>2 cm. root</i>	beneden monster A <i>underneath sample A</i>	boven monster A <i>above sample A</i>
9	< 750	9 geen / <i>none</i>	9 geen / <i>none</i>
5	750– 7.500	2 matig / <i>moderate</i> 1 weinig/ <i>little</i> 2 geen / <i>none</i>	1 matig / <i>moderate</i> 1 weinig/ <i>little</i> 3 geen / <i>none</i>
4	7.500–30.000	4 matig / <i>moderate</i>	4 matig / <i>moderate</i>
4	30.000–75.000	1 matig / <i>moderate</i> 3 veel / <i>much</i>	4 veel / <i>much</i>

dat met de mixertechniek op eenvoudige en snelle wijze de hoeveelheid my- celium (plus sporen) in de plant kan worden bepaald. Ten opzichte van de methode waarbij stukjes planteweefsel worden uitgelegd heeft de mixer- methode het voordeel dat zij kwantitatief is. Tevens zal een zeer geringe hoe- veelheid *Fusarium*, die na de ontsmetting aan de buitenzijde overblijft, weinig invloed op het resultaat hebben.

24.4. *Het uitwendig desinfecteren van planten*

Voor het kweken van *Fusarium oxysporum* uit plantedelen is het noodza- kelijk deze eerst uitwendig te desinfecteren. Dit geldt ook voor het materiaal dat met de mixertechniek wordt geanalyseerd. De eis die men bij toepassen van de mixertechniek moet stellen is dat zoveel mogelijk *Fusarium* en andere schimmels aan de buitenzijde worden gedood, terwijl binnenin de planten- delen de schimmel in leven moet blijven. Er is in 24.3. opgemerkt, dat een geringe hoeveelheid *Fusarium* aan de buitenzijde bij de mixertechniek geen belangrijke invloed heeft op het resultaat, indien althans in de plant *Fusarium* aanwezig is. Gegevens over de ontsmetting van planten werden al eerder ge- publiceerd (SAALTINK, 1959). Daaruit blijkt dat bij toepassing van enkele veel gebruikte methoden 95 tot 99% van de aanwezige schimmel aan de buiten- zijde wordt gedood. Wanneer sporen met behulp van een injectiespuit in de wortels van planten werden gebracht bleek geen schimmel in de plant gedood

te worden door een behandeling met ethanol 96% van 19 °C gedurende 4 minuten. Voorzover niet anders is vermeld werd deze ontsmettingswijze bij het onderzoek toegepast.

Bij de gegevens in bovenvermelde publikatie werden nog enkele aanvullende resultaten verkregen die hier vermeld dienen te worden. Het ontsmettingsmiddel sublimaat is bij een toepassen van de mixertechniek minder geschikt. Deze stof wordt namelijk zo sterk door het planteweefsel vastgehouden, speciaal in de wortel, dat de sublimaatconcentratie in de suspensie te hoog wordt. Dit was merkbaar wanneer 10 ontsmette kasplantjes tegelijk in 250 ml water werden gemalen. Het kan met nog 2 andere voorbeelden worden geïllustreerd:

a. Van planten die 2 minuten in sublimaat 0,2% waren ontsmet, werden de wortels uitgelegd op een agarmedium waarin sporen waren gesuspenderd. Rondom de uitgelegde stukjes werd een zône niet begroeid met *Fusarium*.

b. Planten werden ontsmet, gespoeld in stromend water, gedompeld in sporensuspensie en gedroogd door ze 2 uren in de kamer te laten liggen. Daarna werd het aantal levende *Fusarium*-sporen bepaald met behulp van de mixertechniek. Na 1 en 14 uren spoelen in stromend water kwamen bij ontsmette plantjes resp. 81 en 141 kolonies op, bij de controle 711.

In de reeds genoemde publikatie is vermeld dat sporen in een oplossing van een ontsmettingsmiddel veel gevoeliger zijn dan wanneer zij zich op de plant bevinden. Verder onderzoek bracht aan het licht dat schimmelsporen op dood materiaal gevoeliger zijn dan op levende planten. Stokjes en lupineplantjes werden in een sporensuspensie gedompeld en daarna gedroogd. Vervolgens werden zij ontsmet in ethanol 96% bij 19 °C. De hoeveelheid niet gedode sporen werd bepaald met behulp van de mixertechniek door een monster van 3 stokjes of 3 hypocotylen met ongeveer hetzelfde oppervlak te malen. Het blijkt dat de sporen op de levende planten moeilijker zijn te doden dan op de stokjes (tabel 7). Een verklaring is hiervoor niet te geven. Bij het beoordelen van de uitwendige steriliteit van plantedelen mag men dus niet zonder meer afgaan op resultaten met stokjes zoals is gedaan door ARMSTRONG en ARMSTRONG (1948) bij hun onderzoek over het voorkomen van biotypen van *Fusarium oxysporum* in bataten.

TABEL 7. De betekenis van het substraat voor de desinfectie met ethanol. *Fusarium*-sporen aangebracht op verschillende substraten, A: dood substraat (stokjes); B: levende lupinestengels. Ethanol 96%, 19°C. Mixertechniek.

TABLE 7. Importance of the substrate to the disinfection with ethanol. *Fusarium conidia* on different substrates. A dead substrate (wooden sticks), B: living lupin stems. Ethanol 96%, 19°C. Mixertechnique.

Tijdsduur ontsmetting <i>Period of disinfection</i>	Proef 1 / <i>Experiment 1</i>		Proef 2 / <i>Experiment 2</i>	
	Aantal kolonies <i>Number of colonies</i>		Aantal kolonies <i>Number of colonies</i>	
	Stokjes <i>Sticks</i>	Stengels <i>Stems</i>	Stokjes <i>Sticks</i>	Stengels <i>Stems</i>
$\frac{1}{2}$ min.			27	30
1 min.			0	35
2 min.	0	47	0	13

3. PROEVEN OVER DE ONTWIKKELING VAN DE PARASIEET IN DE PLANT

31. DE ONTWIKKELING VAN DE SCHIMMEL IN PLANTEN OP HET VELD

31.1. Inleiding

Men heeft voor verschillende gewassen de groei van *Fusarium oxysporum* in de plant gevolgd hetzij door het uitleggen van plantedelen hetzij door anatomisch onderzoek. Daarbij is gebleken dat de schimmel zich in het xyleem vestigt en uitbreiding vanuit de wortel tot in de top plaatsvindt.

Bij verschillende gewassen heeft men ook aandacht besteed aan de aanwezigheid van de schimmel in resistente variëteiten van de gastheer. Voor erwten stelden SCHROEDER en WALKER (1942) en BUXTON (1957a) vast, dat de schimmel tot in de schors van resistente planten binnendringt, doch slechts onder speciale omstandigheden in het xyleem groeit; in het laatste geval gaat de plant ook symptomen vertonen en is de resistentie dus gebroken. TISDALE (1917) nam voor vlas eveneens waar dat de schimmel in de wortel van resistente planten binnendringt, doch niet in het xyleem groeit. Van andere waardplanten is bekend, dat *Fusarium* wel in de xyleemvaten van resistente planten kan doordringen. ANDERSON en WALKER (1935) vermeldde dat de schimmel soms in de stengel van resistente koolplanten wordt aangetroffen, maar dan altijd in zeer geringe mate. Verder vermeldde ULLSTRUP (1937), dat wortels van resistente asterplanten in een gering aantal gevallen infectie van het xyleem toonden. Een duidelijker infectie van het xyleem van resistente planten is vastgesteld voor tomaten (SNYDER, BAKER en HANSEN, 1946) en katoen (DHARMARAJULA, 1932).

Tijdens het eigen onderzoek over de aantasting van lupine is vastgesteld dat de schimmel zich in planten van een vatbaar ras sterk uitbreidt en in een vergevorderd ziektestadium zelfs in de hoofdas van de bloeiwijze kan worden aangetoond. Ook is gevonden dat in planten van resistente selecties de schimmel in de stele groeit en in een later ontwikkelingsstadium van de plant tot op grote hoogte uit stengeldelen kan worden geïsoleerd en anatomisch aangetoond. Over het verloop van de uitbreiding van *Fusarium* en de verhouding van de hoeveelheden mycelium in vatbare en resistente planten waren nog geen gegevens bekend. Het kwantitatieve verloop van de infectie in deze planten is daarom met behulp van de mixertechniek nagegaan. De gebruikte planten groeiden in het veld op besmette grond.

31.2. De mate van uitbreiding in vatbare en resistente planten van het veld

Bij oriënterende proeven in 1955 zijn iedere 14 dagen monsters van 3 planten geanalyseerd door gebruik te maken van de mixertechniek. Na een uitwendige ontsmetting in sublimaat 0,2% gedurende 2 minuten, werden stukken van 2 cm van het direct aan de stengel grenzend deel van de wortel gemalen. Door deze werkwijze kon *F.o. lupini* reeds in jonge planten van resistente selecties worden aangetoond. Tevens bleek dat de hoeveelheid schimmel in deze planten op een ander niveau lag dan bij planten van een vatbaar ras, waarin de toename van de schimmel tot het begin van de verwelking sterk was. De variatie in de planten onderling was evenwel zo groot, dat monsters van 3

planten te klein waren om voldoende nauwkeurig een gemiddeld niveau van de schimmel te bepalen. In 1956 werd de proef herhaald met monsters van 9 planten, waarbij opnieuw werd geconstateerd dat de toename in het vatbare ras veel sneller verliep, dan in de resistente selectie (tabel 8). Ook nu bleek

TABEL 8. Ontwikkeling van *Fusarium* in een vatbaar ras en in resistente selecties. Planten gegroeid op een besmet veld. Mixertechniek. 2 cm wortel, 9 planten per monster.

TABLE 8. *Growth of Fusarium in a susceptible variety and in resistant selections. Plants from an infested field. Mixertechnique. 2 cm. root, 9 plants per sample.*

Tijdstip bemonstering <i>Date of sampling</i>	Gemiddeld aantal kolonies per plant <i>Average number of Fusarium colonies per plant</i>			
	Resistente selecties <i>Resistant varieties</i>			Vatbaar ras <i>Susceptible variety</i>
	R 147	R 169	R 1026	Neven
4 juni / <i>June</i>	180	4.100	350	133.000
21 juni / <i>June</i>	9.900	440	5.400	162.000
17 juli / <i>July</i>	4.400	22.100	3.600	1.836.000
6 augustus / <i>August</i> . .	47.600	22.100	96.900	
20 augustus / <i>August</i> . .	680.000	238.000	425.000	
3 september	731.000	374.000	493.000	

grote variatie te bestaan, zodat het gemiddelde een grillig verloop had, klaarblijkelijk een gevolg van grote verschillen in het tijdstip waarop en de mate waarin zij werden geïnfecteerd. Bij het vatbare ras was het aantal verkregen *Fusarium*-kolonies zeer groot omstreeks 15 juli, het tijdstip waarop het gewas in bloei staat en de verwelkingssymptomen zich sterk gaan ontwikkelen. Na 15 juli zijn geen bepalingen gedaan in monsters van vatbare planten omdat toen reeds planten door de ziekte waren afgestorven en daardoor geen goed beeld meer van de mate van uitbreiding kon worden verkregen. Opvallend is niet alleen dat in resistente selecties het *Fusarium*-niveau aanvankelijk lager is dan in vatbare planten, doch ook dat omstreeks 15 augustus, dat is na de bloei, een sterke uitbreiding plaats heeft. De totale hoeveelheid *Fusarium* komt omstreeks 15 augustus in resistente planten zelfs op een hoger niveau te liggen dan omstreeks 15 juli in vatbare planten het geval was.

Soortgelijke resultaten werden verkregen bij een andere veldproef, ook wanneer in plaats van wortelstukken de onderste 2 cm van de stengel werd onderzocht. Een dergelijke sterke toename van *Fusarium* in resistente planten is niet in de literatuur bij andere gewassen beschreven.

31.3. De sterke toename in resistente planten na de bloei

Om een bevestiging te krijgen van de opvallende uitbreiding in resistente planten is in 1957 op drie tijdstippen een groep van 20-34 planten, plant voor plant onderzocht. Dit werd nodig geacht om een beter inzicht te krijgen in het gemiddelde met de daarbij behorende variatiebreedte. In tabel 9 wordt het gemiddeld aantal verkregen kolonies vermeld, met de middelbare fout van het gemiddelde.

Ook in deze proef heeft dus na de bloei, die tussen 6 juli en 15 augustus viel, een zeer sterke uitbreiding van *Fusarium* plaats gevonden. Hoewel de

TABEL 9. Hoeveelheid *Fusarium* in R 147 voor en na de bloei. Mixertechniek; 2 cm wortel + 3 cm stengel.

TABLE 9. *Quantity of Fusarium in R 147 (resistant) before and after flowering (end of July). Mixertechnique; 2 cm. root + 3 cm. stem.*

Tijdstip bemonstering <i>Date of sampling</i>	Aantal afzonderlijk onderzochte planten <i>Number of plants ground separately</i>	Gemiddeld aantal kolonies/plant <i>Average number of colonies per plant</i>	S _x in %
20 juni/ <i>June</i>	30	1.300	50
6 juli/ <i>July</i>	20	290	23
15 augustus/ <i>August</i> . .	34	255.000	22

middelbare fout in juni zeer groot was, mag worden gezegd dat van juni tot juli de toename zeker in een andere mate heeft plaatsgevonden dan de uitbreiding na de bloei.

Om na te gaan of het in de tabellen 8 en 9 vermelde hoge *Fusarium*-niveau in resistente planten – hoger dan in vatbare planten! – voor een deel kan worden toegeschreven aan de grootte van deze planten, werd de navolgende proef genomen.

Van een laat gezaaid perceel van het vatbare ras Neven werden op 5 september 17 planten verzameld, die ongeveer in hetzelfde rijpheidsstadium verkeerden als 34 resistente planten (uit tabel 9), die op 15 augustus verzameld waren. De peulen vertoonden juist de eerste bruinkleuring. De symptomen van de uitgekozen planten liepen uiteen van enkele verwelkte topbladeren aan volkomen groene planten tot planten met verwelkte topbladeren en enige bruinkleuring aan de stengel; totaal verwelkte of afstervende planten werden niet in het monster betrokken. In tabel 10 is het gemiddelde aantal kolonies per plant vermeld. Hieruit blijkt, dat wanneer men even grote planten in eenzelfde ontwikkelingsstadium vergelijkt, het schimmelniveau in de vatbare aanmerkelijk hoger ligt, dan in de resistente. Het hogere schimmelniveau bij de resistente planten van tabel 8 moet dus klaarblijkelijk aan het ontwikkelingsstadium der resistente planten worden toegeschreven.

TABEL 10. Hoeveelheid *Fusarium* in R 147 en Neven, bepaald tegen het begin van de rijping. Mixertechniek; 2 cm wortel + 3 cm stengel.

TABLE 10. *Quantity of Fusarium inside R 147 (resistant) and Neven (susceptible just wilting) at the beginning of ripening. Mixertechnique, 2 cm. root + 3 cm. stem.*

	Aantal afzonderlijk onderzochte planten <i>Number of plants ground separately</i>	Gemiddeld aantal kolonies/plant <i>Average number of colonies per plant</i>	S _x in %
Resistent/ <i>resistant</i> . .	34	255.000	22
Vatbaar/ <i>susceptible</i> . .	17	13.124.000	18

31.4. *Het verband tussen de bruinkleuring van vaten en de hoeveelheid mycelium in resistente planten*

Bij planten van resistente selecties wordt op besmette grond, tegen de rijping meestal bij een deel van de planten een bruinkleuring van de vaten waargenomen. Dit kan men in de bladoksels zien na het verwijderen van de

bladsteel. Op niet besmette percelen wordt deze bruinkleuring nooit gevonden. Verkleuring van de jonge bladeren, verwelking of andere symptomen werden niet waargenomen. Wel was de rijping soms iets versneld, terwijl ook de oudere bladeren soms eerder afstierven.

Het leek de moeite waard na te gaan in hoeverre verband bestaat tussen deze bruinkleuring en de hoeveelheid *Fusarium*. Van een aantal planten met en zonder verkleuring werd daarom de hoeveelheid *Fusarium* bepaald. Uit de gevonden aantallen kolonies (tabel 11) blijkt dat ondanks het geringe aantal onderzochte planten en de grote onderlinge variatie, in planten met verkleuring inderdaad meer *Fusarium* voorkomt. Het is opmerkelijk dat geen totale verwelking der planten optrad. Een factor van betekenis hiervoor zal zijn, dat het *Fusarium*-niveau niet die hoogte bereikt als in vatbare planten het geval is.

TABEL 11. Hoeveelheid *Fusarium* in planten van R 147, met en zonder verbruining in blad-oksels van afrijpende planten. Mixertechniek.

TABLE 11. *Quantity of Fusarium in 2 cm. pieces of 6 plants of R 147 (resistant), with and without browning of some vessels in ripening plants. Mixertechnique.*

Bruine vaten / <i>Vessels coloured</i>		Geen bruine vaten / <i>Vessels uncoloured</i>	
Aantal kolonies per plant <i>Number of colonies/plant</i>	Gemiddeld aantal kolonies <i>Average number of colonies</i>	Aantal kolonies per plant <i>Number of colonies/plant</i>	Gemiddeld aantal kolonies <i>Average number of colonies</i>
310.000	2.375.000	5.000	108.000
314.000		10.000	
658.000		15.000	
1.356.000		25.000	
3.262.000		79.000	
8.352.000		216.000	

31.5. *Samenvatting en bespreking*

Met behulp van de mixertechniek werd het schimmelniveau in planten van het veld op verschillende tijdstippen gemeten. In planten van het vatbare ras Neven kon een sterke uitbreiding van de schimmel in de wortel worden vastgesteld.

Bij onderzoek van een resistente selectie werd de schimmel in alle planten aangetroffen, evenwel op een veel lager niveau dat vóór de bloei geen verdere toename vertoonde. Na de bloei nam de schimmel in korte tijd sterk toe maar toch vertoonden planten van deze resistente selecties bij dit hoge niveau geen verwelkingsverschijnselen. Dit hoge niveau wordt in een veel later ontwikkelingsstadium van de planten bereikt dan bij het vatbare ras. Mogelijk is dit de oorzaak dat deze planten geen verwelkingsverschijnselen vertoonden. Soms werd een bruinkleuring van de vaten waargenomen, hetgeen bleek samen te gaan met een hoger schimmelniveau.

De grote variatie van de verkregen gegevens in de veldproeven maakte het noodzakelijk het onderzoek onder meer constante omstandigheden voort te zetten.

32. DE ONTWIKKELING VAN DE SCHIMMEL IN DE WORTEL VAN PLANTEN IN DE KAS

32.1. Inleiding

Zoals uit het voorgaande is gebleken lenen planten van het veld zich minder goed voor een nauwkeurig onderzoek als gevolg van de grote variatie tussen planten of groepen van planten.

Om het verloop van de uitbreiding nauwkeuriger te leren kennen is het nodig proeven te nemen onder zoveel mogelijk constante omstandigheden, waarbij vooral grondtemperatuur en dichtheid van inoculum aandacht vragen. De grondtemperatuur was goed te regelen door bakken met grond te plaatsen in de reeds eerder genoemde Wisconsintanks.

Het is bekend, dat het ziekteverloop langzamer is naarmate de inoculum concentratie afneemt (HAYMAKER, 1928; SCHEFFER en WALKER, 1953). Bij zeer lage concentratie wordt ook het percentage planten dat ziekteverschijnselen vertoont geringer. In het algemeen heeft men voor inoculatieproeven steeds die dosis gebruikt, waarbij het ziekteverloop niet door verdere verhoging van de dosis kon worden beïnvloed (maximaal effect).

In de nu volgende paragraaf zal het verloop van de ziekte bij verschillende sporenconcentraties van *F.o. lupini*, worden besproken.

32.2. De optimale dosis inoculum

De dosis waarbij het bovengenoemde maximale effect juist wordt bereikt, is hier de optimale genoemd. Deze werd vastgesteld door sterk uiteenlopende hoeveelheden inoculum toe te dienen en vervolgens het ziekteverloop voor iedere dosering na te gaan.

In figuur 2 is een voorbeeld gegeven van het verloop van de ziekte voor

Ziekteverloop bij verschillende inoculativeniveaus. (zie fig. 2, 3 en 4)

Development of the disease at different levels of inoculation. (see fig. 2, 3 en 4)

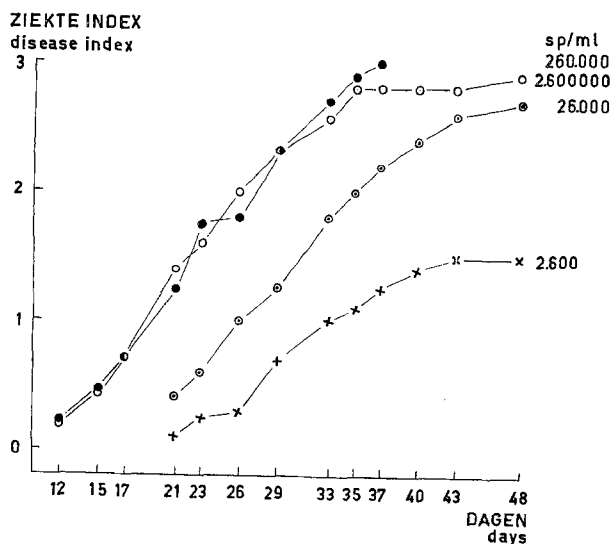


FIG. 2.
Inoculatie door dompelen
der wortels in een sporen-
suspensie.
Inoculation by dipping the
roots in a spore suspension.

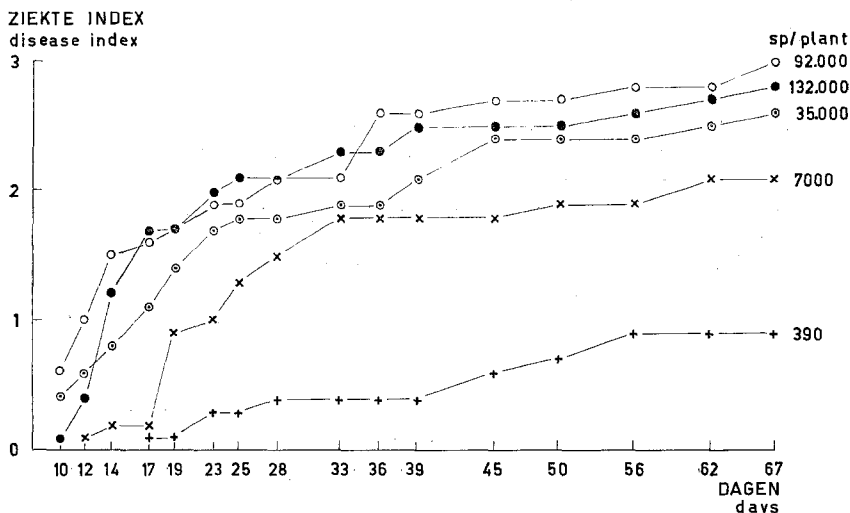


FIG. 3. Inoculatie door verdeling van 0,02 ml sporensuspensie per wortel. Het object 92.000 sp./plant werd geïnoculeerd door dompelen.

Inoculation by applying 0.02 ml of a spore suspension to the surface of the root. In one case the plants were inoculated by dipping (92,000 sp./plant).

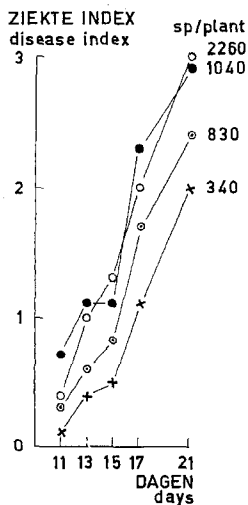


FIG. 4. Inoculate door injectie van een sporensuspensie.

Inoculation by injection of a spore suspension.

objecten uit één proef, waarin werd geïnoculeerd door dompelen van de wortels in suspensies variërend van $26-2,6 \cdot 10^6$ sporen per ml. Uit de proef blijkt dat het optimale niveau boven 26.000 sporen per ml ligt. Bij een dosering van 2600 sporen treedt de ziekte later op en verloopt het ziekteproces langzamer. Een dosering van 26 sporen per ml leverde in deze proef geen zieke planten op. De kiemkracht van de sporen werd in deze proef niet bepaald. In andere proeven werd dit uitgevoerd door de sporen op ager te laten kiemen. Omdat de kiemkracht dan in het algemeen ongeveer 50% was en het pathogeen

steeds onder dezelfde omstandigheden werd gekweekt, mag worden aangenomen dat de kiemkracht ook in deze proef ongeveer 50% was.

Wanneer in het vervolg van „aantal sporen per plant” wordt gesproken, is altijd het aantal kiemkrachtige sporen bedoeld. Dit werd dan onmiddellijk na inoculatie bepaald met behulp van de mixertechniek. Het aantal kolonies dat wordt verkregen geeft aan hoeveel kiemkrachtige sporen op de wortels terecht kwamen, of bij injectieproeven werden geïnjecteerd. In figuur 3 is het ziekteverloop gegeven van een proef waarin de planten werden geïnoculeerd door over de hoofdwortel 0,02 ml sporensuspensie te verdelen. Het optimum ligt nu boven 35.000 sporen per plant. Bij minder dan 7.000 sporen per plant schijnt een groot aantal planten aan de infectie te ontsnappen daar zij in een periode van 67 dagen geen symptomen vertoonden. Van één object werden de wortels gedompeld in een sporensuspensie van $2,7 \times 10^6$ sporen per ml (= 92.000 sporen per plant). Bij injectieproeven ligt de optimale dosis bij ongeveer 1.000 sporen per plant. Dit blijkt uit een proef waarin 340 tot 2.300 sporen per plant werden toegediend (fig. 4). In het vervolg wordt het „aantal sporen per plant” bij proeven waarin werd geïnoculeerd door injectie met een sporensuspensie, ook aangeduid als „inoculatie-niveau”.

Uit deze en andere proeven blijkt, dat bij injectie de optimale dosis ongeveer 1000 sporen per plant is, terwijl bij dompelen resp. bedruppelen deze optimale dosis 26.000 sporen per ml en 35.000 sporen per plant is. Een vergelijking van de resultaten na dompelen en bedruppelen geeft een bevestiging van de resultaten in paragraaf 23.3: na dompelen kan een groter aantal sporen de plant infecteren, zodat een geringer dosis nodig is voor eenzelfde effect. Uit de gegevens over de optimale dosis bij injectie volgt dat klaarblijkelijk bij het aanbrengen van sporen aan de buitenkant slechts een deel hiervan tot infectie leidt en geen symptomen ontstaan als de hoeveelheid schimmel te gering is.

32.3 DE TOENAME VAN HET SCHIMMELNIVEAU (SN) IN DE WORTEL VAN EEN VATBAAR RAS

32.31. Inleiding

Door gebruik te maken van de injectie- en de mixertechnieken is de uitbreiding van de schimmel in planten bestudeerd. Direct na de injectie werd steeds van een monster van 25 planten bepaald hoe hoog het inoculatie-niveau lag. Vervolgens werd meestal iedere 2 dagen van een even groot monster nagegaan hoeveel schimmel zich in de wortel bevond, dit schimmelniveau wordt in het vervolg aangeduid met SN.

Resultaten van de proeven zijn gegeven in de figuren 5 en 6, waarin het aantal kolonies in logaritmische schaal is uitgezet tegen de tijd. In figuur 5 zijn de resultaten van proeven met een lage dosis inoculum gegeven, in figuur 6 die met een bijna optimale en een zeer hoge dosering. Opvallend is dat de lijnen ondanks de grote variabiliteit van het materiaal, zowel bij lage als de meer optimale dosering een vrijwel evenwijdig verloop te zien geven. Zij hebben ongeveer dezelfde helling, hetgeen betekent dat de mate van toename van de schimmel per tijdseenheid in de verschillende proeven ongeveer gelijk was.

Bij de ontwikkeling van de schimmel in de plant zijn – naar het schijnt – drie fasen te onderscheiden; die vooral bij de laagste dosis (fig. 5) duidelijk naar voren komen.

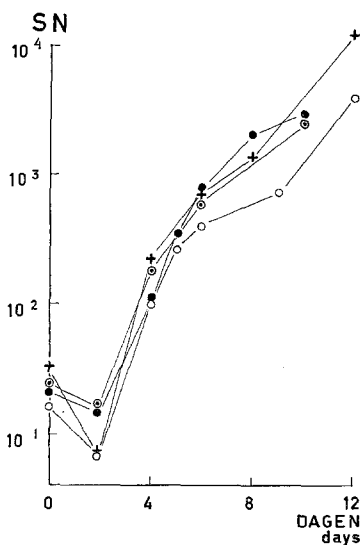


FIG. 5.
Verloop van het schimmelniveau (SN) in wortels van vatbare planten bij een laag inoculatie-niveau (4 proeven).
The course of the level of fungus (SN = number of colonies) in the roots of susceptible plants for a low level of inoculation (4 experiments).

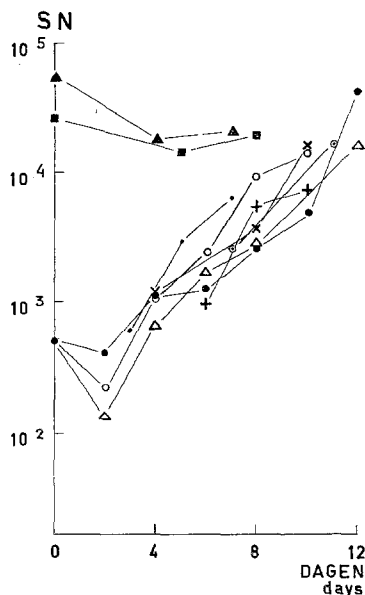


FIG. 6.
Verloop van het schimmelniveau (SN) in wortels van vatbare planten bij een bijna optimaal en een supra-optimaal inoculatie-niveau (resp. 7 en 2 proeven).
The course of the level of fungus (SN = number of colonies) in the roots of susceptible plants for a nearly optimal and a supra-optimal level of inoculation (7 and 2 experiments respective).

1. Gedurende de eerste dagen daalt het aantal kolonies. In de grafieken valt het minimum na 2 dagen; door het ontbreken van bepalingen na 1 dag en na 3 dagen, is dit evenwel niet nauwkeuriger aan te geven. De enige bepaling na 3 dagen (fig. 6), waarbij het aantal kolonies hoger ligt dan het inoculatie-niveau wijst erop dat het minimum vóór de 3e dag valt.

2. Van de 2e tot de 4e à 5e dag vindt een snelle toename plaats.

3. Vanaf de 5e dag is de toename langzamer. Als gevolg daarvan is, in het bijzonder bij de lage dosering na 4 à 5 dagen een knik in het verloop waar te nemen.

32.32. De afname van SN gedurende de eerste 2 dagen na inoculatie

Voor de daling van het schimmelniveau gedurende de eerste twee dagen zijn verschillende verklaringen mogelijk.

a. De jonge zich juist ontwikkelende mycelia zijn zo gevoelig dat een gedeelte ervan (20-80%, gemiddeld 50%) als gevolg van de toepassing van de mixertechniek te gronde gaat.

b. De plant functioneert als selectief voedingsmedium; in de plant kiemen niet alle sporen die wel op kunstmatig voedingsmedium kiemen.

c. Een groot deel der sporen gaat op andere wijze vóór of tijdens de kieming te gronde. Dit zou het geval kunnen zijn als celsap, dat vrijkomt door de verwonding, toxisch is.

d. Een deel der geïnjecteerde sporen gaat te gronde doordat zij elkaar hinderen.

Bij punt a kan worden opgemerkt dat het doden van jonge mycelia door de messen van de mixer niet waarschijnlijk lijkt, wanneer men de resultaten van de volgende proeven in aanmerking neemt. Daarbij is uitgegaan van resultaten van oriënterende proeven waarin de mixertechniek werd toegepast, namelijk dat door langer malen dan 2 minuten het aantal verkregen kolonies met 10 tot 30% toeneemt (24.3.). Wanneer met sporen geïnjecteerde planten na 2 dagen worden gemalen, kan bij een langer malen dan 2 minuten het volgende worden verwacht: 1. het aantal kolonies neemt toe, doordat jonge hyfen worden gedeeld, 2. het aantal kolonies neemt af, doordat jonge hyfen worden gedood, 3. het aantal kolonies blijft gelijk doordat de hyfen nog te kort zijn om te kunnen worden gedeeld. In 4 proeven is vastgesteld, dat het geen verschil maakt of planten 2 dagen na injectie gedurende 2 dan wel 6 minuten worden gemalen, het verkregen aantal kolonies is in beide gevallen gelijk. Op grond hiervan moet worden aangenomen, dat de jonge hyfen nog te kort zijn om te kunnen worden gedeeld en evenmin worden beschadigd.

Het punt b kan verder buiten beschouwing blijven, omdat de gebruikte *Fusarium*-isolatie aan éénspurecultuur was. Bovendien kan moeilijk worden aangenomen, dat een deel der sporen op selectief medium binnen 2 dagen doodgaat.

Hetgeen in punt c wordt geopperd vindt enige steun in het feit, dat verwonding inderdaad invloed kan hebben op de schimmelgroei. Wanneer geïnfecteerde planten na 4 dagen opnieuw verwond werden door injectie van water, nam het schimmelniveau minder sterk toe dan bij de niet voor de tweede maal verwonde controle (zie 32.5.). Ook worden na inoculatie in de schors minder planten ziek dan na inoculatie in het xyleem (zie 35.7.). Dat celsap van lupine mogelijk een fungitoxische stof bevat, bleek ook door sporen in een zoutoplossing (0,8% NaCl) en in steriel perssap in de koelkast te bewaren. In het perssap zijn de sporen na 10 dagen dood, in de zoutoplossing is na 10 dagen nog 90% en na 35 dagen nog 10% in leven.

Over de mogelijkheid, die in punt d wordt genoemd zijn geen gegevens verkregen. Uit de literatuur is evenwel bekend, dat sporen een fungitoxische stof kunnen produceren, die bij ophoping van de sporen de kieming kan belemmeren (BOYD, 1952; SHEPHERD en MANDRIJK, 1962), zodat met deze mogelijkheid wel rekening moet worden gehouden.

32.33. De toename van SN van de 2e tot de 5e dag na inoculatie

Wat betreft de sterke toename tussen de 2e en de 5e dag, gevolgd door een langzamer toename na de 5e dag, kan men zich afvragen of de knik na 5 dagen een nieuwe fase in de ontwikkeling van de schimmel aangeeft of dat de overgang in werkelijkheid geleidelijker is. Om inzicht te verkrijgen in het verloop van het gemiddelde van de lijnen werd zowel voor de bepalingen van

de 2e t/m de 12e dag als alleen voor die van de 5e t/m de 12e dag een regressielijn berekend volgens de formule: $2z = \frac{1}{2}ax^2 + bx$

$$a = \frac{\sum x_i y_i - \bar{x} \sum y_i}{\sum x_i^2 - \bar{x} \sum x_i} \quad b = \bar{y} - a\bar{x}, \quad \begin{array}{l} x = \text{tijdsafstand} \\ y = \text{helling in cm} \end{array}$$

Voor de lage dosering wordt in het eerste geval een parabolische kromme verkregen, die de groei minder goed weergeeft dan de praktisch rechte lijn, die wordt verkregen door de gegevens vanaf de 5e dag te gebruiken. Bij de bijna optimale dosering maakt het weinig verschil of men de 2e en 4e dag al of niet meerekent bij de bepaling van de regressielijn, de knik is in beide gevallen nauwelijks waarneembaar.

De gegevens wijzen erop, dat in plaats van een geleidelijk verloop bij lage dosering een plotselinge verandering omstreeks de 5e dag optreedt.

Om de gegevens van de lage en de bijna optimale dosering te kunnen vergelijken is van beide de regressielijn, die vanaf de 5e dag is berekend in figuur 7 getekend, tegelijk met de rekenkundige gemiddelden van de bepalingen van het schimmelniveau tot de 5e dag. Uit deze figuur is dan af te lezen, dat bij de lage dosering de vermeerderingsfactor per dag vóór de knik 3,2 en erna 1,5 bedraagt, bij de bijna optimale dosering 1,9 en 1,5.

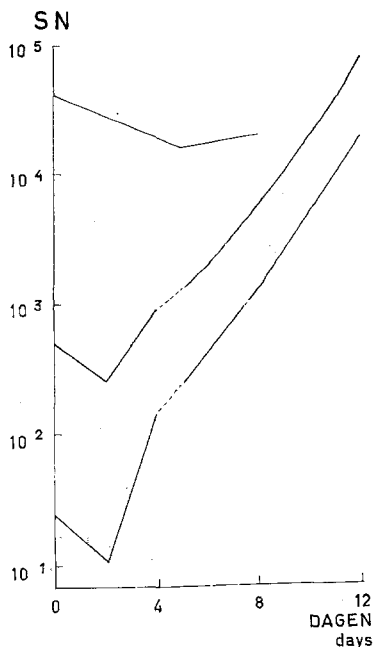


FIG. 7.

Het gemiddelde verloop van SN in wortels van vatbare planten bij verschillende inoculatie-niveaus. Voor de 0e, 2e en 4e dag zijn gemiddelden gegeven van de waarden uit fig. 5 en 6, terwijl voor de overige gegevens per inoculatie-niveau de regressielijn is berekend.

The average course of fungus level (SN) in roots of susceptible plants for different levels of inoculation. The amounts on the 0, 2nd and 4th day are represented by average values calculated from the data of figures 5 and 6, for the later data the regression line is calculated per level of inoculation.

Het optreden van een knik kan op twee wijzen verklaard worden:

a. Het is mogelijk, dat de aanvankelijk snelle vermeerdering boven een bepaald SN een constante waarde van 1,5 aanneemt. Uit de gegevens van de lage dosering blijkt, dat dit niveau bij circa 225 ligt. Aangezien bij de opti-

male dosering SN niet beneden 225 komt, ook niet op de 2e dag, is hier geen afwijking van de rechte lijn te verwachten. Een verklaring van de sterkere groei bij laag schimmelniveau is hiermee niet gegeven. Uit de literatuur is, bijvoorbeeld bij vloeistofculturen, een dergelijke knik in de groeicurve niet bekend.

b. Het optreden van een knik zou ook verklaard kunnen worden door het in werking treden op de 5e dag van een mechanisme, dat een zekere resistentie teweeg brengt en dat de schimmel afremt, zodat de vermenigvuldigingsfactor niet groter kan worden dan 1,5. Vooralsnog is niet in te zien, waarom dit mechanisme zowel bij lage als optimale dosis, dus onafhankelijk van SN, op de 5e dag zou optreden. Deze verklaring lijkt daarom minder waarschijnlijk.

Met de thans beschikbare gegevens lijkt het aannemelijk, dat bij een bepaald SN de toename met een andere snelheid gaat verlopen.

32.34. De toename van SN vanaf de 5e dag na inoculatie

Het ongeveer evenwijdig lopen van de regressielijnen bij lage en optimale dosering is een opvallend verschijnsel. Men kan daaruit opmaken dat het uitbreidingsvermogen (uitgedrukt in de vermenigvuldigingsfactor) een zekere waarde niet kan overschrijden. Een bestaand verschil in SN wordt niet ingehaald. In het geval van de optimale en lage dosering van fig. 7 blijkt het verschil 2 à 3 dagen te zijn. Stelt men dat een bepaald SN bij eenzelfde hoeveelheid plantmassa moet zijn bereikt om de ziektesymptomen teweeg te brengen, dan zal de ziekte dus later optreden, naarmate de dosis inoculum lager is. Zoals reeds in paragraaf 32.2 is vermeld, is dit inderdaad het geval. Uit figuur 3 blijkt het verschil in optreden van de ziekte bij de laagste en de optimale dosering 3 à 4 dagen te bedragen. Dit klopt goed met het boven gevonden verschil van 2 à 3 dagen.

De bepalingen gedaan met de supra-optimale dosis zijn onvoldoende om het verloop van SN met zekerheid vast te stellen. Verwacht mag worden dat ook hier het uitbreidingsvermogen een zekere waarde niet kan overschrijden. Aangezien per definitie de verwelking bij de optimale dosis op hetzelfde tijdstip optreedt als bij elke dosering daarboven, kan worden verwacht dat SN op dit tijdstip (11e dag en later) bij de supra-optimale dosis ongeveer gelijk zal zijn aan SN bij de optimale dosis. De gevonden waarden van SN bij de supra-optimale dosis die niet verder gaan dan de 7e en 8e dag zijn daarmee niet in strijd.

32.4. Gezond gebleven planten en de ontsnapping aan infectie

Het is denkbaar dat bij zeer lage dosering de curve die de toename in een groep planten weergeeft, op een lager niveau verloopt, doordat een aantal planten volledig aan de infectie ontsnapt. Om na te gaan of hiermede inderdaad rekening moet worden gehouden werden van een groep planten, die met een lage dosering sporen was geïnjecteerd, 15 gezond uitziende planten 80 dagen na inoculatie afzonderlijk onderzocht om na te gaan of in de wortels uitbreiding van de parasiet had plaats gevonden. In 14 van deze planten was de uitbreiding aanzienlijk. In een ander geval werd 56 dagen na inoculatie eenzelfde resultaat verkregen, terwijl dit eveneens in enkele steekproeven tot

uitdrukking kwam. Met een ontsnappen aan de infectie heeft bij de beoordeling van de curven en bij een beschouwen van het ziekteverloop (tabel 3) dus geen rekening te worden gehouden.

32.5. *De invloed van verwonding bij injectie op de uitbreiding van de schimmel*

Een verklaring voor de snellere toename van SN van de 2e tot de 5e dag vergeleken met de periode erna zou kunnen liggen in de verwonding van de plant door de injectie. Om na te gaan of dit het geval is werd in twee proeven op de 4e dag na inoculatie water in de wortel geïnjecteerd. Zoals uit fig. 8 blijkt werd geen groeibevorderend effect na de 2e verwonding geconstateerd, integendeel de toename van SN was minder sterk vergeleken met de controle (geen injectie met water).

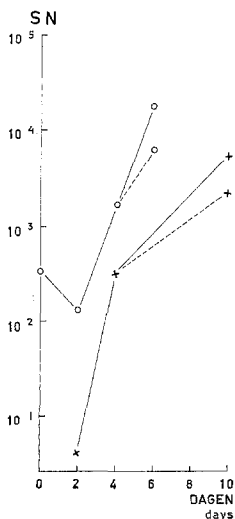


FIG. 8.

Invloed van injectie van water op de 4de dag na inoculatie op het schimmelniveau (SN) in wortels van vatbare planten.

The influence of an injection of water on the 4th day after inoculation on the amount of fungus (SN) in susceptible plants.

..... injectie met water/injection of water
 ————— onbehandeld/untreated

32.6. DE TOENAME VAN SN IN DE WORTEL VAN PLANTEN VAN EEN RESISTENTE SELECTIE

32.61. *Inleiding*

Evenals bij planten van het vatbare ras Neven, werd bij planten van de resistente selectie 147 nagegaan hoe sterk de schimmel zich na injectie in de wortel uitbreidt.

32.62. *De toename van SN in resistente planten vóór de bloei*

De planten werden na injectie op verschillende tijdstippen onderzocht. In een achttal proeven werd een dosis ingespoten, die dicht lag bij de optimale dosis voor vatbare planten. In een zestal proeven werd een zeer hoge dosis en in 2 proeven een zeer lage dosis toegediend. In figuur 9 worden van de drie genoemde doseringen alleen die proeven vermeld, waarbij van 0 tot 15 dagen na injectie 3 keer of vaker een monster van 25 planten werd geanalyseerd.

Bij de resistente selectie was het aantal bepalingen van SN na 2 en 3 dagen te gering om te kunnen constateren of een daling optrad zoals bij het vatbare ras was waargenomen. Twee proeven zouden op een daling wijzen en het is niet in te zien waarom het resistente ras zich anders zou gedragen dan het vatbare. Bij een inoculatie-niveau van 250–750 neemt SN toe tot de 10e à 14e dag, daarna treedt een daling in, zodat het niveau na 28 dagen lager komt te liggen dan op de 14e dag (figuur 9).

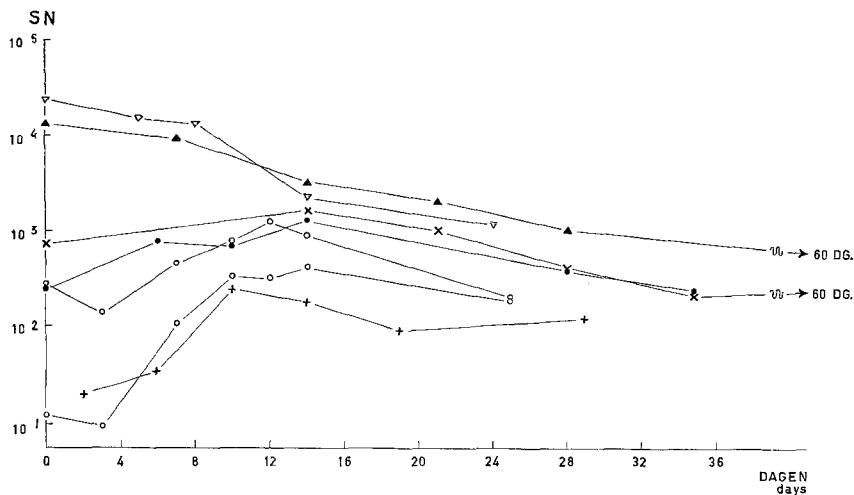


FIG. 9. Verloop van SN in wortels van resistente planten bij een laag, een optimaal en een supra-optimaal inoculatie-niveau tot 60 dagen na inoculatie (6 proeven, —○—○— zijn 2 objecten uit 1 proef).

The course of the fungus level (SN) in roots of resistant plants at a low, an optimal and a supra-optimal inoculation level until 60 days after inoculation (6 experiments, —○—○— are 2 treatments in 1 experiment).

Bij de lage dosering is de vermeerderingsfactor tussen de 3e en de 10e dag vrij groot, maar lager dan in vatbare planten. Bij de dosering tussen 250 en 750 is het verloop eveneens vlakker dan bij vatbare planten.

Over de oorzaak van het verloop van de toename van SN is weinig met zekerheid te zeggen. Uit de daling van SN na 14 dagen valt op te maken, dat een resistentie mechanisme het mycelium (plus conidien) langzaam doet afsterven. Men krijgt de indruk dat dit mechanisme sterker wordt wanneer de schimmel voldoende lang een bepaalde prikkel op de plant heeft uitgeoefend. Dit zou erop wijzen, dat het mechanisme actief is (= Abwehrreaktion volgens GÄUMANN, 1945). Het lijkt onwaarschijnlijk dat de verwonding en de ten gevolge daarvan gedode cellen een uitsluitend saprofytische ontwikkeling mogelijk maken. De periode van 14 dagen is daarvoor te lang. Ook zou men dan dezelfde reactie in het hypocotyle stengeldeel verwachten, hetgeen niet het geval is (figuur 13, paragraaf 34.4).

De daling van SN komt na 28-35 dagen tot stilstand. Er blijft dan in de plant nog een geringe hoeveelheid schimmel over. In een proef waarbij 2 doseringen zijn toegepast ligt na 14 dagen de laagste dosering op een lager ni-

veau (fig. 9). Na inoculatie door dompelen van de wortels in sporensuspensie is de top na 14 dagen in het geheel niet gevonden. Het instellen van een evenwicht heeft hier blijkbaar heel geleidelijk plaats.

32.63. De toename van SN in resistente planten na de bloei

SN blijft ongeveer constant tot aan de bloei, waarna een sterke stijging optreedt. Deze toename blijkt zelfs te kunnen leiden tot verdorren van oudere bladeren tijdens de rijping van het zaad. Klaarblijkelijk zijn fysiologische veranderingen die omstreeks de bloei optreden verantwoordelijk voor de geleidelijke opheffing van het resistentie mechanisme.

Omdat het in kasproeven, waarbij de planten werden geïnoculeerd door dompelen in een sporensuspensie, niet gelukte de toe- en afname van SN in de eerste 28 dagen aan te tonen, werd nagegaan of bij deze meer natuurlijke wijze van inoculeren de toename na de bloei wel valt waar te nemen. Dit is inderdaad het geval (figuur 10). Deze resultaten zijn volkomen in overeenstemming met die van de veldproeven, waarbij bleek, dat in augustus het schimmelniveau sterk toeneemt.

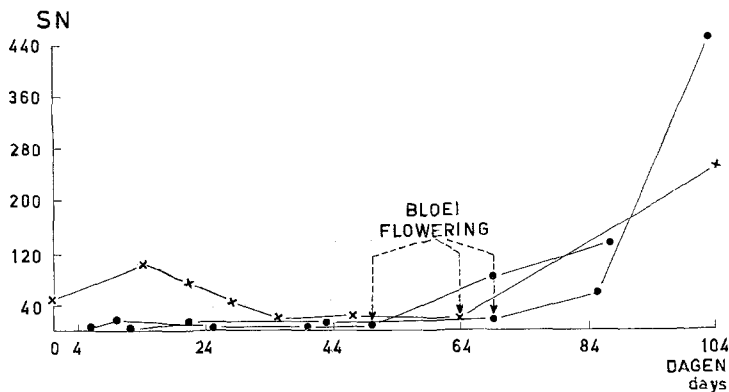


FIG. 10. Verloop van SN in wortels van resistente planten tot na de bloei.

- = inoculatie door dompelen van de wortels in een sporensuspensie
- x—x = inoculatie door injectie van een sporensuspensie

The course of the fungus level (SN) in roots of resistant plants till after flowering.

- = inoculation by dipping roots in a spore suspension.
- x—x = inoculation by injection of a spore suspension.

32.64. De afname van SN bij resistente planten na injectie van een supra-optimale dosis

Het is denkbaar, dat de resistente plant wel ziek zal worden als in de wortel een zeer grote hoeveelheid *Fusarium* aanwezig is. Na injectie van een zeer groot aantal sporen in de wortel (14.000) was echter geen reactie van de plant waarneembaar. Evenmin werd een stijging van SN geconstateerd, doch slechts een regelmatige daling tot na 56 dagen een SN van omstreeks 300 per plant was bereikt (figuur 9).

32.7. *Samenvatting en bespreking*

Bij proeven in de kas onder vrij constante omstandigheden van licht en temperatuur, bleek de variatie van het materiaal veel geringer dan bij planten afkomstig van het veld. De resultaten waren dan ook goed reproduceerbaar.

De optimale dosis, d.i. de laagste dosis waarbij juist het maximale effect (het snelste ziekteverloop) wordt verkregen, is bij injectie omstreeks 1000 sporen per plant. Bij injectie van de wortel van vatbare planten met een bijna optimale en een $10\times$ lagere dosis neemt het schimmelniveau (SN) bepaald met de mixertechniek gedurende de eerste 2 dagen af, daarna toe. Bij de lage dosering is de daarop volgende toename van de 2e tot de 5e dag sterker dan bij de bijna optimale. Na de 5e dag is bij beide de toename per dag gelijk (fig. 7), zodat de lijnen die de toename weergeven evenwijdig lopen. De weinige proeven met een supra-optimale dosis maken waarschijnlijk dat SN afneemt. Omstreeks het tijdstip dat de planten gaan verwelken (11e en 12e dag) is SN vermoedelijk ongeveer gelijk aan SN bij de optimale dosis.

Bij een laag inoculumniveau vertoont een aantal planten geen symptomen. Deze planten zijn niet aan infectie ontsnapt daar omstreeks 60-80 dagen na de inoculatie in meer dan 90% van de overgebleven planten een uitbreiding van de schimmel werd waargenomen.

Bij injectie van de wortel van resistente planten met een bijna optimale en lagere dosis werden te weinig bepalingen gedaan op de 2e dag, het is niet bekend of ook hier aanvankelijk een daling van SN optreedt. Gedurende de eerste 14 dagen heeft een langzame toename van SN plaats, daarna tot ongeveer de 28e dag een langzame daling. Hierna blijft het niveau ongeveer tot de 60e dag constant. Met een supra-optimale dosis treedt direct van het begin af een daling op, die tot ongeveer de 60e dag aanhoudt en waarbij SN uiteindelijk ongeveer even hoog ligt als bij de andere doses. Bij alle doseringen treedt na de bloei (na de 60e dag) een duidelijke toename van SN op, hetwelk in overeenstemming is met resultaten van de veldproeven. Verwelking werd ook bij de supra-optimale dosis niet waargenomen.

Over het verloop van SN na injectie met verschillende doseringen bij vatbare en resistente planten kan nog het volgende gezegd worden. De regelmatige toename van SN bij de optimale dosis vanaf de 2e dag en bij de lagere dosis vanaf de 5e dag, die in beide gevallen ongeveer gelijk is (vermeerderingsfactor tussen 1,5 en 1,9) wijst erop dat dit de „normale” uitbreiding voorstelt in de wortel van de vatbare plant. Waarom SN op de 2e dag lager ligt en bij de lage dosis van de 2e tot de 5e dag sneller toeneemt dan „normaal” is nog niet duidelijk. Enkele mogelijkheden voor verklaring worden in de tekst gegeven. Evenmin is met zekerheid iets te zeggen over het verloop van SN bij resistente planten. Wel is duidelijk dat in deze planten vanaf het begin een resistentie mechanisme werkzaam is, aangezien SN aanvankelijk veel langzamer toeneemt dan in vatbare planten. Waarom dit resistentie mechanisme na 14 dagen zich sterker manifesteert, waarbij SN langzaam gaat afnemen is nog een vraag, evenals ook de reden van het constant blijven van SN op een lage waarde tussen de 30e en 60e dag.

Dat na de bloei een sterke toename van SN optreedt moet aan een fysiologische verandering tijdens de bloei worden toegeschreven, waarbij het ouder wordende weefsel een remmende factor verliest.

33. HET VERBAND TUSSEN DE HOEEVEELHEID *Fusarium* EN DE VERWELKING DER PLANTEN

33.1. Inleiding

In recente artikelen hebben DIMOND (1955) en LUDWIG (1960) een samenvatting gegeven van de onderzoeken betreffende de oorzaak van de verwelking. Veel onderzoek had betrekking op de toxische werking van filtraten verkregen van vloeistofculturen. Van een aantal gevonden stoffen is niet bekend of zij in de levende plant voorkomen, maar men kent 2 stoffen die geen enzymen zijn, welke door *Fusarium* in de plant worden gevormd en men weet iets van de werking. De eerste is het Fusarinezuur dat in de levende plant is aangetoond door LAKSHMINARAYANAN en SUBRAMANIAN (1955) en door KALYANSUNDARAM en VENKATA RAM (1956). Zij analyseerden plantenextracten papierchromatografisch. KERN en KLEUPPEL (1956) stelden de vorming vast door het gebruik van isotopen. Een tweede toxine, dat in de zieke plant werd aangetoond was ethyleen (DIMOND en WAGGONER, 1953b).

Daarnaast wordt in vele publikaties de aandacht gevestigd op visceuse substanties, die in de vaten voorkomen, soms bij aanwezigheid van de schimmel, vaak zonder dat *Fusarium* wordt waargenomen. Reeds SCHIKORRA (1906) heeft over de aanwezigheid van dergelijke producten in de vaten van erwtenplanten geschreven. Daarna nam BEWLEY (1922) een bruine substantie waar, die naar hij op grond van proeven met cultuurfiltraten veronderstelde het product van exo-enzymen is. Aan de aanwezigheid van deze producten die min of meer granulair kunnen zijn, maar toch ook een gomachtig karakter hebben, is de laatste jaren veel aandacht besteed. Men beschouwt deze als een belangrijke oorzaak voor het ontstaan van verwelkingssymptomen (LUDWIG, 1952; GOTHOSKAR, SCHEFFER, WALKER en STAHMANN, 1953; WINSTEAD en WALKER, 1954; PIERSON, GOTHOSKAR, WALKER en STAHMANN, 1955; WAGGONER en DIMOND, 1955). De producten zouden ontstaan door de werking van pectine splitsende enzymen. Inderdaad toonden WAGGONER en DIMOND (1955) aan, dat in sap van zieke tomatenplanten een grotere pectinemethylesterase activiteit voorkomt dan in gezonde planten. Er is echter nog niet aangetoond, dat de waargenomen granulaire substantie ontstaat door de werking van pectinasen.

Ondanks dit uitgebreide onderzoek over de fysiologische invloed van producten van de schimmel op de plant, heeft men nog geen verschil gevonden tussen de reactie van planten van vatbare resp. resistente rassen. Op filtraten, waarin zich enzymen of andere toxische stoffen bevinden reageren vatbare en resistente planten dus gelijk. Dit doet GÄUMANN (1957) veronderstellen, dat er geen sprake is van resistentie tegen toxinen, maar dat resistentie eerder te maken heeft met de geringe uitbreidingsmogelijkheid, die de schimmel in resistente planten heeft. SCHROEDER en WALKER (1942) en SNYDER et. al. (1946) vermeldten dat tot het tijdstip der verwelking de hoeveelheid mycelium toeneemt, hetgeen er eveneens op wijst, dat er een verband bestaat tussen de ziektesymptomen en de hoeveelheid mycelium.

In voorgaande paragrafen is bij de bespreking van de proeven over de uitbreiding in de wortel van vatbare planten naar voren gekomen, dat na het bereiken van een bepaald SN de planten verwelken, en tevens dat een verband zou kunnen bestaan tussen de grootte der planten en het schimmelniveau dat

wordt verdragen (32.34.). In de volgende paragraaf worden gegevens vermeld over de hoeveelheid schimmel in verwelkende planten en de relatie hiervan met de grootte der planten.

33.2. *Het Fusarium-niveau in verwelkende planten van verschillende grootte*

In een aantal plantjes, die de eerste ziektesymptomen vertoonden, is het *Fusarium*-niveau bepaald met behulp van de mixertechniek. De inoculatie had plaats door dompelen van de wortels in een sporensuspensie of door injectie. Telkens wanneer een plantje symptomen ging vertonen werd SN bepaald van wortel en stengel gezamenlijk (zonder bladeren). De planten werden niet allen tegelijk ziek, zodat de bepaling zich over meerdere dagen uitstrekte. De resultaten van een proef, waarin de inoculatie plaats had door inspuiten van een sporensuspensie wordt in tabel 12 (proef 1) gegeven. Hierbij werden planten van 2 weken en 4 weken oud, die aanmerkelijk in grootte verschilden, met elkaar vergeleken. De conclusie uit deze proef is, dat bij grotere planten een hoger SN nodig is om de eerste symptomen te veroorzaken. In een volgende proef (proef 2, tabel 12) werden planten van verschillende grootte geïnoculeerd door dompelen van de wortels in een sporensuspensie. De leeftijd liep zeer sterk uiteen, deze was namelijk 2 en 12 weken, hetgeen duidelijk tot uiting komt in het gemiddeld gewicht van de planten op het tijdstip van de bepaling van het *Fusarium*-niveau. Opnieuw blijkt een verband te bestaan tussen SN en de grootte der planten. Uit de relatief lage waarde van de standaard afwijking van het gemiddelde blijkt, dat de planten die juist de eerste verwelkingssymptomen vertonen, maar op verschillende dagen zijn verzameld, onderling meer overeenkomst vertonen in de hoogte van SN dan planten, die „at random” op één dag zijn verzameld (tabel 5). Dit wijst ook op een verband tussen verwelking en SN.

In een derde proef waarbij planten van verschillende leeftijd met gelijke dosis werden geïnjecteerd werden de reeds besproken resultaten bevestigd (proef 3, tabel 12). Hierbij kon worden geconstateerd, dat planten die tot 14 dagen na injectie verwelken een lager SN hebben dan planten die later verwelken. Dit kan in verband worden gebracht met een sterke groei gedurende de proef. Na 49 dagen werd van 8 planten zonder symptomen SN bepaald. Dit was gemiddeld 252, dus veel lager dan in zieke planten. Uit andere experimenten bleek hetzelfde. Zo was in een geval het gemiddelde bij verwelkende planten 6321 ($n = 11$, stand. afw. 16%), bij nog gezond uitziende planten 722 ($n = 9$, stand. afw. 41%).

Om een duidelijker beeld te krijgen van het verschil tussen het *Fusarium*-niveau in planten met de eerste symptomen en gezond uitziende planten werd op drie verschillende tijdstippen SN bepaald. De planten waren geïnoculeerd door dompelen van de wortels in suspensie (tabel 13). Het verschil tussen beide groepen van planten is zonder meer duidelijk.

33.3. *Samenvatting en bespreking*

Uit de resultaten van de in het voorgaande besproken proeven kunnen de volgende conclusies worden getrokken.

Bij een oudere (grotere) plant is SN op het tijdstip van verwelking hoger dan bij jongere (kleinere) planten. Verwelkingssymptomen treden op wanneer

TABEL 12. Hoeveelheid *Fusarium* in planten van verschillende grootte (leeftijd) met de eerste verwelkingssymptomen. Mixertechniek
TABLE 12. Quantity of *Fusarium* in plants of different size (age) with the first wilting symptoms, Mixertechnique.

Inoculatiemethode <i>Inoculation method</i>	Proef 1 <i>Experiment 1</i>		Proef 2 <i>Experiment 2</i>		Proef 3 <i>Experiment 3</i>			
	Injectie wortel <i>Root injection</i>		Dompelen wortel <i>Dipping root</i>		Injectie wortel <i>Root injection</i>			
Leeftijd bij inoculatie in weken <i>Age at inoculation in weeks</i>	2	4	2	12	4		8	
Aantal dagen na inoculatie, waarop 50 % der planten met beginsymptomen <i>Number of days after inoculation at which 50 % of plants show wilting symptoms</i>	-	-	11	14	14		21	
Aantal dagen tussen inoculatie en bepaling <i>Number of days between inoculation and analysis</i>	10-15	12-16	13-18	13-18	10-14	14-32	10-14	14-32
Aantal planten <i>Number of plants</i>	12	10	11	10	11	10	9	9
Schimmelniveau (SN) <i>Fusarium level (SN)</i>	141.000	462.000	37.900	564.000	40.700	87.500	101.000	172.000
S _x in %	14	14	17	16	7	20	20	29

TABEL 13. Vergelijking van het schimmelniveau in gezond uitzijende en juist verwelkende planten. Mixertechniek.

TABLE 13. *Comparison of Fusarium level (SN) in plants without symptoms and in plants with the first wilting symptoms. Mixertechnique.*

	Geen symptomen/ <i>No symptoms</i>		Eerste verwelkingssymptomen <i>First wilting symptoms</i>	
	S.N.	gewicht gr/plant <i>weight gr/plant</i>	S.N.	gewicht gr/plant <i>weight gr/plant</i>
Monster 1	10.300	3,0	48.000	3,9
Sample 1	15.600	4,9	64.500	3,7
10 oktober	29.600	4,7	94.200	2,9
Monster 2	15.100	5,1	46.400	3,1
Sample 2	30.300	4,4	75.200	3,7
12 oktober	30.300	4,4	140.000	3,8
Monster 3	11.000	5,2	79.600	4,5
Sample 3	11.600	6,4	102.800	4,0
18 oktober	21.100	5,4	203.000	3,9
	45.400	5,2	212.000	4,1

een bepaald schimmelniveau (SN) in de plant is bereikt. Bij een lager SN worden de planten niet ziek.

Er is dus een zekere drempelwaarde, beneden welke geen symptomen optreden. Blijkbaar ondervindt de plant beneden deze drempelwaarde geen of althans geen merkbare hinder van door de schimmel gevormde toxische stoffen of enzymen, de invloed ervan wordt teniet gedaan of in evenwicht gehouden. Zowel bij vatbare planten, die met een zeer lage dosis worden geïnoculeerd, als bij geïnoculeerde resistente planten wordt het verschijnsel van het niet bereiken van de drempel waargenomen. Deze planten zijn dus niet aan de infectie ontsnapt zoals vaak wordt gesteld. Ze zijn met carriers te vergelijken.

34. DE ONTWIKKELING VAN DE SCHIMMEL IN HET HYCOTYLE STENGELDEEL (VAN PLANTEN IN DE KAS)

34.1. Inleiding

De gevoeligheid van stengels voor een *Fusarium* aantasting is veelal langs indirecte weg onderzocht door de reactie van entcombinaties te bestuderen. Slechts bij enkele onderzoeken is de stengel direct geïnoculeerd. KEYWORTH (1953) inoculeerde de stengels van hop met *Verticillium albo-atrum*, HOOD en STEWART (1957) die van *Dianthus* met *Fusarium oxysporum*. In beide gevallen toonden de geïnfecteerde planten symptomen, zodat de stengel niet als inactief medium wordt beschouwd. SCHEFFER en WALKER (1954) lieten tomatetekken sporen opzuigen, waarna zij vaststelden dat zich in de stengels van vatbare planten op normale wijze symptomen ontwikkelden. In deze stengels werd een binnendringen in het gehele xyleemweefsel geconstateerd, terwijl in resistente stekken de aanwezigheid van de schimmel beperkt bleef tot het primaire xyleem aanwezig op het tijdstip van de inocu-

latie. Door middel van het uitleggen van delen der planten concludeerden zij dat de hoeveelheid *Fusarium* in de resistente stengel afneemt.

In het volgende zullen proeven worden besproken, waarin het ziekteverloop na inoculatie in het hypocotyle stengeldeel werd gevolgd, of waarin met behulp van de mixertechniek de toename van SN in hypocotyle stengeldelen van vatbare en resistente planten werd bepaald.

34.2. Het ziekteverloop na infectie van het hypocotyl

Een representatief voorbeeld van het ziekteverloop wordt gegeven in tabel 14. Planten werden geïnjecteerd in het hypocotyl of in de wortel met eenzelfde sporensuspensie. Wanneer planten alleen in het hypocotyl zijn geïnfecteerd, wordt slechts een enkele plant ziek, terwijl bij wortelinfectie het aantal zieke planten regelmatig toeneemt. Dit is in meerdere proeven bevestigd. Het werd daarom van belang geacht de uitbreiding in het hypocotyl te meten.

TABEL 14. Aantal zieke planten na injectie van 6600 conidiën in het hypocotyl of in de wortel van Neven.

TABLE 14. *Number of diseased plants after injection of 6600 conidia into hypocotyl or root of Neven (susceptible).*

Aantal planten <i>Number of plants</i>	Aantal dagen na inoculatie <i>Number of days after inoculation</i>	0	9	17	24	30	37	42
25	Injectie in hypocotyl <i>Injection in hypocotyl</i>	0	0	1	1	1	2	2
25	Injectie in wortel <i>Injection in root</i>	0	7	10	13	15	22	23

34.3. De toename van SN na infectie van vatbare planten

In enkele oriënterende proeven werd met behulp van de mixertechniek de toename van SN bepaald na 6-8 dagen of na 14 dagen, voor monsters die in totaal 20-50 planten bevatten. Om de resultaten gemakkelijker leesbaar te maken, is in tabel 15 de toename uitgedrukt in de vermeerdering gedurende

TABEL 15. Toename schimmelniveau (uitgedrukt in inoculativeniveau) bij Neven in verschillende proeven. Mixertechniek.

TABLE 15. *Increase of fungus level (expressed in level of inoculation) in Neven (susceptible) in different experiments. Mixertechnique.*

	Aantal planten <i>Number of plants</i>	Inoculum niveau <i>Inoculum level</i>	Niveau na 6-8 dagen <i>Level after 6-8 days</i>	Niveau na 14 dagen <i>Level after 14 days</i>
Hypocotyl	50	39		27 ×
Hypocotyl	25	66	7 ×	
	50	19	3 ×	
Wortel	25	48	12 ×	
Root	25	35	17 ×	
	25	25	11 ×	
	20	27	8 ×	

de betreffende periode. De toename schijnt de eerste 6-8 dagen in het hypocotyl minder te zijn dan in de wortel.

Meer gedetailleerde gegevens zijn verkregen door planten op verschillende tijdstippen na injectie te analyseren. In figuur 11 zijn de gegevens vermeld van 3 proeven. Hieruit krijgt men de indruk dat het verloop van SN anders is dan bij de wortelinjectie (figuur 7). De groei van het mycelium wordt geremd en klaarblijkelijk wordt niet het niveau bereikt, waarbij verwelking optreedt (men denke ook aan de groei van de plant).

34.4. De toename van SN na infectie van resistente planten

In het hypocotyl van een resistente selectie is de uitbreidingsmogelijkheid voor de schimmel geringer dan in vatbare planten. Dit blijkt bij een vergelijking van de tabellen 15 en 16, vooral na 14 dagen is het verschil duidelijk.

TABEL 16. Toename schimmelniveau (uitgedrukt in inoculatie-niveau) bij R 147 in verschillende proeven. Mixertechniek.

TABLE 16. Increase in fungus level (expressed in level of inoculation) in R 147 (resistant) in different experiments. Mixertechnique.

	Aantal planten <i>Number of plants</i>	Inoculum niveau <i>Inoculum level</i>	Niveau na 6-8 dagen <i>Level after 6-8 days</i>	Niveau na 14 dagen <i>Level after 14 days</i>
Hypocotyl	25	39		6 ×
Hypocotyl	25	62		2 ×
	25	66	2 ×	
Wortel	20	27	2 ×	
Root	25	47	3 ×	

In enkele proeven is ook bij de resistente planten de uitbreiding in het hypocotyl nagegaan door op verschillende tijdstippen een monster planten te malen (figuur 11). De uitbreiding was de eerste dagen vrij sterk en kwam tussen 10 en 16 dagen tot stilstand, daarna trad een ongeveer stationaire toestand in. Een afname zoals in de wortel van een resistente plant optreedt, werd niet gevonden. Het verloop van de lijnen die de toename van SN weergeven is voor vatbare en resistente planten na de 8e dag verschillend.

34.5. De toename van SN in vatbare planten na binnendringen vanuit de wortel

In figuur 11 is de toename van SN weergegeven, nadat sporen in het hypocotyl waren gebracht. Hierbij is de schimmel niet in de wortel aanwezig. In een aantal andere proeven werden planten in de wortel geïnfecteerd en werden vervolgens op verschillende tijdstippen wortel en hypocotyl afzonderlijk onderzocht tot in de meeste proeven het optreden van ziektesymptomen een verdere bepaling onmogelijk maakte. Op een bepaald tijdstip werd voor het eerst een zekere hoeveelheid schimmel in het hypocotyl vastgesteld, dit is in figuur 12 het eerste punt van iedere lijn die het verband tussen de toename van SN en de tijd weergeeft. De aldus verkregen lijnen tonen in 6 proeven een steilere helling dan in figuur 11. Dit betekent dat de schimmel zich sterker

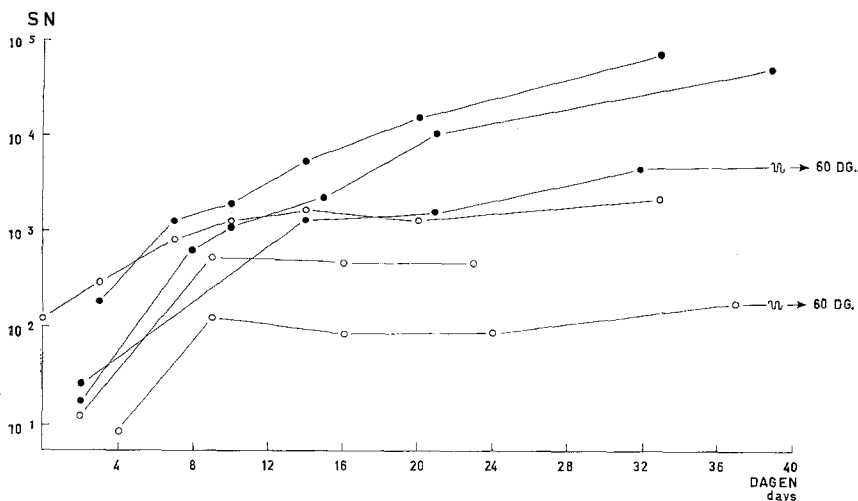


FIG. 11. Verloop van SN in het hypocotyl na injectie van een sporensuspensie in het hypocotyl (3 proeven).

○—○ = vatbare planten
●—● = resistente planten

The course of the fungus level (SN) in the hypocotyl after injection of a spore suspension into the hypocotyl (3 experiments).

○—○ = susceptible plants
●—● = resistant plants

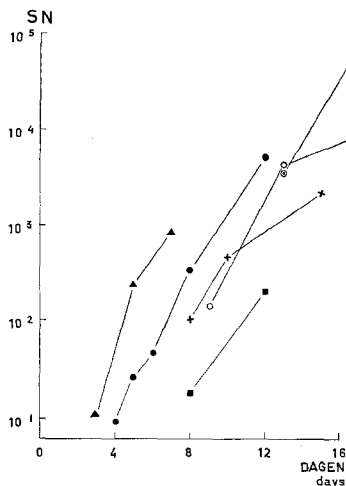


FIG. 12.

Verloop van SN in het hypocotyl van vatbare planten na inoculatie van de wortel (5 proeven).

The course of the fungus level (SN) in the hypocotyl of susceptible plants after inoculation of the roots (5 experiments).

uitbreidt in het hypocotyl wanneer deze vanuit de wortel hierin kwam binnengroeien. Hiervoor zijn de volgende verklaringen te geven:

1. Vanuit de wortel wordt door het mycelium voedsel vervoerd naar de in het hypocotyl groeiende schimmeldraden.

2. Het weefsel van de stengel wordt gemakkelijker aantastbaar doordat

stoffen die door de schimmel in de wortel zijn gevormd, naar de stengel worden getransporteerd.

3. De wortel van een vatbare plant vormt het substraat waarop de schimmel een bepaalde stofwisseling ontwikkelt. Wanneer de schimmel daarna het hypocotyl binnengroeit wordt door de op gang gekomen processen een sterker groei mogelijk gemaakt dan wanneer de schimmel direct in het hypocotyl wordt gebracht.

Om over punt 2 iets te weten te komen, werden enkele oriënterende proeven uitgevoerd, waarbij de wortel werd geïnfecteerd en vervolgens enkele dagen later het hypocotyl.

De uitbreiding van *Fusarium* in het hypocotyl zou reeds de eerste dagen, zolang de schimmel nog niet uit de wortel in het hypocotyl is binnengedrongen, sterker kunnen zijn, dan bij het ontbreken van *Fusarium* in de wortel. Enige invloed op de groei in het hypocotyl werd op deze wijze echter niet waargenomen. Een eventuele resistentie verlagende factor is op deze wijze niet aan te tonen.

In 35.6. wordt nader op andere mogelijkheden teruggekomen.

34.6. *Samenvatting en bespreking*

Op grond van het ziekteverloop bij vatbare planten na injectie van het hypocotyle stengeldeel, kan worden geconcludeerd dat dit deel resistentie tegen *Fusarium oxysporum* bezit. Dit werd bevestigd door de toename van SN in het hypocotyl te meten. Deze verloopt veel langzamer dan in de wortel en bereikt blijkbaar slechts in een enkel geval een zo hoge waarde, dat symptomen optreden. De toename van SN in het hypocotyl van resistente planten verschilt in het begin niet veel van die van vatbare planten. Na de 8e dag blijft SN evenwel vrijwel op dezelfde hoogte, terwijl de schimmel zich in vatbare planten nog langzaam blijft uitbreiden.

Opmerkelijk is de waarneming dat de toename van SN met heel andere snelheid verloopt, wanneer de schimmel vanuit de wortel het hypocotyl binnengroeit.

35. DE BETEKENIS VAN DE WORTEL VOOR DE ONTWIKKELING DER ZIEKTESYMPTOMEN

35.1. *Inleiding*

In het hypocotyl van de vatbare plant bleek de toename van SN sterker als de schimmel vanuit de wortel naar binnen is gegroeid (34.5.). In verband met deze waarneming werd rekening gehouden met de mogelijkheid dat een eventuele resistentie verlagende stof van de wortel naar de stengel wordt getransporteerd. Over een dergelijk verondersteld transport hebben verschillende onderzoekers al eerder conclusies geformuleerd, deze waren uitsluitend gebaseerd op het ziekteverloop in entcombinaties.

MAY (1930) maakte combinaties van een vatbaar en een resistent tomateras. Daartoe werd in stengels van 2 planten een aan elkaar tegenovergestelde inkeping gemaakt, waarna de planten in elkaar werden gehaakt (Plaat II, fig. 1). Na vergroeiing werd van de ene plant de wortel, van de andere de stengel afgesneden. De verschillende entcombinaties worden gemakshalve op de volgende wijze aangeduid:

$V./_R$ = vatbare stengel en resistente wortel.

$R./_V$ = resistente stengel en vatbare wortel.

$V./_V$ = vatbare stengel en vatbare wortel.

$R./_R$ = resistente stengel en resistente wortel.

MAY constateerde, dat stengels van vatbare tomateplanten op resistente onderstammen ($V./_R$) niet ziek werden wanneer ze in besmette grond waren uitgeplant. De combinatie $V./_V$ verwelkte onder deze omstandigheden wel. Op dezelfde wijze hebben ook andere onderzoekers gewerkt met tomaten en *Fusarium oxysporum* of met hop en *Verticillium albo-atrum* (HEINZE en ANDRUS, 1945; KEYWORTH, 1953; TALBOYS en WILSON, 1956). Zij constateerden dat de combinatie $R./_V$ ziek wordt na inoculatie, maar dat de reciproke enting $V./_R$ gezond blijft.

Het is ook mogelijk de vergroeide vatbare en resistente planten intact te laten en daarbij alleen de wortels van de vatbare planten te infecteren (VR/VR). MAY constateerde dat de stengels van resistente planten dan ziek werden, al was het op een later tijdstip. Hij trok hieruit de conclusie, dat de oorzaak van de resistentie vanuit de wortels niet kon worden getransporteerd, dan wel zijn eigenschappen verliest in de stengel. Deze resultaten werden door TALBOYS (1956) bevestigd.

Om de invloed van de onderstam op de ent te bestuderen kan ook nog een andere methode worden gevolgd. De enten laat men boven de entplaats adventiefwortels vormen. Na inoculatie van deze adventiefwortels zou een eventuele invloed van de onderstam merkbaar kunnen zijn (HEINZE en ANDRUS, 1945; TALBOYS en WILSON, 1956). Deze onderzoekers namen waar, dat bij de combinatie $V./_R$ de enten via de adventiefwortels ziek werden, terwijl deze bij de combinatie $R./_V$ gezond bleven. Op grond van deze resultaten kwamen zij eveneens tot de conclusie dat geen transporteerbare resistentie verhogende of verlagende stoffen in de wortels aantoonbaar zijn. Om nadere informatie te verkrijgen over de vatbaarheid van de stengel lieten SCHEFFER en WALKER (1954) door tomatestekken sporen uit een sporensuspensie opzuigen. Vervolgens lieten zij de stekken bewortelen en plantten ze daarna uit. Ziektesymptomen kwamen daarna zowel in de vatbare als in resistente planten voor. De resistente planten herstelden zich echter, de vatbare planten niet. Hieruit blijkt dat de vatbaarheid van de stengel bij resistente en vatbare planten verschilt. Later paste SCHEFFER (1957) een andere methode toe. Het stengelstuk van de ent, dat overblijft na het afsnijden van de eigen wortel werd in een sporensuspensie gedompeld. Na enige tijd werden de enten van vatbare tomateplanten ziek, zowel bij de combinatie $V./_R$ als $V./_V$. Enten van de combinaties $R./_V$ en $R./_R$ bleven gezond. Hiermede wordt nog eens een verschil in vatbaarheid van de stengel gedemonstreerd en blijkt tevens dat de wortel geen invloed heeft op de reactie van de stengel.

BERRY en THOMAS (1961) vonden dat ook bij *Mentha piperita* stengels van vatbare rassen en van resistente selecties uit kruisingen tussen *M. piperita* en *M. crispa* een verschillende resistentie ten opzichte van *Verticillium albo-atrum* hebben.

Bij hop is de plant-parasiet verhouding ten opzichte van *Verticillium albo-atrum* anders dan bij de hiervoor besproken gevallen (KEYWORTH, 1953). Alleen wanneer deze schimmel via de wortel de stengel binnenkomt, is verschil in

reactie tussen een vatbaar en een resistent ras te constateren. Wordt de schimmel door directe inoculatie van de stengel in de plant gebracht, dan is geen verschil in reactie waarneembaar. Hieruit volgt dat in dit geval de wortel van primaire betekenis is en dat de reactie van de stengel verband houdt met in de wortel aanwezige factoren.

Om na te gaan hoe de lupine zich ten opzichte van *Fusarium oxysporum* gedraagt zijn in het eigen onderzoek eveneens entcombinaties gemaakt. Daarbij is niet alleen getracht de door andere onderzoekers beschreven resultaten die uitsluitend zijn gebaseerd op het ziekteverloop, te reproduceren, maar is bovendien met behulp van de mixertechniek nagegaan hoeveel *Fusarium* in deze entcombinaties voorkwam om daarmee gegevens over de betekenis van wortel en stengel voor het ziekteverloop te verkrijgen. Verder is nog op andere manieren de betekenis van de infectie van de wortel onderzocht.

35.2. Infectie van de wortel van entcombinaties

Indien de combinaties $V./R$ en $R./R$, geënt volgens de methode van MAY, werden geïnoculeerd door dompelen van de wortels in sporensuspensie, werden de planten niet ziek. In een enkel geval werd de vatbare ent ziek, maar daarbij bleek steeds dat deze adventiefwortels had gevormd.

Inoculatie van de wortel der combinaties $V./V$ en $R./V$ had steeds ziekte der planten tot gevolg, waarbij kan worden opgemerkt, dat de combinatie $R./V$ soms iets later ziek werd. Deze resultaten bevestigen de gegevens over de reactie van andere gewassen dus geheel.

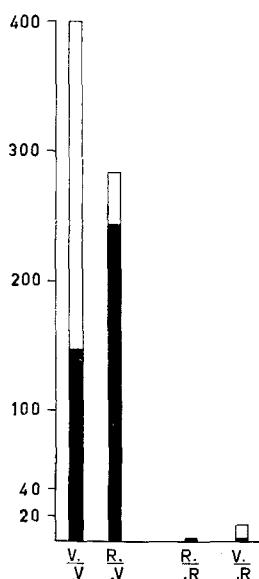
Er werd nagegaan of de ent enige invloed heeft op de toename van SN in de wortel. Entcombinaties werden in de wortel geïnoculeerd door injectie van een sporensuspensie en 17 dagen later onderzocht door middel van de mixertechniek, onderstammen en enten afzonderlijk (figuur 13). Ieder object bestond uit

FIG. 13.
Schimmelniveau (SN) in het hypocotyl en wortel van entcombinaties, 16 dagen na injectie van een sporensuspensie in de wortel (gemiddelde van 26 planten).

The amount of fungus (SN) in hypocotyl and root of grafts, 16 days after injection of a spore suspension into the roots (average of 26 plants).

■ = wortel / root

□ = hypocotyl / hypocotyl



twee groepen van 12 planten. Een remmende invloed van de resistente ent op de uitbreiding in de vatbare onderstam is niet waarneembaar, eerder krijgt men de indruk, dat de uitbreiding in de vatbare onderstam in dit geval sterker is. Van de vatbare ent kon evenmin een invloed op de schimmel in de resistente onderstam worden vastgesteld. Over de uitbreiding van de schimmel in het hypocotyl van deze entcombinaties valt het volgende op te merken. In de resistente ent op de geïnfecteerde vatbare wortel ($R \cdot V$) is SN lager dan in de vatbare ent ($V \cdot V$). De vatbare wortel bewerkstelligt dus niet dat de toename in het hypocotyl van een resistente plant gelijk wordt aan de toename in het hypocotyl van een vatbare plant. Tussen de enten van de combinaties $V \cdot R$ en $R \cdot R$ is eveneens verschil in SN te constateren. In de vatbare ent is SN hoger dan in de resistente ent. De toename van SN in de vatbare ent is minder bij de combinatie $V \cdot R$ dan bij $V \cdot V$, hetgeen met een verschillend SN in de wortels te maken kan hebben.

In twee andere proeven werden de hier vermelde resultaten bevestigd.

35.3. Infectie van uitsluitend het hypocotyl bij entcombinaties

In paragraaf 34.3. is gebleken dat na injectie van een sporensuspensie in het hypocotyl de schimmel zich bij een vatbare plant in dit hypocotyl sterker uitbreidt dan in een resistente. Uit de besproken wortelinoculaties bij entcombinaties kwam eveneens naar voren, dat de uitbreiding in hypocotylen van de $V \cdot V$ en $R \cdot V$ van een heel verschillende orde is.

TABEL 17. Schimmelniveau (SN) na injectie van sporen in het hypocotyl bij verschillende entcombinaties. Mixertechniek.

TABLE 17. *Fungus level (SN) after injection of spores into the hypocotyl of different grafts. Mixertechnique.*

Object	Entcombinaties <i>Graftings</i>	Proef 1 / <i>Experiment 1</i>	Proef 2 / <i>Experiment 2</i>
		SN na 7 dagen <i>SN after 7 days</i> 20 pl/treatment	SN na 16 dagen <i>SN after 16 days</i> 12 pl/treatment
1	$V \cdot V$	2.000	45.400
2	$R \cdot V$	810	230
3	$V \cdot R$	—	57.900
4	$R \cdot R$	1.100	—
5	$V^1)$	—	63.000
6	$R^1)$	—	560

¹⁾ Niet geënt, *not grafted*.

In deze paragraaf wordt besproken hoe sterk SN toeneemt nadat alleen het hypocotyl van entcombinaties was geïnjecteerd met een sporensuspensie. Tabel 17 geeft het resultaat van 2 proeven. Uit de vergelijking van de objecten 1 en 2 in beide proeven volgt ook hier dat de uitbreiding in het resistente hypocotyl veel geringer is. Tevens blijkt bij vergelijking van de objecten 2 en 4 van de eerste proef en van 1 en 3 van de tweede dat de onderstam geen invloed heeft op de uitbreiding in het hypocotyl, zowel bij een R- als V-onderstam is de uitbreiding in een V-ent sterker en in een R-ent gering. De volgende conclusies worden met deze proef bevestigd.

1. De uitbreiding in R- en V-enten is van geheel verschillende orde (zie 35.2.).
2. De ontwikkeling in de wortel is in de vorige paragraaf oorzaak van de ongelijke hoeveelheid mycelium in V-enten op V- en R-onderstammen (zie figuur 13).
3. Reeds eerder bleek dat een geïnfecteerde onderstam geen invloed heeft op de uitbreiding van de schimmel in de ent (zie 34.5). Nu blijkt dat ook een niet geïnfecteerde onderstam geen invloed heeft op de toename van SN in de ent, hetgeen inhoudt dat geen vatbaarheid verhogende of verlagende stoffen van daaruit worden getransporteerd.

35.4. *Proeven met tweelingenten van vatbare en resistente planten*

In een serie proeven werden de hypocotylen en wortels van de entcombinaties niet afgesneden (R^V/R^V). Van deze tweelingenten kan de ene wortel worden geïnfecteerd en daarna op de reactie van het hypocotyl op de andere wortel worden gelet. Dit is in vier proeven uitgevoerd met in totaal omstreeks 100 planten voor ieder object.

Als de wortel van de vatbare plant wordt geïnfecteerd toont niet alleen een groot aantal vatbare planten na de incubatietijd verwelkingssymptomen, ook een groot deel van de resistente planten, die met deze vatbare planten zijn vergroeid vertonen deze symptomen.

Zoals in de inleiding van deze paragraaf werd vermeld, is dit eveneens door MAY en TALBOYS gevonden. Het is ten dele te vergelijken met de reactie van de combinatie $R^{\cdot}/V$, waarbij de resistente ent symptomen geeft. In dat geval kan echter worden aangevoerd dat een slechte conditie van de geïnfecteerde vatbare wortel de ent doet verwelken. Bij deze tweelingenten kan de verwelking van de resistente ent niet het gevolg zijn van het doodgaan van de vatbare wortel, omdat de resistente wortel in tact is. Dit betekent dat de verwelking van de resistente ent een gevolg moet zijn van het geïnfecteerd zijn van de vatbare wortel.

Bij anatomisch onderzoek van de vergroeiingsplaats van resistente enten bleek, dat op de contactplaats geen xylemvaten, maar alleen het parenchym is vergroeid. Verder bleek uit steekproeven dat de schimmel ook de resistente ent binnengroeit. Hoewel geen kwantitatieve gegevens zijn verkregen, werd toch waargenomen, dat de uitbreiding in de resistente ent niet zo sterk was als in de vatbare.

35.5. *Het transport van sporen naar de stengel*

In andere waardplanten is de aanwezigheid van sporen van *F. oxysporum* herhaaldelijk vastgesteld (SNYDER et al., 1946; KOSWIG, 1955; RISBETH, 1955; BECKMAN et al., 1962). RISBETH spreekt het vermoeden uit, dat bij banaan de waargenomen sporen van weinig betekenis zijn, omdat hij het mycelium nooit discontinu waarnam. Maar BECKMAN et al. kennen wel betekenis toe aan sporen in de vaten van banaan voor de verspreiding van de parasiet in de plant. Dit standpunt wordt door de meeste onderzoekers ook voor andere waardplanten ingenomen zonder dat er bewijzen voor worden gegeven. Sporen zijn herhaaldelijk in de xylemvaten van lupineplanten aangetroffen. De vorming van sporen was in dwars- en lengtedoorsneden van wortel en stengel te zien, terwijl de sporen ook op zodanige plaatsen in de vaten voorkwamen, dat mag worden aangenomen, dat zij door de sapstroom worden meegenomen. Ze liggen soms tegen een tus-

senschot aan, dus naast de doorboring als ballonnen tegen het plafond (Plaat I, fig. 1, 2 en 3).

Een methode om het transport van sporen in de levende plant aan te tonen was de volgende: planten werden gedurende enige dagen op voedingsoplossing geplaatst en vervolgens overgebracht in water waarin microconidiën waren gesuspenderd. Als de stengels 1 dag later boven de vloeistof werden afgesneden konden in het bloedingsvocht de sporen gemakkelijk worden aangetoond door druppels vocht te kleuren als een bacterie preparaat. De identiteit van de sporen kwam wat betreft vorm en afmetingen goed overeen met die van de cultuur in vitro. Hoewel de planten niet werden verwond, moet men aannemen dat kleine wonden aanwezig waren die het binnendringen mogelijk maakten. In het bloedingsvocht van controleplanten werden nooit sporen aangetroffen.

Om iets over de transportsnelheid te weten te komen, werden stengeldelen van planten waarvan de wortels in sporensuspensie waren gedompeld verschillende tijden na het onderdompelen in stukjes verdeeld en op agar uitgelegd. Na 4 uren groeiden slechts enkele kolonies uit de stukjes, na 24 uren groeide op bijna alle stukjes *Fusarium*. Wanneer sporen in de stengels van volwassen planten werden geïnjecteerd, vlak boven de grond, groeide *Fusarium* 24 uren later uit stukjes van de stengeltop, 30 cm boven de injectieplaats.

Hoewel het transport van sporen ook voor lupine is komen vast te staan, moet toch worden betwijfeld of dit voor het ontstaan der symptomen van veel betekenis is. De toename van SN is na injectie van sporen in het hypocotyl immers gering gebleken (par. 34.3), terwijl dit eveneens geldt na injectie van sporen in de ent van de combinatie V/R (zie 35.3.).

Ziektesymptomen treden in deze beide gevallen slechts in enkele planten op. Op grond van deze gegevens kan geconcludeerd worden, dat kieming van de sporen in het hypocotyl, gevolgd door enige groei, geen betekenis heeft voor het ziekteverloop.

35.6. De betekenis van de uitbreiding van de schimmel in de wortel

In de vorige paragraaf is besproken, dat sporen weliswaar in vrij korte tijd van de wortel naar de stengel worden getransporteerd, maar dat dit van weinig of geen betekenis kan zijn voor de ontwikkeling der ziektesymptomen.

Aangezien lupineplanten zich vrij gemakkelijk laten stekken, mits voor voldoende licht en vochtige grond wordt gezorgd, konden proeven worden genomen over de invloed van het transport van sporen naar de stengel op het ontstaan van ziektesymptomen.

Nadat de wortel van vatbare planten was geïnoculeerd, werd de stengel van 1 tot 11 dagen daarna afgesneden op de grens van wortel en hypocotyl, en als stek uitgeplant. Dergelijke stekken worden al naar het tijdstip van afsnijden in verschillende mate ziek (tabel 18). In de proeven was te constateren, dat tussen 3 en 7 dagen na de inoculatie een snelle overgang plaats vindt van het gezond blijven naar het ziek worden van bijna alle stekken. Bij wortelinoculaties van planten die niet zijn gestekt is in meerdere proeven geconstateerd dat de schimmel tussen 3 en 8 dagen na infectie voor het eerst in het hypocotyl kan worden aangetoond (figuur 12, zie 34.5.). Dit en het voorgaande wijzen erop dat het ziek worden van stekken nauw verband houdt met het binnendringen van het mycelium uit de wortel in het hypocotyl. Men kan daaruit afleiden dat de ontwikkeling van de schimmel in de wortel in de vorm van actief groeiend

TABEL 18. Verwelking van stekken, afgesneden op een verschillend aantal dagen na inoculatie van de wortel.

TABLE 18. *Wilting of cuttings made at different time intervals after inoculation of the roots.*

Aantal dagen tussen inoculatie en afsnijden	Ziektegraad uitgedrukt in aantal zieke planten <i>Disease-severity represented by number of diseased plants</i>					
	Proef 1/Experiment 1		Proef 2/Experiment 2		Proef 3/Experiment 3	
	Gezond <i>Healthy</i>	Ziek <i>Diseased</i>	Gezond <i>Healthy</i>	Ziek <i>Diseased</i>	Gezond <i>Healthy</i>	Ziek <i>Diseased</i>
1			30	3		
2					22	3
3			17	16		
4			16	17	13	12
5	17	3				
6			7	26		
7	11	9				
8			0	33	1	24
9	2	18				
11	1	19				

mycelium de belangrijkste factor is voor het ziek worden van de plant. Het transport van conidiën naar de stengel is hierbij van weinig of geen betekenis.

Door kweekproeven is aangetoond dat *Fusarium* voorkomt in enten, die geen symptomen gaan vertonen. Ook werd met de mixertechniek vastgesteld dat in vele gezond gebleven stekken de hoeveelheid *Fusarium* vrij aanzienlijk was. Met deze beide manieren wordt echter niet aangetoond of de schimmel in de vorm van sporen of van mycelium voorkomt. Dat in de stekken wel mycelium aanwezig is werd vastgesteld door stekken die 3 of 4 dagen na inoculatie waren afgesneden en 3 weken later nog gezond waren, te fixeren en anatomisch te onderzoeken. In het hypocotyl van 10 onderzochte planten werd mycelium aangetroffen. De uitbreiding hiervan in xyleemvaten en tracheïden was echter gering te noemen. De getransporteerde sporen zijn dus inderdaad gekiemd maar de uitbreiding van het mycelium was niet groot.

De stekproeven bevestigen de conclusie uit de vorige paragraaf, dat de aanwezigheid en kieming van sporen in het hypocotyl geen belangrijke invloed heeft op het ziekteverloop. Vermoedelijk is de groei van de schimmel uit de wortel naar het hypocotyl bepalend voor het al dan niet ziek worden van gemaakte enten. Men moet dan aannemen dat door het snijden van de ent een eenmaal op gang gekomen proces, dat behoort bij het aanwezige mycelium, niet wordt stopgezet. Daarom komt de eerste mogelijkheid ter verklaring van de resultaten van 34.5. (punt 1) te vervallen want de schimmeldraden kunnen bij deze stekken geen voedsel betrekken van het mycelium in de wortel. Van de punten 2 en 3 van deze verklaring kan niet worden gezegd, aan welke de meeste betekenis moet worden toegekend. Wel kan uit de stekproeven eveneens worden geconcludeerd dat geen transport over grote afstand plaats vindt van een resistentie verlagende factor.

35.7. De groeimogelijkheid van de schimmel op verschillende plaatsen in de plant

Om na te gaan of verwonding van de wortelschors bij het inoculeren invloed

heeft op het ziekteverloop werden proeven gedaan, waarbij sporen via het hypocotyl in de wortel werden gebracht. De sporen komen dan zowel in het hypocotyl als in de wortel terecht. Van de volgende 3 objecten werd het ziekteverloop in enkele proeven vergeleken. 1. injectie van de wortel; 2. injectie van de wortel via het hypocotyl; 3. injectie van het hypocotyl alleen (tabel 19). Het inoculatie-niveau lag bij deze proeven enige malen boven het optimale om een mogelijk effect van de verdeling van de sporen over wortel en hypocotyl te vermijden.

TABEL 19. Injectie wortel (2 manieren) vergeleken met injectie hypocotyl. Proeven 1, 2 en 3 resp. 56, 35 en 21 dg. na inoculatie. Inoculatie-niveau resp. 3000, 2000 en 2500 sporen/plant.

TABLE 19. *Comparison of root injection (2 ways) and stem injection. Experiments 1, 2 and 3 resp. 56, 35 and 21 days after inoculation. Level of inoculation resp. 3000, 2000, and 2500 conidia/plant.*

	Zieke planten in %/Diseased plants in %		
	Proef 1/Experiment 1	Proef 2/Experiment 2	Proef 3/Experiment 3
1. Injectie wortel <i>Injection root</i>	77	92	83
2. Injectie wortel via hypocotyl <i>Injection root via hypocotyl</i>	37	54	61
3. Injectie hypocotyl . . <i>Injection hypocotyl</i>	4	23	17

In drie proeven werd ook het *Fusarium*-niveau bepaald van wortels, die via het hypocotyl waren geïnjecteerd; dit werd op verschillende tijden na inoculatie uitgevoerd. De toename van SN in de wortel blijkt dan veel langzamer te verlopen (figuur 14) dan na injectie van de wortel op de gebruikelijke wijze in de richting van de wortelpunt.

Men zou uit deze proeven kunnen concluderen dat verwonding van de wortelschors bevorderend werkt op de ontwikkeling van de ziekte. Om dit nader te onderzoeken werd de volgende proef genomen.

Van planten werd de wortel afgesneden op 2 cm onder de wortelhals, daarna werd van onderen af loodrecht op het wondvlak in de centrale cylinder of in de schors een sporensuspensie geïnjecteerd. De planten werden daarna uitgeplant

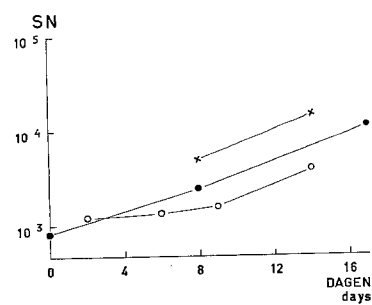
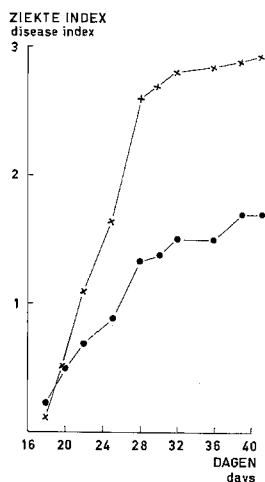


FIG. 14.
Verloop van SN in de wortelhals van vatbare planten na injectie van sporensuspensie vanuit het hypocotyl (3 proeven).
The course of the fungus level (SN) in the base of the roots of susceptible plants after injection of a spore suspension via the hypocotyl (3 experiments).

en bewortelden goed. Tevoren was met een oplossing van zuurfuchsine en door het maken van anatomische preparaten nagegaan welke delen op deze wijze worden verwond. Het bleek dat bij injectie van de centrale cylinder het meta-xyleem, het cambium en een deel van het phloem worden geraakt. Bij injectie van de schors worden alleen de buiten de centrale cylinder gelegen schorsparenchymcellen beschadigd. De resultaten van deze proef zijn in tabel 20 vermeld. Het ziekteverloop in een andere proef wordt weergegeven in figuur 15.

FIG. 15.
Het ziekteverloop na injectie van een sporensuspensie in het xyleem of in de schors.
The development of the disease after injection of a spore suspension into xylem or cortex.
x—x = xyleem / xylem
●—● = schors / cortex



TABEL 20. Vergelijking injectie in xyleem met injectie in schors.
Percentage zieke planten na 21 dagen (20 planten).
Voor verdere verklaring zie tekst.

TABLE 20. *Comparison of injection in root xylem and root cortex. (Main root partially cut off. Injection upwards). Percentage of diseased plants after 21 days, 20 plants per treatment.*

Gewone injectie van buiten af	60
<i>Ordinary injection from the side inwards</i>	
Injectie in het xyleem van onderaf	90
<i>Injection of xylem tissue upwards</i>	
Injectie in de schors van onder af	40
<i>Injection of cortex tissue upwards</i>	

Uit deze proeven volgt, dat bij injectie in het xyleem van onderen af het percentage zieke planten niet geringer maar eerder hoger is dan bij injectie van opzij. Dit betekent dat verwonding van de schors op zichzelf de infectiekansen niet verhoogt. Dit is niet in overeenstemming met de resultaten uit tabel 19 en men kan zich afvragen wat dan wel de oorzaak is van de geconstateerde verminderde infectie.

Een mogelijke verklaring voor het gevonden verschil bij directe injectie van de wortel en injectie via het hypocotyl kan daarin gelegen zijn, dat het infectiemateriaal op verschillende hoogte terechtkomt. Als de uitbreidingsmogelijkheden op verschillend niveau niet gelijk zijn zou dit een verschillend ziekte-

verloop kunnen geven. Aan dit punt werd bij de proefopzet van tabel 19 geen aandacht besteed. Om na te gaan of met deze invloed rekening moet worden gehouden werden proeven genomen waarbij op verschillend niveau in de wortel werd geïnjecteerd.

In twee proeven is na injectie op verschillend niveau het ziekteverloop bepaald, maar de planten werden niet onderzocht wat betreft de hoeveelheid *Fusarium*. In tabel 21 is het percentage zieke planten tot 31 dagen na injectie vermeld. Het blijkt dat naarmate de wortels op een lager niveau met sporensuspensie zijn geïnjecteerd een groter aantal planten verwelkt en doodgaat.

TABEL 21. Vergelijking injectie op verschillende afstand van wortelhals. Percentage zieke planten na 31 dagen.

TABLE 21. Comparison of injection at different distances of the root base. Disease rate expressed as percentage of diseased plants after 31 days.

Afstand van wortelhals <i>Distance of root base</i>	Proef 1 / <i>Experiment 1</i>		Proef 2 / <i>Experiment 2</i>	
	1 cm 61	3 cm 94	1 cm 42	3 cm 67

In een derde proef is 21 dagen na injectie hoog of laag in de wortel de hoeveelheid *Fusarium* in de hele wortel bepaald met behulp van de mixertechniek. Het gemiddelde van 26 planten was na injectie van sporen dichtbij de stengelvoet: 32 kolonies; 3 cm vanaf de stengelvoet: 250 kolonies.

In dwarscoupes van wortels, die op verschillend niveau waren geïnoculeerd, was goed waar te nemen, dat het aantal geïnfecteerde vaten en de hoeveelheid schimmel na injectie dichtbij de wortelhals veel minder is.

Uit de bovenstaande proeven kan worden geconcludeerd, dat de uitbreidingsmogelijkheid van de schimmel in verschillende delen van de wortel niet gelijk is, en geen scherpe overgang van wortel naar stengel bestaat. Deze meer geleidelijke overgang gaat samen met een afname van het ziektepercentage. Voor de verklaring daarvan zou men kunnen denken aan een structurele verandering die plaatsvindt bij deze overgang. Enig anatomisch verschil tussen de betreffende delen van de wortel is echter niet waargenomen. Het ligt daarom eerder voor de hand te denken aan een fysiologische verandering. Over een fysiologische gradient van de worteltop naar hogere niveau's is echter nog heel weinig onderzoek verricht. Dit beperkt zich tot het vaststellen van een verschil in ademhaling tussen de worteltop en het één centimeter hoger gelegen deel (KRAMER, 1956). Nader onderzoek in deze richting zou in verband met de verschillen die bij de *Fusarium* uitbreiding zijn gevonden van groot belang zijn.

35.8. *Samenvatting en bespreking*

De entcombinaties $R \cdot V$ en $V \cdot V$ worden ziek na inoculatie van de wortel. De combinaties $V \cdot R$ en $R \cdot R$ blijven in dat geval gezond. Deze waarnemingen stemmen volkomen overeen met die welke in literatuur over andere gewassen zijn vermeld.

Wanneer van entcombinaties waarvan de wortels zijn geïnfecteerd na 17 dagen de wortel en het hypocotyl afzonderlijk worden geanalyseerd, kan geen invloed van de ent (stengel) op het schimmelniveau in de wortel worden geconstateerd.

Als het hypocotyl van een entcombinatie wordt geïnfecteerd heeft de niet-geïnfecteerde wortel geen effect op de toename van SN in het hypocotyl.

Van niet-afgesneden tweelingenten verwelkt na infectie van de vatbare wortel ook de resistente stengel, terwijl het nooit gelukt resistente planten door infectie met *F.o. lupini* ziektesymptomen te doen vertonen. De veronderstelling dat van de $R \cdot V$ entcombinatie de resistente ent dood zou kunnen gaan omdat de geïnfecteerde V wortel niet meer voldoende functioneert geldt bij tweelingen niet. Hieruit blijkt dus dat de infectie van de vatbare wortel op zich zelf van primaire betekenis is.

Wanneer stengels van planten die in de wortel zijn geïnoculeerd worden afgesneden en gestekt, is het volgende waar te nemen. Stekken gemaakt tot 3 dagen na inoculatie blijven in het algemeen gezond, terwijl stekken genomen vanaf de 7e dag na inoculatie bijna alle ziek worden. Tussen 3 en 7 dagen vindt een overgang plaats. Het feit dat het mycelium na inoculatie van de wortel het hypocotyl binnengroeit tussen de 3e en 9e dag (zie figuur 12) maakt het in hoge mate waarschijnlijk dat het ziek worden van de stekken verband houdt met de aanwezigheid van mycelium in de stek. Het transport van sporen in de eerste 3 dagen speelt dan geen rol. Dat de microconidiën gemakkelijk worden getransporteerd kon op verschillende manieren worden vastgesteld.

De ontwikkelingsmogelijkheden zijn op verschillende plaatsen in de wortel niet gelijk. Dichtbij de stengel is de groei minder sterk dan enkele centimeters meer naar de wortelpunt toe. Hiermede samengaande is verschil in ontwikkeling van ziektesymptomen waarneembaar.

Over de betekenis van mycelium in het hypocotyl van vatbare planten, afkomstig van gekiemde sporen, zijn thans gegevens uit verschillende proeven beschikbaar. In 34.2. is geconstateerd dat de toename van SN in dit geval aanzienlijk geringer is dan in de wortel. De ontwikkeling van ziektesymptomen is eveneens gering (34.1.). De infectie van het hypocotyl van entcombinaties toonde geen sterke toename van SN en een zwakke reactie van de planten (35.3.). Ook door het uitblijven van symptomen wanneer planten tot 3 dagen na inoculatie worden gestekt, blijkt dat het mycelium dat zich in het hypocotyl uit gekiemde sporen ontwikkelt klaarblijkelijk alleen onder bepaalde omstandigheden of misschien zelfs helemaal geen invloed heeft op het ontstaan van ziektesymptomen.

In de onderste helft van de vatbare wortel is de toename van SN sterker dan in het hoger gelegen gedeelte en in de stengel. Daarbij speelt in dit deel van de wortel een nog onbekende factor een rol, die nodig is voor een zodanige ontwikkeling van de schimmel dat ziektesymptomen gaan optreden. Dit blijkt uit proeven over de infectie van de wortel via het hypocotyl en dichtbij de stengel, waarbij de toename minder sterk is en minder planten ziek worden.

4. ORIENTEREND ONDERZOEK NAAR DE AARD VAN DE RESISTENTIE

41. HET ANATOMISCH ONDERZOEK

41.1. Inleiding

In paragraaf 35.8. is het binnendringen van de schimmel in de wortel besproken. Een beschrijving van de verdere groei van *Fusarium oxysporum* in de stelen van verschillende gewassen is gegeven door LINFORD (1928), SMITH en WALKER (1930) en ULLSTRUP (1937). De hyfen zijn beperkt tot xylemvaten, tracheïden en houtparenchym. Sommige vaten zijn volkomen gevuld met mycelium, in andere komen slechts enkele hyfen voor. In de afstervende plant worden alle weefsels met schimmel doorgroeid, hetgeen tenslotte resulteert in de vorming van sporodochien buiten op de stengel.

De schimmel groeit van het ene vat naar het andere. LINFORD (1928) en ANDERSON en WALKER (1935) namen respectievelijk waar: een groeien door dunne plaatsen in de wand van xylemvaten bij erwtenplanten en eveneens door onverdikte plaatsen in de wanden van spiraalvaten bij koolplanten. WENT (1934) meldde voor erwt alleen de groei door de stippels.

In vele publikaties wordt de aandacht gevestigd op visceuse substanties, die in de vaten voorkomen en deze verstoppert. In paragraaf 33.1. is hierop gewezen. In het bijzonder dienen vermeld te worden de publikaties van SMITH en WALKER (1930), die vonden dat in resistente planten meer verstopte vaten voorkwamen dan in vatbare planten en van SCHROEDER en WALKER (1942) die bij hogere temperatuur in resistente planten een groter aantal verstopte vaten waarnamen. De propfen konden echter niet steeds met het binnendringen van de schimmel in de vaten in verband worden gebracht en zij schenen de schimmel niet te hinderen. De laatste jaren is veel aandacht besteed aan de aanwezigheid van deze producten (zie 33.1.), zij zouden ontstaan door de werking van pectine splitsende enzymen en zouden de sapstroom in de xylemvaten zo sterk belemmeren, dat verwelking optreedt.

De vermelde waarnemingen van SMITH en WALKER geven het idee, dat de vorming van visceuse producten wel een reactie van de plant is, maar van minder betekenis is voor het ontstaan der verwelkingssymptomen. BECKMAN (1962) legt het accent ook in deze richting: de visceuse producten komen meer voor in resistente planten en zouden het product van een resistentie reactie zijn.

41.2. De bouw van de plant

Alvorens enige bijzonderheden te geven over de aangetaste plant volgen hier gegevens over de gezonde plant, voor zover van belang voor besprekingen in andere paragrafen.

Na kieming van het zaad, ontwikkelt zich hieruit eerst een hypocotyl en een penwortel. Reeds eerder is vermeld, dat bij het onderzoek in de kas planten zijn gebruikt van 1 maand oud. Dergelijke planten hebben minstens 4 echte bladeren, maar nog geen stengel boven de zaadlobben. Van de wortel van dergelijke planten kunnen de volgende anatomische bijzonderheden wor-

den vermeld. In de jonge wortel liggen aan weerskanten van de diarche houtcylinder 2 strengen phloëem. Tussen de 2 protoxyleemstrengen bevindt zich later een band metaxyleem, welke bestaat uit tamelijk wijde stippelvaten. De schuinstaande tussenschotten in deze vaten hebben vele hofstippels en veelal tevens een doorboring. De breedte van de vaten varieert van 20 tot 36 μ , de opening der doorboringen van 12 tot 18 μ . Het secundaire hout bestaat uit radiale reeksen van vaten en tracheïden afgewisseld met groepen van libriformvezels. In volwassen planten van het veld vormt het libriform het grootste deel van het hout in de wortel. De secundaire houtvaten zijn 25 tot 45 μ breed. Zij hebben schuinstaande tussenschotten met grote doorboringen die bijna de breedte van de vaten hebben. Bij een bloeiende plant hebben in het later afgezet hout vele houtvaten een breedte van 100 tot 130 μ . In de wortel van een plantje van 1 maand heeft over $\frac{3}{4}$ van de lengte secundaire groei plaats. Het cambium bestaat uit 7 tot 15 cellagen.

De diarche vaatbundel uit de wortel splitst zich in het hypocotyl in 4 collaterale vaatbundels. Het secundaire hout van de volwassen plant bevat een groot aantal wijde vaten, waarin weer tussenschotten met grote doorboringen voorkomen. Naarmate men hoger in de plant komt, worden de vaten nauwer. In de wortel varieerde bij een volwassen plant de breedte tussen 30 en 130 μ , even boven het eerste stengellid was dit 30 tot 50 μ , in de bloemsteel 15 tot 30 μ .

41.3. *De kleurmethode*

Aanvankelijk werden coupes gemaakt met het microtoom, doch bij dunne coupes was het een bezwaar dat het mycelium gemakkelijk uit de vaten losraakte. Dikke microtoomcoupes voldeden wel, maar bij seriewerk was het maken van coupes met de hand eenvoudiger.

Voor de kleuring van de handcoupes werd een aantal methoden beproefd. De combinatie van katoenblauw (in lactophenol) en Oranje G (in kruidnagelolie) bleek het beste te voldoen. Hierbij wordt het materiaal op de volgende wijze behandeld. Na fixatie in F.P.A. volgens JOHANSEN (1940) werd het in alcohol 96% gesneden. De coupes werden vervolgens gebracht in een klein koperen bakje met een bodem van fijn kopergaas en een diameter van $\frac{3}{4}$ cm en daarin behandeld op de volgende wijze.

1. Kleuren in een oplossing van katoenblauw in lactophenol. Oplossing verwarmen tot dampen van de vloeistof.
2. Differentiëren in lactophenol onder verwarming.
3. Twee keer wassen in alcohol 100%.
4. Kleuren in Oranje G in kruidnagelolie.
5. Wassen in kruidnagelolie.
6. Kruidnagelolie verwijderen door 2 keer wassen in xylol.
7. Insluiten in canada balsem.

Het Oranje G voldoet als tegenkleuring goed, doordat de houtelementen oranje kleuren, terwijl het mycelium het sterkst blauw is gekleurd.

41.4. *Het voorkomen van de schimmel in de lupineplant*

Zowel bij tracheïden als houtvaten kunnen in de cellen enkele hyfen voorkomen, maar ook dichte myceliumproppen. Als enkele hyfen in een vat

voorkomen, werd waargenomen dat deze zich telkens even aan de wand vast-hechtten bij het omhooggroeien. Bij de doorboringen was te zien, dat de schimmel om de rest van het tussenschot heen buigt. Tussen de groei van het mycelium in de wijde vaten, die vooral in volwassen houtcilinders worden gevonden en in nauwe vaten die bij jongere stadia in hoofdzaak aanwezig zijn, is verschil te zien. In de wijde vaten groeit de schimmel alle kanten uit, dus ongericht. Maar in nauwe vaten van zwaar aangetaste jonge planten groeit de schimmel meer in de lengterichting van de vaten. Veelal is het mycelium slechts in een sector van de houtcilinder aanwezig, soms in meerdere sectoren. Wanneer uitgaande van de worteltop op regelmatige afstanden coupes werden gemaakt, werd enkele malen waargenomen, dat het eerste mycelium in een sector van de hoofdwortel aanwezig was, juist op de plaats waar een zij-wortel was uitgegroeid. Hieruit kan men concluderen dat de infectie via een zijwortel plaats vond.

De myceliumdraden komen niet alleen in de vaten voor, zij zijn in vatbare planten ook te vinden in tracheïden, mergstralen en houtparenchymcellen. Om enige indruk te krijgen van het aantal vaten met mycelium werden van 6 volgroeide planten van een vatbaar ras coupes gemaakt van de wortel, vlakbij de wortelhals. Alle planten vertoonden de eerste ziektesymptomen. Ter vergelijking werden eveneens 6 planten van de resistente selectie 147 be-keken. Deze planten waren in eenzelfde ontwikkelingsstadium. Bij dit onder-zoek werd tevens gelet op de aanwezigheid van de schimmel in andere ele-menten van de stele en op het voorkomen van sporen en gom.

Uit tabel 22 blijkt, dat het percentage vaten met mycelium in vatbare planten veel hoger is dan in resistente. De verhouding tussen vaten met veel of weinig mycelium is in beide gevallen ongeveer gelijk. Bij deze gegevens uit de

TABEL 22. Het aantal vaten met mycelium in 6 resistente en 6 verwelkende vatbare planten afkomstig van een besmet veld.

TABLE 22. Number of vessels with mycelium in 6 resistant and 6 wilting susceptible plants, from an infested field

Totaal aantal vaten <i>Total number of vessels</i>		Percentage vaten met mycelium <i>Percentage of vessels containing mycelium</i>	Indeling vaten volgens mate vulling in % <i>Classification vessels according to amount mycelium in vessel lumina in % of the surface</i>			Granulaire substantie <i>Granular viscous substance</i>	
			75-100	50-75	50		
Vatbaar <i>Susceptible</i>	647	61	125	69	202	geen	<i>none</i>
	636	48	102	30	172	geen	<i>none</i>
	796	54	168	96	247	3 vaten	<i>3 vessels</i>
	960	41	78	69	244	geen	<i>none</i>
	1032	24	60	49	139	geen	<i>none</i>
	828	59	230	143	118	geen	<i>none</i>
Resistent <i>Resistant</i>	721	1	2	3	2	veel	<i>many</i>
	913	16	71	30	43	veel	<i>many</i>
	546	2	4	2	7	weinig	<i>few</i>
	651	4	6	3	15	veel	<i>many</i>
	524	2	4	0	7	veel	<i>many</i>
	647	3	10	3	8	veel	<i>many</i>

tabel kan hier nog worden vermeld dat in tracheïden en mergstralen van vatbare planten zeer veel meer mycelium voorkwam dan in resistente planten. Het aantal tracheïden met mycelium is in vatbare planten het honderdvoudige van het aantal bij resistente. De mergstralen van vatbare planten zijn voor meer dan 50% doorgroeid met *Fusarium*, in de resistente planten was dit slechts bij 1 van de 6 planten omstreeks 10%, in de overige planten kwam geen mycelium in de mergstralen voor.

Zeer opmerkelijk is dat in de resistente planten meer granulaire substantie werd waargenomen dan in vatbare planten (zie tabel 22). Dit is in overeenstemming met de waarnemingen welke in de inleiding zijn genoemd. De substantie is meestal bruinachtig van kleur en heeft een korrelige structuur; soms is de kleur opaalachtig. Herhaaldelijk krijgt men de indruk dat de propfen vrij visceus zijn. Dit is goed zichtbaar in figuur 4 van plaat I waar deze substantie zich heeft samengetrokken, vermoedelijk onder invloed van de fixatie, maar daarbij in sommige gevallen duidelijk de vorm van de cel heeft behouden. Al kan op grond van deze waarnemingen niets over de betekenis van deze propfen voor de resistentie worden gezegd, zij maken het minder waarschijnlijk dat aanwezigheid van dit materiaal in vatbare planten een belangrijke oorzaak is voor het ontstaan van symptomen, hetgeen door vele onderzoekers is ondersteld. Deze opvatting wordt gesteund door het werk van BAUMGARDT (1953) die aantoonde dat gomvorming in het xyleem van tomaten optrad als wondreactie. In dit verband is het ook van betekenis dat deze granulaire substantie bij lupine ook zelfs een enkele maal in gezonde kasplanten van een vatbaar ras en van een resistente selectie werd geconstateerd.

Bij de bestudering van de groei van de hyfen van het ene vat naar het andere kon worden vastgesteld, dat een hyfe direct door de wand boort, zelfs door de dikke wanden van libriformvezels (Plaat I, fig. 5). Dit werd waargenomen bij vatbare en resistente planten. Bij de plaats waar de hyfe door de wand gaat, is deze dikwijls verdikt (Plaat I, fig. 6). Het kanaaltje dat de hyfe maakt is zeer dun. Op lengte-doorsnede onder olie-immersie werd waargenomen, dat de wand van vaten met veel mycelium niet gaaf is; dit en de waarneming over het doorboren van de wanden door hyfen, wijst erop dat de schimmel cellulose en wellicht nog andere verbindingen die in de celwand voorkomen af kan breken. Deze veronderstelling wordt gesteund door de waarneming van HUSAIN en DIMOND (1960) dat een cultuurfiltraat van *F.o. lycopersici* cellulase-activiteit bezit.

41.5. Samenvatting en bespreking

Uit anatomisch onderzoek is gebleken dat het percentage houtvaten met mycelium in vatbare planten veel hoger is dan in resistente, de verhouding tussen vaten met veel of weinig mycelium is in beide gevallen gelijk. Het aantal tracheïden en mergstralen waarin mycelium voorkomt is in vatbare planten veel hoger dan in resistente.

De aanwezigheid van gomachtige substantie in houtelementen is bij een aantal waardplanten in verband gebracht met een aantasting door *Fusarium oxysporum* (zie 41.1.). In lupineplanten werden deze visceuse producten eveneens waargenomen. Toch kan niet worden geconcludeerd dat zij bij lupine tot het ontstaan der ziektesymptomen zullen bijdragen, omdat zij in

resistente planten veel meer gevonden worden dan in vatbare. Dit sluit aan bij het werk van SMITH en WALKER (1930) en BECKMAN et al. (1962) die eveneens in resistente planten van respectievelijk kool en banaan een groter aantal vaten met gomachtig materiaal waarnamen. Bij lupine kan dus geen grote betekenis aan de verstopping door dit materiaal voor het ontstaan der symptomen worden gegeven. BECKMAN et al. vonden voor banaan dat de vorming van deze propfen de resistentie van de plant verhoogt, doordat het transport van sporen er door wordt belemmerd. Voor lupine is dit van weinig betekenis omdat werd aangetoond dat de kieming van sporen in de stengel geen ziek worden van de plant tot gevolg heeft (zie 34 en 35.3).

De waarneming dat hyfen van *Fusarium* niet alleen door de hofstippels gaan maar ook door de wand heen boren, is van belang. Hierdoor kan aan het vermogen van de parasiet om cellulose en andere verbindingen waaruit de verhoude wand bestaat af te breken, nauwelijks worden getwijfeld.

42. DE REACTIE VAN LUPINEPLANTEN OP CULTUURFILTRATEN VAN *Fusarium oxysporum*

42.1. Inleiding

In paragraaf 33.1. is een overzicht gegeven van het onderzoek naar de oorzaak van de verwelkingssymptomen. Daarbij is vermeld dat men geen verschil heeft gevonden tussen de reactie van vatbare en resistente planten op cultuurfiltraten of op oplossingen van bepaalde stofwisselingsproducten in meer zuivere vorm. Een ander feit is dat het in de zieke tomatenplant aangetoonde fusarinezuur zeer toxisch is voor een groot aantal plantensoorten, terwijl de schimmel die deze stof in cultuur produceert (*Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*) toch zeer gespecialiseerd is (GÄUMANN, 1957). De betekenis van dergelijke toxinen (vivo-toxinen volgens DIMOND en WAGGONER, 1953a) voor de ziektesymptomen is met de thans bekende feiten nog niet aan te geven.

Een symptoom bij verwelkingsziekten is de verbruining der vaten. DAVIS et al. (1953) veronderstellen dat deze verbruining ontstaat door oxydatie van phenolen in de levende cellen. De phenolen die als phenol-glycosiden in de plant voorkomen kunnen vrijkomen, doordat de schimmel een glycosidase produceert. Inderdaad werd door DAVIS aangetoond, dat in vitro glycosiden kunnen worden gesplitst.

In het eigen onderzoek werd de reactie van vatbare en resistente planten op cultuurfiltraten getoetst om na te gaan of zich hierbij afwijkingen van vermelde gegevens voordoen.

42.2. Eigen onderzoek

Er is nagegaan of het cultuurfiltraat van *F.o. lupini* eveneens een verwelking van lupineplanten teweegbrengt en in hoeverre er verschil is tussen de reactie van vatbare en resistente planten. Filtraten werden bereid door 7 tot 21 dagen oude schudculturen te filtreren door glasfilters G1 en G3 en daarna tweemaal te centrifugeren. De plantjes werden iets boven de grond afgesneden. Daarna werden ze op verschillende concentraties van het filtraat geplaatst, ieder afzonderlijk in een buisje, waarbij het hypocotyl voor een deel in de vloeistof was gedompeld.

Onverdunde filtraten van 7 dagen oude schudculturen bleken reeds zeer toxisch te zijn. Van verdunningen van 1/50 en zelfs 1/100 was nog een duidelijke werking waar te nemen. De symptomen op deze filtraten bestaan uit verwelking. Het eerst worden de onderste bladeren slap, enige tijd later verliezen ook de bladstelen hun turgescentie, zodat zij doorbuigen. Tenslotte verwelken alle bladeren. Een symptoom dat ook steeds valt op te merken is het dof worden van de zaadlobben. Soms verschrompelde bij onverdunde filtraten zelfs het hypocotyl. In geen van de proeven werd enig verschil waargenomen tussen de reactie van resistente en vatbare planten op verdunningen van het filtraat. In enkele gevallen trad in een verdunningsreeks verwelking bij planten van resistente selecties nog op als planten van het vatbare ras geen symptomen meer vertoonden.

Om na te gaan in hoeverre door verhitting de toxische werking verloren gaat, werd het filtraat gedurende 10 minuten verhit tot 110 °C. Zowel planten van vatbare rassen als van resistente selecties verwelkten op deze filtraten. Alleen bij sterke verdunning was enig verschil tussen wel en niet verhit filtraat waarneembaar. Opmerkelijk is dat ook bij gebruik van verhit filtraat verbruining optrad. Bij deze bruinkleuring speelt dus een thermostabiele component een rol, hetgeen niet in overeenstemming is met de resultaten die werden verkregen met tomaten en *F.o. lycopersici* (SCHEFFER en WALKER, 1953; WINSTEAD en WALKER, 1954). In deze gevallen wordt vermeld dat de verbruining veroorzakende factor in cultuurfiltraten door verhitting inactief werd.

Misschien moet de thermostabiele component worden gezocht onder de phenolen, waarmee DAVIS et al. (1953) verbruining van de vaten verkregen. Bij lupine zou dan phenol door polyphenol-oxydase van de gastheer kunnen worden geoxydeerd. Polyphenol-oxydasen komen volgens FARKAS en KIRALY (1962) in vele planten voor.

Om ophoping van lysisproducten in de voedingsoplossing te vermijden werden zogenaamde „replacement cultures” gemaakt (SCHEFFER en WALKER, 1953; WINSTEAD en WALKER, 1954). Als voedingsoplossing werd een stilstaande Czapek Dox gebruikt, hierop werd *Fusarium* gedurende 14 dagen bij 28 °C gekweekt. Het aan de oppervlakte gevormde vlies werd daarna uitgewassen en gedurende 1 dag gekweekt op een verdunde Czapek (1 : 4). Het van deze cultuur verkregen filtraat werd op zijn werkzaamheden onderzocht. De symptomen op dit filtraat verkregen waren gelijk aan die van gewone vloeistofculturen. Bij verdunning bleek evenwel dat de concentratie toxische stof lager was.

WINSTEAD en WALKER verkregen met dergelijke filtraten uit replacement culturen enig verschil in symptomen tussen vatbare en resistente rassen van kool, wanneer zij deze filtraten toevoegden aan grond waarin deze koolplanten stonden. Om dit bij lupineplanten te onderzoeken werd het filtraat van replacement culturen gedurende 5 dagen dagelijks op de grond gegoten waarin lupineplanten groeiden. Het gelukte op deze wijze niet enig symptoom in de lupineplanten te doen ontstaan.

42.3. Samenvatting en bespreking

Lupineplanten verwelken op filtraten van vloeistofculturen van *F.o. lupini*. Evenals voor andere gewassen is geconstateerd, bleek in het eigen onderzoek

dat vatbare en resistente planten op dergelijke filtraten gelijk reageren. De resistentie is dus ook hier geen ongevoeligheid voor stoffen die door de schimmel in cultuur zijn gevormd.

Op het verhitte filtraat vertonen de lupineplanten, in tegenstelling tot hetgeen in literatuur hierover is vermeld, een verbruining van de vaten. Wellicht komt in het filtraat een thermostabiele component voor die in de plant wordt omgezet en tot deze verbruining aanleiding geeft.

43. PROEVEN MET EXTRACTEN EN BLOEDINGSVOCHT VAN RESISTENTE EN VATBARE PLANTEN

43.1. De groei van de schimmel op perssap en op bloedingsvocht

Over de groei van *Fusarium oxysporum* op extracten van de waardplanten is weinig bekend.

Op extracten van resistente en vatbare bananenplanten toonde *F.o. cubense* geen groeiverschil (HARPER, 1950; RAMAH KRISHNAN en DAMODARAN, 1956). Evenmin konden SNYDER et al. (1946) in bloedingsvocht van resistente tomatenplanten een andere groei vaststellen dan in vocht van vatbare planten.

Met extracten van resistente en vatbare lupineplanten werd bij één serie monsters verschil in groei van de schimmel verkregen, maar deze resultaten konden niet worden gereproduceerd. In een groot aantal extracten, die op verschillende manieren waren bereid, is geen verschil in groei van *F.o. lupini* geconstateerd.

In andere proeven werd bloedingsvocht inplaats van perssap of andere extracten gebruikt. Dit bloedingsvocht was verkregen door planten boven de grond af te snijden (zie ook 43.2.). Het vocht werd geplaatst op een objectglas met uitholling; na toevoegen van de sporensuspensie werd de druppel afgedekt met een dekglas dat met een randje paraffine werd afgesloten om uitdrogen van het preparaat te voorkomen. Ook werden wel hangende druppelpreparaten gemaakt in VAN TIEGHEM cellen. Bij een temperatuur van 20 °C waren duidelijk verschillen waarneembaar tussen de groei van kiemhyfen op bloedingsvocht van vatbare en resistente planten (fig. 16). Bij 27 °C waren de verschillen niet duidelijk.

Een moeilijkheid was dat het vocht soms door bacteriën was verontreinigd. Door terramycine toe te voegen werd in dit geval van de verontreiniging minder hinder ondervonden.

In één proef gelukte het zoveel bloedingsvocht te verzamelen dat het kon worden gesteriliseerd door filtreren via een Seitzfilter. In het aldus verkregen steriele extract konden opnieuw duidelijke verschillen in groeisnelheid waargenomen worden (Plaat II, fig. 2 en 3).

Uit deze proeven moet worden geconcludeerd dat de groeimogelijkheden beter zijn in sap uit xylemvaten van vatbare lupineplanten dan in sap uit resistente planten. Nader zal dienen te worden onderzocht welke factoren het waargenomen groeiverschil teweeg brengen.

43.2. Amino-zuren

Als *Fusarium* in houtvaten groeit zullen afbraakproducten van deze elementen als voedsel kunnen dienen, doch het is ook mogelijk dat het xylemsap

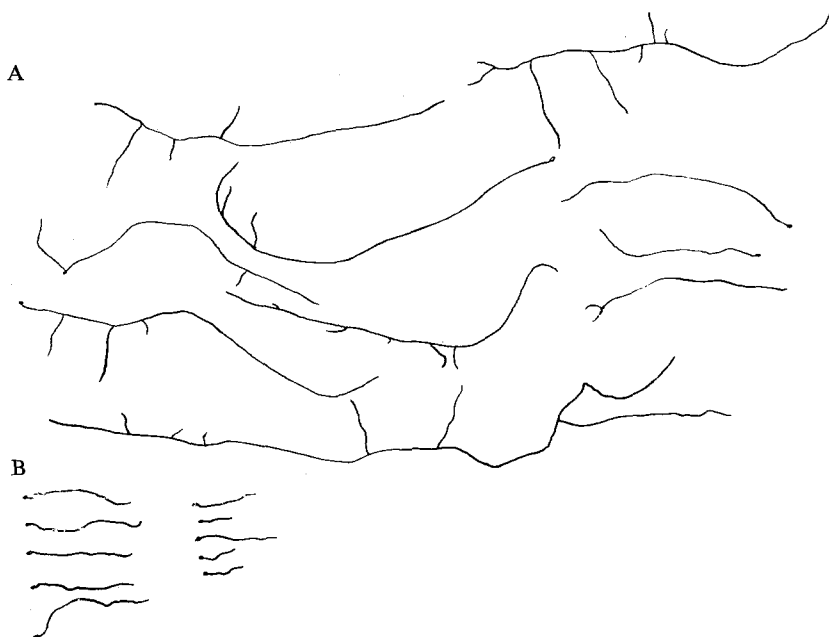


FIG. 16. Kieming van sporen in bloedingsvocht van vatbare (A) en resistente (B) planten.
Germination of spores in exudation sap of susceptible (A) and resistant (B) plants.

zonder aanwezigheid van de schimmel al bepaalde voedingsstoffen bevat. Een eerste antwoord op deze veronderstelling is gevonden door ZEEVAART (1955). In het bloedingsvocht van afgesneden lupineplantjes werden geen suikers aangetoond, maar waren wel aminozuren met behulp van microchemische reacties aantoonbaar. Hij stelde bovendien vast dat de kleurintensiteit van druppels bloedingsvocht die in filtreerpapier waren opgedroogd, na een reactie met ninhydrine bij geïnoculeerde planten veel minder sterk was dan bij niet geïnoculeerde. Deze gegevens zijn in het volgende enigermate uitgewerkt.

Om lupineplanten goed te laten bloeden werd de volgende werkwijze gevolgd. De planten werden gedurende 1 maand opgekweekt in tuingrond, daarna uitgeplant in grond van 20 °C in de kas. Een week voor het afsnijden werden zij op een voedingsoplossing volgens VON DER CRONE geplaatst. Deze werd vlak voor het afsnijden van de top vervangen door leidingwater. De verlichting bestond gedurende de tijd dat de plantjes op voedingsoplossing stonden uit TL buizen, 250 watt per m², hoogte boven de planten 35 cm.

Het bloedingsvocht werd opvangen in een stukje rubberslang dat over de stengelstomp was geschoven. Om uitdroging van de stomp te voorkomen werd over de afgesneden plant een van binnen bevochtigde wijde cultuurbuis geplaatst. Ongeveer 17 uren na het afsnijden werd het vocht verzameld. Het werd van ieder plantje afzonderlijk in een buisje bewaard bij — 26 °C. Dat het bloedingsvocht afkomstig is uit de xylemvaten kon na het afsnijden worden waargenomen. Herhaaldelijk is gezien, dat een druppeltje op het houtgedeelte wordt gevormd.

In één- en tweedimensionale chromatogrammen werd vastgesteld welke aminozuren in dit bloedingsvocht voorkwamen (Plaat II, fig. 4 en 5).

TABEL 23. Papierchromatografische analyse van bloedingsvocht van vatbare planten op aminozuren. Loopvloeistof phenol-water. Vergelijking met aminozuur oplossingen.

TABLE 23. Analysis of exudation sap for amino-acids. Paperchromatography. Solvent phenol/water. Comparison with amino acid solutions.

	Rf Bloedingsvocht <i>Exudationsap</i>	Rf Zuivere stof <i>Pure compound</i>	Rf volgens Cramer ¹ <i>according to Cramer¹</i>
Asparaginezuur . . . <i>Aspartic acid</i>	0,07	0,07	0,07
Glutaminezuur. . . . <i>Glutamic acid</i>	0,19	0,17	0,16
Asparagine	0,31	0,32	0,29
Alanine	0,54	0,54	0,55
Phenylalanine		0,82	0,78
Leucine	0,78		0,79

¹ Cramer (1954)

In tabel 23 worden gemiddelde Rf-waarden van een aantal monsters van vatbare planten gegeven. De identiteit van de vlek met een Rf-waarde van 0,78 in phenol-water kon worden bepaald door als loopvloeistof butanol-azijnzuur-water (4 : 1 : 1) te gebruiken en na reactie met ninhydrine op de kleur van de vlek te letten. De vlek blijkt dan van leucine te zijn. In tweedimensionale chromatogrammen was de vlek van leucine zelden te vinden en dan nog zeer zwak. Gevonden werden 4 aminozuren en 1 amide, nl.: asparaginezuur, glutaminezuur, alanine, leucine en asparagine. In het bloedingsvocht van resistente planten werd nooit glutaminezuur waargenomen, terwijl de andere 4 aminozuren wel werden aangetoond. Te oordelen naar de kleurintensiteit was de concentratie der aminozuren in het bloedingsvocht van resistente planten steeds geringer dan in dat van vatbare planten.

Voor het asparaginezuur dat steeds de sterkst gekleurde vlek gaf, is nagegaan in hoeverre de hoeveelheid van deze stof wisselt in wel en niet geïnoculeerde planten. Daarvoor werd de volgende methode toegepast. Asparaginezuuroplossingen van verschillende concentratie werden als standaard gebruikt. Van iedere oplossing werd 0,02 ml op het papier gebracht, na het ontwikkelen met phenolwater werd met ninhydrine gereageerd. Voor de kleurintensiteit van een vlek werd een cijferwaardering gegeven. Met deze methode bleken zekere verschillen te kunnen worden aangetoond. De waarderingscijfers met de daarbij behorende concentraties waren als volgt:

$$\begin{aligned}
 0,005\% &= 1 \\
 0,010\% &= 2 \\
 0,020\% &= 4 \\
 0,040\% &= 6 \\
 > 0,040\% &= 7
 \end{aligned}$$

Uit de resultaten van enkele bepalingen (tabel 24) blijkt dat geïnoculeerde planten aanvankelijk minder asparaginezuur bevatten dan niet geïnoculeerden.

Opmerkelijk is dat 15 dagen na inoculatie, het tijdstip waarop de eerste planten beginnen te verwelken, de hoeveelheid asparaginezuur in geïnoculeerde planten weer gelijk is aan de controle. Dit zou kunnen betekenen dat dan de schimmel dit aminozuur niet meer nodig heeft, omdat bij de aantasting van de plant voldoende andere voedingsstoffen vrij komen.

TABEL 24. Schatting van de hoeveelheid asparaginezuur in bloedingsvocht van wel en niet geïnoculeerde vatbare planten (Neven).

TABLE 24. Determination of the amount of aspartic acid in exudation sap of inoculated and non-inoculated susceptible plants (Neven).

	Geïnoculeerde planten <i>Inoculated plants</i>			Niet geïnoculeerde planten <i>Non-inoculated plants</i>		
Aantal dagen na inoculatie <i>Days after inoculation</i>	5	11	15	5	11	15
Aantal geanalyseerde planten <i>Number of plants analysed</i>	7	9	7	9	9	8
Gemiddelde intensiteit der vlekken <i>Average intensity of the spots</i>	0	0,88	5,28	5,22	4,00	5,25
$S_{\bar{x}}$	—	0,35	0,91	0,73	0,78	0,31

Een bepaling van het voorkomen van asparaginezuur in resistente planten geeft ongeveer hetzelfde te zien als in vatbare planten: geïnoculeerde planten bevatten kort na de inoculatie minder dan niet geïnoculeerde.

Het is aannemelijk dat *Fusarium* in de houtvaten van lupineplanten de daar aanwezige aminozuren als koolstofbron voor zijn groei gebruikt. Deze veronderstelling wordt gesteund door het onderzoek van VAN ANDEL (1956) die aantoonde dat *Fusarium oxysporum* f. *lupini* in vitro kan groeien op een anorganische voedingsbodem met een aminozuur als het enige organische bestanddeel. Zij constateerde verder dat de concentratie asparaginezuur die in het bloedingsvocht wordt gevonden, in vitro slechts geringe groei gaf, maar dat verschillende aminozuren tezamen een betere groei teweeg brachten. Het is dus mogelijk dat een zwakke groei in resistente planten niet alleen wordt veroorzaakt door een geringe hoeveelheid van deze stoffen maar ook door het ontbreken van één of meer componenten. Overigens moet er rekening mee worden gehouden dat hier bloedingsvocht is geanalyseerd. Bij een transpirerende plant gaat veel meer vloeistof door de vaten en zal de concentratie veel lager zijn. Een verschil in concentratie wordt dus ook veel geringer.

Er is niet nagegaan of het verschil tussen resistente en vatbare planten, voor wat betreft het aantal en de concentratie der aminozuren, alleen bij beide gebruikte rassen voorkomt of dat dit verschil in het algemeen samengaat met vatbaarheid en resistentie tegen *Fusarium oxysporum*.

43.3. Phenolen

In vele publikaties wordt naar voren gebracht dat er een verband kan be-

staan tussen het voorkomen van phenolen in planten en de resistentie tegen bepaalde plantenziekten (FARKAS en KIRALY, 1962).

Ter oriëntatie werden analyses verricht van vatbare en resistente lupineplanten. Hiervoor werden alcoholische extracten bereid.

In ééndimensionale chromatogrammen, waarvoor als loopvloeistof butanol-azijnzuur-water (6 : 2 : 2 of 4 : 1 : 5) werd gebruikt, waren in U.V. licht herhaaldelijk vijf vlekken te onderscheiden. De plaats van deze vlekken correspondeerde niet met die van chlorogeenzuur of koffiezuur. Tussen extracten van vatbare en resistente planten was geen kwalitatief of kwantitatief verschil te constateren. De alcoholische extracten werden ingedampt, gehydrolyseerd en gescheiden met aether, waarna de aetherfractie werd geanalyseerd. Nu werden onder U.V. licht 3-6 vlekken geconstateerd, waarvan 2 vlekken reageerden met FeCl_3 (Rf 0,84 en 0,98 in B.A.W. 6 : 2 : 2). Een verschil tussen resistente en vatbare planten was niet te constateren. Evenmin tussen geïnoculeerde en niet-geïnoculeerde resistente planten. Door het ontbreken van kwalitatieve of opvallende kwantitatieve verschillen werd dit onderzoek niet voortgezet.

43.4. *Bepaling van de polyphenoloxydase-activiteit bij resistente planten*

Een aantal onderzoekers vond een correlatie tussen de activiteit van polyphenoloxydase in de gezonde plant en hun resistentie tegen micro-organismen, zie FARKAS en KIRALY (1962). MENON en SCHACHINGER (1962) vonden bij tomaten dat de polyphenoloxydase-activiteit in resistente planten hoger was dan in vatbare en in geïnfecteerde hoger dan in gezonde. Het leek interessant na te gaan of het ontstaan van het evenwicht in de resistente lupineplanten, waarbij het schimmelniveau gedurende geruime tijd weinig verandert, samengaat met een verhoogde polyphenoloxydase-activiteit. Daartoe werden resistente planten geanalyseerd 28 dagen na inoculatie. Als controle dienden even oude niet geïnoculeerde planten. Van wortels van deze planten werden monsters van 1 gram weefsel genomen. Ieder monster bestond uit gemiddeld 2 wortels. Het weefsel werd in plakjes gesneden en gemalen in een „high speed blender” in 15 ml Mc Ilvaine buffer, pH 7. Het extract werd door kaasdoek gefiltreerd en vervolgens werden de overige resten verwijderd door centrifugeren. De bepaling is gebaseerd op de vorming van donker gekleurde polymeren uit catechol. Van het extract werd 0,1 ml in een cuvette gedaan die 10 ml van 0,5% catechol bevatte. De mate van verkleuring van deze oplossing in een tijdsverloop van 30 tot 90 seconden na het toevoegen van het extract werd gemeten met een Coleman model 8 colorimeter bij 400 m μ . Drie maal werden geïnoculeerde en niet geïnoculeerde planten van de resistente selectie 147 vergeleken, van ieder object 3 monsters. Enig verschil tussen beide objecten was niet te constateren (tabel 25). Om op het ontbreken van verschil in polyphenoloxydase-activiteit in deze oriënterende proeven een conclusie te kunnen baseren zou het nodig zijn de enzymactiviteit op verschillende tijdstippen tussen 0 en 28 dagen te meten. Extracten van resistente en vatbare planten werden niet vergeleken.

TABEL 25. Vergelijking van de polyphenoloxydase-activiteit in extracten van geïnoculeerde en niet geïnoculeerde resistente planten. Gemeten is de verandering der optische dichtheid van een 0.5% catechol oplossing gedurende 60 seconden bij 400 m μ . Ieder object in drievoud.

TABLE 25. Comparison of polyphenoloxydase activity in extracts of inoculated and non-inoculated resistant plants (28 days after inoculation). Determination of changes in optical density in 0.5% catechol solution during 60 seconds at 400 m μ . Every treatment three samples.

	Geïnoculeerd <i>Inoculated</i>			Niet geïnoculeerd <i>Non-inoculated</i>		
Proef 1 <i>Experiment 1</i>	5,1	3,8	3,0	3,0	3,6	4,1
Proef 2 <i>Experiment 2</i>	4,8	4,8	5,7	4,8	6,0	3,6
Proef 3 <i>Experiment 3</i>	5,0	6,1	5,1	5,2	4,8	4,7

43.5. Enkele oriënterende proeven over enzymactiviteiten van *Fusarium oxysporum* f. *lupini*

DEESE (1961) vond dat de enzymactiviteit van *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* gekweekt op gesteriliseerde stukjes tomatenstengel verschilde, al naar gelang de schimmel op stengelstukken van vatbare of resistente planten had gegroeid.

Bij het onderzoek over de enzymvorming door *Fusarium oxysporum* bij lupine werd de methode van DEESE gevolgd. Stukjes lupinestengel of -wortel met een totaal gewicht van 2 gr werden gesteriliseerd door dit materiaal gedurende 24 uren te doen verblijven in een fles van 2 l inhoud waarin een vaatje met 10 ml propyleenoxide was opgesteld. Daarna werden de stukjes overgebracht in erlemeyers van 250 ml, 2 maal met steriel water gewassen, waarna aan iedere erlemeyer 1 ml sporensuspensie werd toegevoegd. Incubatie had plaats bij 28 °C. Na 5 dagen werden de enzymen afgescheiden in een waterextract door aan ieder kolfje 45 ml water toe te voegen plus enkele druppels toluen. Daarna werden ze gedurende de nacht op een schudmachine geplaatst. De volgende dag werd gefiltreerd door kaasdoek, aangevuld tot 50 ml en gecentrifugeerd.

In viscosimeterbuizen volgens Fenske-Ostwald werd de viscositeitsverandering gemeten van een 1% natriumpolypectaatooplossing bij 35 °C. Gebruikt werden 10 ml substraat, 1 ml azijnzuurbuffer pH 5,8 en 4 ml extract. In drie experimenten werd weliswaar enige activiteit gemeten, doch deze was niet groot, terwijl geen verschillen werden gevonden tussen extract van schimmel gegroeid op vatbare en resistente planten.

Een bepaling van de pectinemethylesterase-activiteit van een van de extracten had plaats volgens de methode beschreven door WINSTEAD en WALKER (1954), waarbij methylgroepen van het pectinemolecuul worden gesplitst door werking van het enzym en het toenemend aantal carboxylgroepen wordt gemeten door titratie met 0,1 normaal loog.

De activiteit was zeer gering en er was geen verschil tussen vatbare en resistente planten.

Anders zijn de resultaten die werden verkregen van de cellulase-activiteit. Deze werd gemeten als viscositeitsverandering van een 1% methylcellulose oplossing en opgegeven in procenten door de volgende formule toe te passen:

$$A_n \text{ min} = \frac{t_i - t_n}{t_i - t_0} \cdot 100$$

A_n = percentage viscositeitsafname in n minuten.

t_i = tijd van stroming in seconden van een 1% methylcellulose oplossing plus geïnactiveerd enzym.

t_n = tijd van stroming in seconden bij een reactietijd van n minuten van 1% methylcellulose plus actief enzym.

t_0 = tijd van stroming van water plus geïnactiveerd enzym.

Enzymextract werd verkregen door *Fusarium* te laten groeien op 2 gram weefsel van 6 à 8 planten. De sterilisatie en de bereiding van de extracten had op dezelfde wijze plaats als bij het onderzoek op pectinase-activiteit. Als substraat werden gebruikt delen van wel of niet geïnoculeerde, vatbare of resistente planten. Het materiaal werd 15 dagen na inoculatie gesteriliseerd. Tussen het materiaal van niet geïnoculeerde vatbare en resistente planten viel geen verschil in cellulase-activiteit waar te nemen (tabel 26). Het extract van geïnoculeerde vatbare planten vertoonde een grotere cellulase-activiteit dan dat van niet geïnoculeerde planten. Op geïnoculeerde resistente planten was de productie van cellulase naar verhouding zeer gering. In een volgende proef, werden dezelfde resultaten verkregen.

TABEL 26. Cellulase-activiteit van extracten van *Fusarium* gekweekt op steriele plantendelen, afkomstig van al of niet geïnoculeerde resistente en vatbare planten. Sterilisatie 15 dagen na inoculatie. Gemeten is de viscositeitsverandering (in %) van een 1% methylcellulose oplossing.

TABLE 26. Cellulase activity of extracts of *Fusarium* grown on sterile plant tissue of resistant and susceptible plants. Sterilisation 15 days after inoculation. Changes in viscosity (in %) of 1% methylcellulose.

	w = wortel/ s = stengel/ root stem	Geïnoculeerd Inoculated	Niet geïnoculeerd Non-inoculated
Vatbaar/Susceptible. . .	w	75	35
	w	60	27
	s	78	42
	s		43
Resistent/Resistant . . .	w	14	38
	s	19	30
	s	19	

43.6. Samenvatting en bespreking

Perssapp van monsters van één bepaalde serie planten remde de schimmel-groei sterk. Het gelukte echter niet deze resultaten later te reproduceren. Op bloedingsvocht dat althans in de eerste tijd na infectie het milieu vormt waarin de schimmel in de plant groeit, werd verschil in groei van kiemhyfen vast-

gesteld tussen resistente en vatbare planten. Al zal het sap in de xyleemvaten niet zo geconcentreerd zijn als het bloedingsvocht, toch lijkt het waarschijnlijk dat het bij vatbare en resistente planten reeds vóór het binnendringen van de parasiet een substraat is waarop de groeimogelijkheden niet gelijk zijn. De waargenomen verschillen voor de toename van SN (zie 32.62. en 35.2.) zouden hierop althans ten dele kunnen berusten.

De aminozuren die in het bloedingsvocht aanwezig zijn, kunnen door de schimmel als C en N bron worden gebruikt. In vergelijking met vatbare planten waren in vocht van resistente planten 4 aminozuren in een geringere concentratie aanwezig, terwijl glutaminezuur ontbrak.

In oriënterende proeven kon geen kwalitatief of kwantitatief verschil in het voorkomen van phenolen worden vastgesteld voor vatbare en resistente planten. In wel en niet geïnoculeerde resistente planten was geen verschil in polyphenoloxydase-activiteit te constateren. De waargenomen afname van SN in resistente planten 14 dagen na inoculatie zal dus waarschijnlijk niet door dergelijke factoren worden veroorzaakt.

DEESE (1961) vond verschil in pectinase-activiteit voor *Fusarium oxysporum* gegroeid op steriel weefsel van vatbare en resistente rassen van tomaat of banaan. Door het toepassen van zijn techniek kon geen verschil tussen geïnoculeerde, vatbare en resistente lupineplanten worden vastgesteld. Schimmels gegroeid op weefsel van niet geïnoculeerde vatbare of resistente planten vertoonden geen verschil in cellulase-activiteit. Anders is het bij geïnoculeerde planten. Extract van *Fusarium* gegroeid op vatbare planten toonde dan een hoge activiteit, terwijl het na de groei op resistente planten een lage activiteit toonde. Behalve een nader onderzoek naar de factoren die het waargenomen groeiverschil teweegbrengen, zou het van belang zijn na te gaan of in resistente planten na een infectie enzymwerking van de schimmel wordt tegengegaan.

5. ALGEMENE SAMENVATTING

Door gebruik te maken van een techniek die als mixertechniek werd beschreven is aangetoond dat *Fusarium oxysporum* zich in de wortel van vatbare lupineplanten met een vaste regelmaat uitbreidt, zodat bij een laag aanvangsniveau de schimmel later op een bepaald niveau komt dan bij een hoog aanvangsniveau. De uitbreiding bleek af te hangen van de plaats waar de schimmel de groei in het xyleem begint. Dichtbij de wortelbasis of in het hypocotyl is de groei gering maar komt de schimmel van een jonger deel van de wortel dan is de toename van het schimmelniveau (= SN) sterker.

In de wortel van resistente planten heeft de schimmel een geringer uitbreidingsmogelijkheid dan in de wortel van vatbare planten. Gedurende de eerste 14 dagen neemt SN toe en daalt in de daaropvolgende 14 dagen; blijkbaar sterft de schimmel door onbekende oorzaak af tot een bepaald laag niveau bereikt is dat tot de bloei vrij constant blijft. Tijdens de bloei moet een verandering van het resistentie mechanisme plaats vinden, daar zowel in kas- als veldproeven werd aangetoond dat daarna SN sterk toeneemt.

Er is aangetoond dat bij een bepaalde grootte van de plant een bepaald SN moet zijn bereikt voor het optreden van symptomen. Bij een lager SN treden geen symptomen op. Deze omstandigheid doet zich voor bij de geringe uitbreiding in resistente planten en na de inoculatie van het hypocotyl van vatbare planten. Ook bij een zeer laag aanvangsniveau in vatbare planten ontsnapt hierdoor een vrij groot percentage planten aan het bereiken van de drempelwaarde voor SN.

Wanneer de schimmel niet direct in het hypocotyl is gebracht, maar hierin binnendringt vanuit de wortel, verloopt de toename van SN sneller. Blijkbaar worden in de wortel processen in gang gebracht die na binnendringen in het hypocotyl ook daar een bepaalde groei mogelijk maken.

Bij entproeven bleek enerzijds dat stengel en wortel van vatbare en resistente planten niet een dusdanige invloed op elkaar hebben dat de uitbreiding van de schimmel wordt beïnvloed, anderzijds kwam hier de betekenis van de groei in de wortel van de vatbare plant voor het ontstaan van symptomen opnieuw tot uiting. De verwelking van resistente hypocotylen van niet afgesneden tweelingenten waarvan de vatbare wortel was geïnfecteerd, toont aan dat de symptomen niet ontstaan door watertekort tengevolge van verstopping. Blijkbaar worden stoffen gevormd die de waterbalans verstoren.

De laatste jaren is herhaaldelijk geschreven over de betekenis van visceuse producten die in de xyleemvaten van aangetaste planten ontstaan onder invloed van door de schimmel afgescheiden enzymen (LUDWIG, 1952; DIMOND, 1959; PIERSON, GOTHOSKAR, WALKER en STAHMANN, 1955). Bij het anatomisch onderzoek van lupineplanten bleek dat in xyleemvaten van resistente planten meer propfen van visceus materiaal voorkomen dan in die van vatbare planten, zij zullen hier dus niet aan het ontstaan van symptomen meewerken. Deze propfen kunnen evenmin van betekenis zijn voor een blokkering van het sporentransport, zoals BECKMAN et al. (1962) bij bananen constateerden. Sporen bleken immers in het hypocotyl van vatbare of resistente lupineplanten geen dusdanige groei te geven dat ziektesymptomen ontstonden.

De geringe groei van de parasiet in de wortel van resistente planten is

klaarblijkelijk de belangrijkste reden van het uitblijven van symptomen. Gezien de resultaten van de bepaling van aminozuren en de geringe groei van de schimmel in het bloedingsvocht kan deze resistentie ten dele passief zijn, maar de daling van SN na 14 dagen bij injectieproeven wijst ook op een actief mechanisme. Nader dient te worden onderzocht of bij resistente planten na de infectie de activiteit van enzymen van de schimmel in de xyleemvaten wordt geremd, daar hiervoor in oriënterende proeven een aanwijzing werd verkregen die aan betekenis wint door de resultaten van GROSSMANN (1962) met een pectinase remstof.

6. SUMMARY

61. INTRODUCTION

The relation between host and pathogen in wilting diseases caused by *Fusarium oxysporum* has been studied by many authors. This relation was discussed and reviewed by DIMOND (1955), GÄUMANN (1957) and LUDWIG (1960). It is concluded that resistance is not correlated with insensitivity of the plant to products of the fungus produced in vitro. Since 1953 much attention has been paid to the importance of enzym activity in the plant but till now this is not yet clear. More recently BUXTON (1957, 1962) found a correlation between resistance and the effect of root exudates on the germination of spores. BECKMAN et al. (1962) supposed that part of the resistance in banana is due to the occlusion of xylem vessels by viscous material, which prevents distribution of the fungus through spores. DEESE (1961) concluded that a low enzymatic activity on sterilised tissue of resistant tomato plants is a cause of resistance, while GROSSMANN (1962) showed a decrease in the rate of disease by applying a pectinase inhibitor to the plant.

In our experiments host-parasite relations were studied with a susceptible and a resistant variety of *Lupinus luteus* L. and *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. *lupini* Sn. et Hans. An important part of these studies was the measurement of fungus growth in plants by a dilution plate method (see 62.). The results give some information about the nature of resistance. Also a relation was found between the quantity of *Fusarium* and the development of disease symptoms. It was shown that the root of a susceptible plant is of importance for the growth of the fungus. In the last part preliminary experiments are described regarding the plugging of xylem vessels by viscous material, growth of the fungus in exudation sap and enzym activity of the fungus on sterilised host substrate.

62. MATERIAL AND METHODS

In all experiments the susceptible variety Neven and the resistant breeding line R 147 of *Lupinus luteus* were used.

Four weeks old plants, grown in a fertile garden soil were used for inoculation. These plants have a well developed main root and a hypocotyl of about 4 cm length; stem elongation does not take place until after 6 weeks. Inoculated plants were transplanted in trays containing coarse sand to which HOAGLAND solution was added. The trays were kept at a temperature of 21 °C in Wisconsin tanks. An isolate of *F.o. lupini* race 2 (LAMBERTS, 1955) to which Neven was very susceptible and R 147 highly resistant was used throughout the experiments. The fungus was grown on pepton glucose agar at 27 °C; the temperature/growth relation is shown in fig. 1.

Several methods of inoculation were tried. External application of the inoculum by dipping into a conidial suspension, by pouring the suspension into the plant hole or by dripping it onto the roots gave reasonable results (tables 1-4). Internal application, however, by injection of 0.001 ml of a conidial suspension by means of a microsyringe turned out to be the best method for our purpose. It has the advantage that an exact dose can be applied, that the

initial fungus level (inoculation level) can be easily determined and that the development of the fungus can be followed from the moment of inoculation by a special method (mixertechnique). Moreover there was much less variation between plants of one plot than with any of the other methods.

The method referred to as mixertechnique, involving grinding of the plant material and plating out afterwards, appeared to give satisfactory quantitative results in determining the amount of fungus present. Grinding was carried out with water in a waring blender. A certain volume of the suspension obtained was mixed with pepton glucose agar and poured into petri dishes. The number of colonies appearing was counted and used as a criterion for the amount of *Fusarium* present in the plant. When high colony numbers were expected a dilution range was made. In greenhouse experiments the entire root or hypocotyl was used, unless mentioned otherwise. Of plants from the field 2 cm pieces of the root base or the stem were used. The number of colonies given in the tables refers to the part of the plant that was used. The quantity of fungus (whether mycelium, conidia or both), as determined by the number of colonies is indicated by SN. The initial quantity, determined directly after inoculation, is indicated by the same symbol.

To get information about the relation between the amount of fungus found by the mixertechnique and by an anatomical investigation, this amount was determined in both ways in adjacent pieces of a number of infected plants (table 6). The mixertechnique appears to be a very simple method as compared with the time consuming anatomical inspection and undoubtedly gives more reliable results.

Before grinding, the complete plants were disinfected. It proved to be extremely difficult to kill more than 95% of the fungus present externally on plants, without partly destroying the fungus inside at the same time. Spores in a suspension or on the surface of dead material were killed more easily than those present on a living plant (table 7).

63. THE DEVELOPMENT OF THE PARASITE IN THE PLANT

63.1. *Introductory experiments*

In introductory experiments the presence of the fungus was demonstrated by placing plant pieces on agar medium or by studying sections. The fungus could be found even in the stalk of the inflorescence of susceptible plants. In resistant plants hyphae were found in the root and also in the stem. Growth of *Fusarium oxysporum* in resistant plants has also been reported for several other hosts (see literature cited in 31.1).

The development of the fungus in plants from naturally infested fields has been investigated by applying the mixertechnique. Increase of the pathogen was much greater in susceptible plants than in resistant ones (tables 8 and 10). A sharp increase in resistant plants seems to occur after flowering, which happens at about the end of July (table 9). Browning of the vessels which was observed now and then in resistant plants was associated with a high amount of fungus (SN) (table 11). Variation in SN between plants of one plot, however, appeared to be very high, presumably caused by different factors, for instance variation in the number of infections. To gain a better impression

of the development of the pathogen, experiments were continued under more controlled conditions in the greenhouse.

The optimum dose of inoculum was determined experimentally. It was defined as the lowest amount of inoculum that results in the maximum effect, that is the maximal disease development in the shortest time under the conditions of the experiment. The optimum dose is different according to the method of inoculation (figs. 2 and 3). With the injection method, which was applied in nearly all experiments, it is about 1000 spores per plant (fig. 4). The number of spores per plant refers to the number of viable spores which is determined by the mixertechnique immediately after inoculation.

63.2. *Development of the pathogen in the root of susceptible plants*

The development of the pathogen was determined at two or three days intervals, starting with a low, a nearly optimal and a supra-optimal amount of inoculum (figs. 5, 6 and 7). SN was measured of samples of 25 plants.

When a low amount is applied three stages can be distinguished in the development of the fungus in the plant.

1. A decrease of SN during the first two days after inoculation.
2. A sharp increase of SN from the second to the fourth day.
3. A somewhat slower, constant increase of SN after the fourth day.

A hypothesis that on the second day the young mycelia are very sensitive to grinding and are partly killed by it, could not be substantiated. Some data indicate that injuring the plant influences fungus growth (fig. 8), whereas a mutual inhibition of the spores might also be involved (BOYD, 1952; SHEPHARD & MANDRIJK, 1962).

The relation between the amount of fungus (SN) and the time, for a low and an optimum inoculation level, is presented in fig. 7: the points on the 2nd and 4th day are average values, whereas for the period from the 5th–12th day the regression lines have been calculated. The most probable explanation for the sudden change in the angle of the lines on the fifth day seems to be a change in growth rate when a certain SN has been reached. The regression-lines run practical parallel, which indicates that the growth rate of the fungus can not exceed a certain value, at least in plants of the same size.

If it is supposed that a special fungus level (SN) in plants of the same size is correlated with wilting symptoms; this means that at a low dose—as shown in fig. 7 — the symptoms would appear about 3 days later. Indeed it appears from observations indicated in fig. 3 that the difference between the low and the optimal dose is 2 to 4 days.

A number of plants remain healthy when a low dose of inoculum is administered. This can not be explained by an escape from infection, because in such plants an increase in the amount of fungus could be demonstrated.

Determinations of the development of the fungus at a supra-optimal dose are not sufficient to get a comparable line, but they give the impression that at this dose the growth rate also does not exceed a certain value (fig. 6).

63.3. *The development of the pathogen in the root of resistant plants.*

Resistant plants were also analysed at different times after injection of a

spore suspension. Figure 9 shows an increase in the amount of fungus till 10–14 days after inoculation for a low and about an optimal level of inoculation of susceptible plants (10 and 1000 spores). From 14 days after inoculation the amount began to decrease. This decrease came to a stop 28–35 days after inoculation. After that SN remained more or less constant, till flowering time, when a large increase followed (fig. 10).

It is evident that from the beginning a resistance mechanism operates in resistant plants, because the increase which SN shows is smaller than in susceptible plants. The decrease of SN after 14 days may indicate that an active resistance mechanism kills mycelium (and perhaps conidia). Why this mechanism shows up more clearly after 14 days, and why SN remains practically unaltered till the 60th day after inoculation instead of decreasing further, remains an open question. The large increase of SN after flowering must be attributed to physiological changes in the plant during this stage, as a result of which the aging tissue may lose an inhibiting factor.

Resistant plants showed no visible reaction to injection of a very large number of spores into the roots, only a decrease in SN could be observed (fig. 9).

63.4. *The relation between the amount of Fusarium in the plants and the appearance of wilting symptoms*

In different papers concerning the action of toxic substances produced by *Fusarium oxysporum* it is shown that resistant and susceptible plants always respond to these substances by the same wilting symptoms. Because of the small increase in the quantity of the mycelium in resistant tomato plants compared with the increase in susceptible ones, GÄUMANN (1957) supposes that the resistance is connected with the impossibility for the fungus to grow in a resistant plant in the same way as in a susceptible one.

In our experiments the amount of fungus present in lupins showing the first wilting symptoms was different according to the size (age) of the plants (table 12). In plants of the same size the symptoms only appear when a certain SN has been reached (table 13). Apparently the fungus does not produce enough toxic substances to cause symptoms as long as SN remains below a certain threshold value. In resistant and in a greater part of susceptible plants inoculated with a very low dose, SN has been found to remain below this value. These plants show no symptoms but they have not escaped infection.

63.5. *Development of the fungus in the hypocotyl*

By some investigators the susceptibility of stems to *Fusarium oxysporum* was examined after a direct inoculation of this part of the plant. HOOD & STEWART (1957) found no differences between resistant and susceptible varieties of *Dianthus*; SCHEFFER & WALKER (1954), however, showed differences in the susceptibility of tomato stems.

The development of the disease in susceptible lupin plants after inoculation of the hypocotyl, showed this part of the plant to be resistant to *Fusarium oxysporum* (table 14). This was also shown by the increase of SN, which was much slower than in the roots (table 15 and fig. 11). In the hypocotyl of the resistant plant there was still a smaller increase as compared to the susceptible plant (table 16 and fig. 11).

It is remarkable that SN increases at quite a different rate when the fungus grows from the root into the hypocotyl (fig. 12). Several explanations are possible.

1. Through the mycelium nutrients are transported from the root to the stem.

2. The fungus produces compounds in the roots, which are transported to the stem and make it more susceptible.

3. The root creates a medium so favourable for the development of *Fusarium* that its influence is still felt when the fungus grows into the hypocotyl. This might be explained for instance by assuming the production of adaptive enzymes during growth in the roots, which make it possible for the fungus to attack substrates in the hypocotyl that may remain inaccessible otherwise.

66. IMPORTANCE OF THE ROOT FOR THE DEVELOPMENT OF THE FUNGUS

In agreement with the data from the literature (HEINZE & ANDRUS, 1945; KEYWORTH, 1953; TALBOYS & WILSON, 1956) grafts of a resistant stem on a susceptible root ($R \cdot / \cdot V$) and a susceptible stem on susceptible root ($V \cdot / \cdot V$) were shown to wilt after inoculation of the root. The grafts $V \cdot / \cdot R$ and $R \cdot / \cdot R$ remained healthy.

To study the influence of the scions on the roots, grafts were inoculated in the roots and 17 days later roots and hypocotyls were examined separately. The amount of fungus present in roots derived from susceptible and resistant plants proved to show the usual differences. Between hypocotyls from susceptible and resistant plants smaller differences were observed (fig. 13).

When only the hypocotyl of a graft is inoculated, the kind of root does not influence the development of the fungus in the hypocotyl (table 17). A factor which influences the resistance of the stem is not demonstrated in this way. These results confirm the conclusion that in R and V hypocotyls SN increases in a different rate; they also show that the different growth in the hypocotyl given in figure 13 is related to the development of the fungus in the roots.

Resistant plants never showed disease symptoms after inoculation. Resistant parts of non-separated grafts (RV/RV), however, showed disease symptoms after inoculation of the susceptible roots. This was found also by MAY (1930) and by TALBOYS & WILSON (1956). In this case wilting could not be caused by shortage of water as in the graft $R \cdot / \cdot V$. It indicates that the infection of the susceptible root is of primary importance. In sections of the resistant part of this combination (RV/RV) the fungus could be observed in the stem, but it did not extend as far as in susceptible ones.

It was demonstrated in several ways that spores are transported in xylem vessels. The spores were distributed in the whole plant 24 hours after dipping the slightly damaged roots in a spore suspension.

On cuttings made from plants inoculated in the roots, the following observations were made. Cuttings made till three days after inoculation generally remain healthy, whereas cuttings made on the seventh day and later practically all wilt (table 18). A transition period is observed between the 3rd and 7th day after inoculation. In other experiments mycelium was shown to grow from the root into the hypocotyl 3–9 days after inoculation (fig. 12). Therefore it is probable that wilting of the cuttings is due to the presence of my-

celium in the stem at the time of cutting. In that case no transport of spores is involved. When spores had been transported, their germination would not have an important influence on the course of the disease. This conclusion is supported by the observation that wilting can not be induced by injecting spores in the hypocotyl as mentioned in 65.

Fewer plants start wilting and SN increases less after injection of spores into the root base – via the hypocotyl or directly – than after inoculation of the root in the ordinary way in the direction of the tip of the root (table 19 and fig. 14). These results may mean that injuring the cortex has influence on the development of the fungus. To investigate this, the root tip was removed and a spore suspension was injected from below into the xylem or the cortex. A larger number of plants became diseased after injection into the xylem (table 20 and fig. 15). Apparently injuring of the cortex has no influence.

Another cause for the differences shown in table 19 may be the growth of the fungus at different distances from the hypocotyl. In table 21 is shown that indeed the severity of the disease after 31 days is different according to injection at a different distance of the root base. In one experiment the quantity of fungus was determined by application of the mixertechnique. The average of 26 plants was 21 days after injection close to the root base: 32 colonies; 3 cm from the root base: 250 colonies.

These results show that the fungus develops at different rates in different parts of the root. Between root and stem there is no sharp limit. A more gradual transition may originate from a physiologic conversion. About such a conversion very few information is available (KRAMER, 1956).

67. PRELIMINARY EXPERIMENTS ON THE NATURE OF THE RESISTANCE

67.1. *Histological examination*

As would be expected the percentage of xylem vessels containing mycelium is higher in susceptible than in resistant plants. Besides mycelium, viscous substances could be observed in the xylem vessels of inoculated lupins (Plate I, fig. 4). These substances have also been found by other investigators who assume a relation between their presence and the development of symptoms (LUDWIG, 1952; DIMOND, 1959, see also 33.1). It is not probable, however, that in lupins these substances are of much importance in inducing wilting of the plants by plugging of the vessels, as resistant plants contain more viscous materials than susceptible ones (table 22). These results are in agreement with those of SMITH & WALKER (1930) and SCHROEDER & WALKER (1942). According to BECKMAN et al. (1962) resistance of banana plants is increased by the presence of plugs of this kind, because they inhibit transport of the spores. This can not be the case here, for the germination of spores in the stem of lupins did not result in disease development in these plants.

In sections was also seen that the hyphae of *Fusarium* do not only grow through the pits of the xylem vessels, but they even penetrate the walls of the libriform fibres. Apparently the fungus is able to attack the compounds of the lignified walls (plate I, fig. 5).

67.2 *Response of lupin plants to culture filtrates*

Both susceptible and resistant lupins were demonstrated to respond to filtrates of liquid cultures of *Fusarium* by wilting, as has also been found for other plant species by several investigators (see 33.1). After heating, filtrates still induce browning of the vessels in lupins, contrary to the results known from the literature for other plants.

67.3 *Experiments with exudation sap and fungus extracts*

Hyphae from germinating spores were repeatedly found to grow better in exudation sap collected from the cut ends of the stems of susceptible than in sap of resistant plants (fig. 16 and plate II, figs. 2 and 3). Differences in composition of the sap may be responsible for differences in the development of the fungus, although it should be taken into account that exudation sap is not quite comparable to sap in the vessels of transpiring plants.

Exudation sap of resistant plants contained three amino acids and an amide – leucine, aspartic acid, alanine and asparagine – in a lower concentration as compared to that of susceptible plants (table 23), whereas in susceptible plants also glutaminic acid was found. The sap of inoculated plants, collected shortly after inoculation, had a lower amino acid content than that of uninoculated plants (table 24). This shows that the fungus utilises the amino acids, which is in agreement with the results of VAN ANDEL (1956).

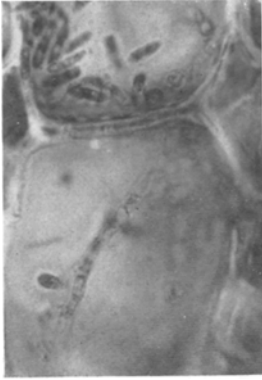
There is no indication of a relation between the resistance and the content of phenols or the polyphenoloxylase activity (table 25).

Mycelium grown on sterilised tissue of previously inoculated susceptible or resistant plants did not show any differences in pectinase activity. This is not in agreement with the results of DEESE (1961) for tomatoes. No differences in cellulase activity could be demonstrated either. However, some experiments indicated a lower cellulase activity for mycelium grown on tissue of inoculated resistant plants (table 26). This is of interest when compared to the results of GROSSMANN (1962).

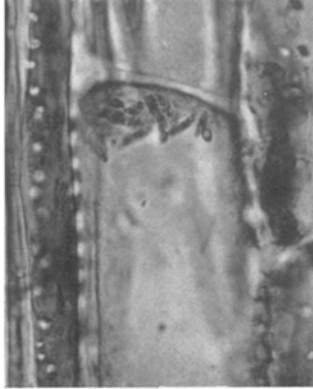
ACKNOWLEDGEMENT

The author is greatly indebted to Prof. Dr. A. J. P. OORT for his continued interest and his help in the preparation of the manuscript.

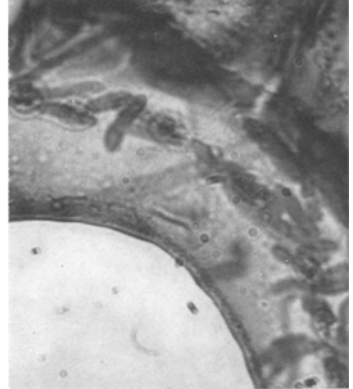
PLAAT I



I-1



I-2



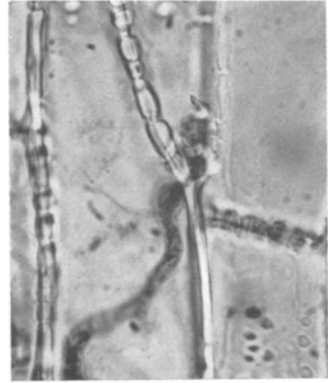
I-3



I-4



I-5



I-6

FIG. 1. Vorming van een microconidium in een xyleemvat.

Formation of a microconidium in a xylem vessel.

FIG. 2 EN 3. Microconidien liggend tegen het restant van een tussenschot in een xyleemvat.

Figure 2: lengtedoorsnede; figuur 3: dwarsdoorsnede.

Microconidia against the rest of a perforated plate in a xylem vessel. Figure 2: longitudinal section; figure 3: cross section.

FIG. 4. Bruin granulair materiaal dat is samengetrokken, hetgeen duidt op visceuze eigenschappen.

Brownish granular material which is contracted, thus showing a viscous character.

FIG. 5. Groei van een dunne hyfe vanuit een mergstraalcel door de wand van een libriform-vezel heen naar het lumen.

Growth of a thin hypha from a cell of wood parenchyma through the wall of a libriform-fiber to the lumen.

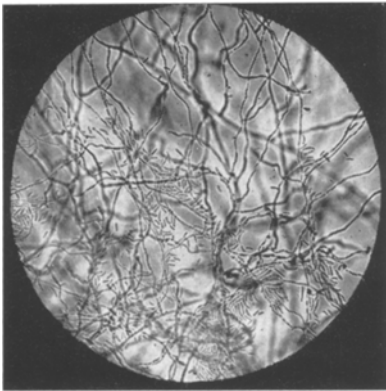
FIG. 6. Groei van een hyfe door de wand van een tracheïde.

Growth of a hypha through a tracheid wall.

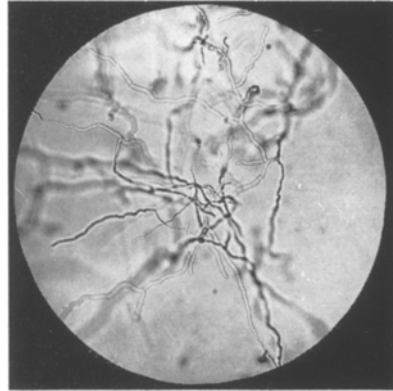
PLAAT II



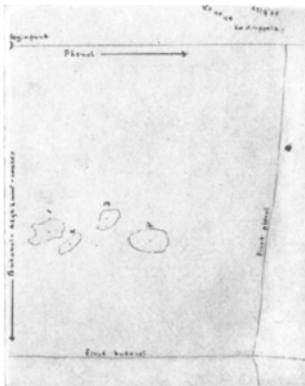
II-1



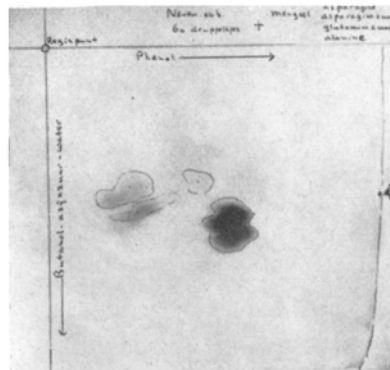
II-2



II-3



II-4



II-5

FIG. 1. De entmethode volgens MAY.

The grafting method according to MAY.

FIG. 2 EN 3. De kieming van conidien in steriel bloedingsvocht. Figuur 2: sap van vatbare planten; figuur 3: sap van resistente planten.

Germination of conidia in sterile exudation sap. Figure 2: sap of susceptible plants; figure 3: sap of resistant plants.

FIG. 4 en 5. Papierchromatogrammen van bloedingsvocht van vatbare planten (figuur 4) en van dit vocht plus 4 bekende aminozuren: asparagine, asparaginezuur, glutaminezuur en alanine (figuur 5). Reagens ninhydrine.

Paperchromatograms of exudation sap of susceptible plants (figure 3) and of this sap mixed with 4 known amino acids: asparagine, aspartic acid, glutamic acid and alanine (figure 4).

LITERATUUR

- ANDEL, O. M. VAN, – 1956. The importance of amino acids for the development of *Fusarium oxysporum* f. *lupini* Sn. et H. in the xylem of lupins. *Acta Bot. Neerl.* 5: 280–286.
- ANDERSON, M. E. & J. C. WALKER, – 1935. Histological studies of Wisconsin Hollander and Wisconsin Ballhead cabbage in relation to resistance to yellows. *J. agric. Res.* 50: 823–836.
- APPEL, O. & H. W. WOLLENWEBER, – 1910. Grundlagen einer Monografie der Gattung *Fusarium*. *Arb. Kaiserl. biol. Anst. L. u. F. Wirtschaft* 8: 1–207.
- ARMSTRONG, G. M. & J. K. ARMSTRONG, – 1948. Nonsusceptible hosts as carriers of wilt *Fusaria*. *Phytopathology* 38: 808–826.
- BAUMGARDT, J. P., – 1953. A study of *Fusarium* wilt resistance in tomato plants. *Rev. appl. Myc.* 32: 454 (1954).
- BECKMAN, C. H., S. HALMOS & M. E. MACE, – 1962. The interaction of host, pathogen and soil temperature in relation to susceptibility to *Fusarium* wilt of bananas. *Phytopathology* 52: 134–140.
- BERRY, S. Z. & C. A. THOMAS, – 1961. Influence of soil temperature, isolates and method of inoculation on resistance of mint to *Verticillium* wilt. *Phytopathology* 51: 169–174.
- BEWLEY, W. F., – 1922. Sleepy disease of the tomato. *Ann. appl. Biol.* 9: 116–134.
- BOYD, A. E. W., – 1952. Dry rot disease of the potato IV. *Ann. appl. Biol.* 39: 322–329.
- BUXTON, E. W., – 1957a. Some effects of pea root exudates on physiologic races of *Fusarium oxysporum* Fr. f. *pisi* (Linf.) Sn. et H. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 40: 145–154.
- BUXTON, E. W., – 1957b. Differential rhizosphere effects of three pea cultivars on physiologic races of *Fusarium oxysporum* Fr. f. *pisi* (Linf.) Sn. et H. *Transact. Brit. mycol. Soc.* 40: 305–317.
- BUXTON, E. W., – 1962. Root exudates from banana and their relationship to strains of the *Fusarium* causing Panama wilt. *Ann. appl. Biol.* 50: 269–283.
- CRAMER, F., – 1954. *Papierchromatografie*. Chemie, Weinheim.
- DAVIS, D., P. E. WAGGONER & A. E. DIMOND, – 1953. Conjugated phenols in the *Fusarium* wilt syndrome. *Nature* 172: 959–961.
- DEESE, C. D. & M. A. STAHMANN, – 1961. Pectic enzymformation by *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* on susceptible and resistant tomato stems. Ph. D. Thesis, Wisconsin, microfilm.
- DHARMARAJULA, K., – 1932. A study of the pathological anatomy of the cotton plant in connection with the wilt disease. *Indian J. agric. Sci.* 2: 293–313.
- DIMOND, A. E. & P. E. WAGGONER, – 1953a. On the nature and role of vivotoxins in plant disease. *Phytopathology* 43: 229–235.
- DIMOND, A. E. & P. E. WAGGONER, – 1953b. The cause of epinastic symptoms in *Fusarium* wilt of tomatoes. *Phytopathology* 43: 663–669.
- DIMOND, A. E., – 1955. Pathogenesis in the wilt diseases. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 6: 329–351.
- DIMOND, A. E., – 1959. Pathogenesis in the *Fusarium* wilt diseases. *Transact. New York Acad. Sci.* 21 (7): 609–612.
- FARKAS, G. L. & Z. KIRALY, – 1962. Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance. *Phytopath. Z.* 44: 105–151.
- GÄUMANN, E., – 1945. *Pflanzliche Infektionslehre*. Birkhäuser, Basel.
- GÄUMANN, E., – 1957. Über Fusarinsäure als Welketoxin. *Phytopath. Z.* 29: 1–44.
- GOTHOSKAR, S. S., R. P. SCHEFFER, J. C. WALKER & M. A. STAHMANN, – 1953. The role of pectic enzymes in *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology* 43: 535–536.
- GROSSMANN, F., – 1962. Untersuchungen über die Hemmung pektolytischer Enzyme von *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* III, Wirkung einiger Hemmstoffe in vivo. *Phytopath. Z.* 45: 139–160.
- HARPER, J. L., – 1950. Studies on the resistance of certain varieties of banana to Panama disease. I Internal factors for resistance and antibiotics. *Plant and soil* 2: 274–382.
- HAYMAKER, H. H., – 1928. Pathogenicity of two strains of the tomato wilt fungus, *Fusarium lycopersici* Sacc. *J. agric. Res.* 36: 675–695.
- HEINZE, P. M. & C. F. ANDRUS, – 1945. Apparant localization of *Fusarium* wilt resistance in the Pan America tomato. *Am. J. Bot.* 32: 62–66.
- HOOD, J. R. & R. N. STEWART, – 1957. Factors affecting symptom expression in *Fusarium* wilt of *Dianthus*. *Phytopathology* 47: 173–178.

- HUSAIN, A. & A. E. DIMOND, - 1960. Role of cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. *Phytopathology* 50: 329-331.
- JOHANSEN, D. A., - 1940. *Plantmicrotechnique*. Mc. Graw Hill, New York and London.
- KALYANASUNDARAM, R. & C. S. VANKATA RAM, - 1956. Fusaric acid in *Fusarium* infected cotton plants. *J. Indian Bot. Soc.* 35: 7-10.
- KEYWORTH, W. G., - 1953. Resistance of hop stems to invasion by *Verticillium albo-atrum*. *Nature* 171: 656.
- KERN, H. & D. KLUEPPEL, - 1956. Die Bildung von Fusarinsäure durch *Fusarium lycopersici* in vivo. *Experientia* 12: 181.
- KOSSWIG, W., - 1955. Die Symptomatologie der Fusariumwelken der Gurke (*Cucumis sativus* L.) und ihr Verhältnis zu den Welkekrankheiten anderer Pflanzen. Parey, Berlin.
- KRAMER, P. J., - 1956. Roots as absorbing organs. In: *Encyclopedia of Plant Physiology* (W. Ruhland) III, Water relations of plants: 188-209. Springer, Berlin.
- LAKSMINARAYANAN, K. & D. SUBRAMANIAN, - 1955. Is Fusaric acid a vivotoxin? *Nature* 176: 697-698.
- LAMBERTS, H., - 1955. Verbreding van de grondslagen voor de veredeling van gele voederlupinen. Ph. D. Diss., Wageningen.
- LINFORD, H., - 1928. A *Fusarium* wilt of peas in Wisconsin. *Agr. Exp. Stat. Un. Wisconsin. Res. Bull.* 85.
- LUDWIG, R. A., - 1952. Studies on the physiology of hydromycotic wilting in the tomato plant. *Mac Donald College techn. Bull.* 20.
- LUDWIG, R. A., - 1960. Toxins. In: *Plant Pathology* (J. G. Horsfall & A. E. Dimond) II: 315-349. Ac Press, New York and London.
- MAY, C., - 1930. The effect of grafting on resistance and susceptibility of tomatoes to *Fusarium* wilt. *Phytopathology* 20: 519-521.
- MENON, R. & L. SCHACHINGER, - 1957. Die Rolle des Phenols bei der Widerstandsfähigkeit von Tomatenpflanzen gegen Infektionen. *Ber. dtsh. Bot. Ges.* 70: 11-20.
- PIERSON, C. F., S. S. GOTHOSKAR, J. C. WALKER & M. A. STAHMANN, - 1955. Histological studies on the role of pectic enzymes in the development of *Fusarium* wilt symptoms in tomato. *Phytopathology* 45: 514-527.
- RAMAH KRISHNAN, T. S. & S. DAMODARAN, - 1958. Observations on the wilt disease of the Banana. *Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B.* 43: 213-222.
- RISBETH, J., - 1955. *Fusarium* wilt of Bananas in Jamaica. *Ann. Bot.* 19: 293-328.
- RICHTER, H., - 1938. Lupinenkrankheiten. *Mitt. biol. Reichsanst. L. u. F. Wirtschaft* 58.
- SMITH, ROSE & J. C. WALKER, - 1930. A cytological study of cabbage plants in strains susceptible or resistant to yellows. *J. agric. Res.* 41: 17-35.
- SAALTINK, G. J., - 1955. Het binnendringen van *Fusarium oxysporum* in resistente lupineplanten. *Tijdschr. Pl. Ziekten* 61: 23.
- SAALTINK, G. J., - 1959. Het uitwendig steriliseren van planten bij fytopathologisch onderzoek. *Tijdschr. Pl. Ziekten* 65: 138-141.
- SCHEFFER, R. P. & J. C. WALKER, - 1953. The physiology of *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology* 43: 116-125.
- SCHEFFER, R. P. & J. C. WALKER, - 1954. Distribution and nature of *Fusarium* resistance in the tomato plant. *Phytopathology* 44: 94-101.
- SCHEFFER, R. P., - 1957. Grafting experiments with *Fusarium* wilt resistant and susceptible tomato plants. *Phytopathology* 47: 30.
- SCHIKORRA, G., - 1906. *Fusarium* Krankheiten der Leguminosen. *Arb. Kaiserl. biol. Anst. L. u. F. Wirtschaft* 5: 157-188.
- SCHROEDER, W. T. & J. C. WALKER, - 1942. Influence of controlled environment and nutrition on the resistance of garden pea to *Fusarium* wilt. *J. agric. Res.* 65: 221-248.
- SHEPARD, C. J. & M. MANDRIJK, - 1962. Auto inhibitors of germination and sporulation in *Peronospora tabacina* Adam. *Trans. Brit. myc. Soc.* 45: 233-244.
- SNYDER, W. C., K. F. BAKER & H. N. HANSEN, - 1946. Interpretation of resistance to *Fusarium* wilt in tomato. *Science* 103: 707-708.
- TALBOYS, P. W. & J. F. WILSON, - 1956. A study of wilt tolerance in the hop by means of intervarietal graft complexes. *Ann. Report of the East Malling Res. Station* 1955: 126-130.
- TISDALE, W. H., - 1917. A study of the nature and inheritance of wilt resistance. *J. agric. Res.* 11: 573-607.
- ULLSTRUP, A. J., - 1937. Histological studies on the wilt of china aster. *Phytopathology* 27: 737-748.

- WAGGONER, P. E. & A. E. DIMOND, – 1955. Production and role of extracellular pectic enzymes of *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. *Phytopathology* 45: 79–87.
- WENT, JOH. C., – 1934, *Fusarium* aantastingen van erwten. Ph. D. Diss., Utrecht.
- WINSTEAD, N. N. & J. C. WALKER, – 1954. Production of vascular browning of metabolites from several pathogens, *Phytopathology* 44: 153–158.
- ZEEVAART, J., – 1955. Amino-zuren als koolstofbron voor *Fusarium oxysporum* in de houtvaten van lupineplanten, *Tijdschr. Pl. Ziekten* 61: 76–78.

CORRIGENDUM

In fig. 11 op blz. 38 betekent ●—● = vatbare planten, ○—○ = resistente planten.
Fig. 11 on p. 38, read: ●—● = susceptible plants, ○—○ = resistant plants.