

HOOFDSTUK II.

ISOLATIE VAN PHOMA APIICOLA KLEBAHN.

1. *Isolutie en Kweekmethoden.*

Uitgangsmateriaal. Als uitgangsmateriaal gebruikte ik in hoofdzaak zieke planten, afkomstig van velden uit de omgeving van Venlo (zwarte humusrijke zandgrond) en van Maastricht (kleigrond). ¹⁾

De knollen, waarmee ik in Januari 1926 het onderzoek begon, waren een tijd lang in een vorstvrijen kelder bewaard. Het gelukte mij niet pycniden te vinden, zoodat ik ter isoleering van de zwam uitging van stukjes knol, uitgesneden op de grens van het zieke en gezonde weefsel.

Toen ik in den herfst van dat jaar in beide tuinbouwcentra versch materiaal kon verzamelen, gelukte het mij op alle zieke knollen, zoowel op den voet van den verbreedten bladsteel als op den knol zelf, vele pycniden te vinden. De cultures, die ik door uitzaaiing der pycnosporen verkreeg, werden toen vergeleken met de cultures, die ik in het voorjaar verkregen had uit de knolstukjes.

Isolutie van mycelium. Kleine stukjes knol, steriel gesneden op plaatsen, waar de donkere verkleuring van het zieke weefsel overgaat in de witte kleur van het gezonde, werden in verschillende petrischalen op selderij-agar uitgelegd (zie voor de samenstelling van deze agar pag. 284). Uit al deze stukjes kwamen spoedig groote massa's bacteriën te voorschijn zonder dat er iets van mycelium te bespeuren was. Bij een tweede poging, waarbij de stukjes iets dieper uit den knol gesneden waren, trad er bij enkele stukjes naast bacterie-ontwikkeling ook een mycelium op. Door eenige overentingen kon een witgrijze zwam, die veel luchtmycelium vormde, geïsoleerd worden.

Daar op grond van BENNETT's onderzoek verwacht kon worden, dat op gesteriliseerde knolselderij *Phoma apiicola* spoedig pycniden zou vormen, werd de geïsoleerde zwam in een aantal buizen op dezen voedingsbodem geënt.

¹⁾ Het past hier een woord van dank te brengen aan Ir. W. G. VAN DER KROFT, Rijkstuinbouwconsulent te Maastricht en W. DRIESSEN, tuinder te Venlo, die ik steeds gaarne bereid vond mij behulpzaam te zijn, hetzij met het verstrekken van gegevens of met het verzamelen en toezenden van zieke planten.

Door meting der pycniden en pycnosporen en daarop volgende infectie van planten zou met voldoende zekerheid zijn uit te maken of de geïsoleerde zwam met de door KLEBAHN bedoelde overeenkwam.

Het was verder mijn plan door uitzaaiing eener verdunde sporensuspensie éénsporecultures te verkrijgen. Wanneer men een zeer dunne laag agar gebruikt en zorgt, dat er op een plaat niet meer dan 20 of 30 sporen terecht komen, kan men met voldoende zekerheid onder het microscoop éénsporecultures isoleren, vooral wanneer men deze uitzaaiing eenige malen herhaalt.

Voedingsbodems. BENNETT kweekte de zwam o.a. op standaard nutrient agar, dextrose agar, gekookte rijst, COONS' en RICHARDS' synthetische voedingsoplossing, gekookte knolselderij enz. Op gekookte knolselderij en vooral op filtreerpapier, gedrenkt in COONS' voedingsoplossing, werden pycniden gevormd. De meest voor mijn onderzoek gebruikte voedingsbodems bestonden uit gestoomde plantendeelen of plantaardige aftreksels, die door agar vast gemaakt werden. Een nadere beschrijving hiervan is niet noodig. Alleen volge hier een korte opgave van enkele voedingsbodems, waarvan in dit onderzoek meermalen sprake is en die een nadere aanduiding behoeven.

Selderij-agar. 500 gram selderij-knol in stukken snijden; gedurende 2 à 2½ uur koken in 1½ L. water. De selderij-stukjes uitspersen, de vloeistof warm filtreren en daarna aanvullen tot 1½ L. Na bekoeling opnieuw filtreren, verwarmen en dan 1½ L. warme 3 % agar-oplossing toevoegen. Zoo nodig andermaal filtreren.

Selderij-stelen. Stukjes bladstelen ter lengte van ongeveer 7 à 8 cm werden in een cultuurbuis gezet in het benedeneinde waarvan een kleine hoeveelheid water gebracht was, zoodat het in de buis voldoende vochtig bleef. Later werd gevonden, dat deze voedingsbodem nog te verbeteren was door de stelen, na de sterilisatie met behulp van een steriele ronde staaf tegen den glaswand plat te drukken. Men verkrijgt op die manier een gelijkmatige dunne voedingsbodem, waarop ook de beide macro-vormen nog spoediger dan op niet platgedrukte stelen hun pycniden doen ontstaan. Plaat XVII, fig. 3.

Bladaftreksel. Afgestorven bladeren, die in den herfst op een selderijveld verzameld waren, werden in een verwarmde kamer te drogen gelegd, vervolgens door een warme luchtstroom verder gedroogd.

Vijftien gram dezer droge bladeren werden gedurende 2 à 3 uur in 1 L. water gekookt. De vloeistof werd daarna gefiltreerd en aangevuld tot 1 L. en na bekoeling opnieuw gefiltreerd.

COONS' synthetische voedings-oplossing. (1916). Alvorens de eigenlijke voedingsoplossing samen te stellen, kan men gemakshalve vooraf de volgende geconcentreerde oplossingen ($M/5$) gereed maken.

Magnesiumsulfaat + 7 aq..	2,466 gr.	+	50 cc. water.
Monokaliumfosfaat	1,36	„	+ 50 „ „
Asparagine	1,33	„	+ 50 „ „
Maltose	3,60	„	+ 50 „ „

Voor 100 cc. voedingsoplossing neme men 1 cc. van deze magnesiumsulfaat- en van deze asparagine-oplossing; en 5 cc. van elk der beide overige geconcentreerde oplossingen; tenslotte voege men 88 cc. water toe.

RICHARDS' synthetische voedings-oplossing. (PRATT 1924).

Kaliumnitraat	10 gram.
Monokaliumfosfaat	5 „
Rietsuiker	50 „
Magnesiumsulfaat	2,5 „
IJzerchloride	een spoor.
Water	1000 c.c.

Gebruik der vloeibare voedings-oplossingen. Deze drie voedingsoplossingen werden op de volgende manier gebruikt. In cultuurbuizen werd een opgerold stuk filtreerpapier gezet, dat tot $\frac{3}{4}$ van de hoogte der buis reikte. In de buis werd vervolgens 10 cc. van een der voedingsoplossingen gegoten. De buizen werden daarna gesteriliseerd.

Sterilisatie geschiedde steeds door plaatsing op drie achtereenvolgende dagen in een autoclaaf bij $\frac{1}{2}$ atm. overdruk.

2. Een micro- en een macro-vorm van *Phoma apiicola* KLEBAHN.

De cultuurbuizen met de gesteriliseerde knolselderij, waarop het geïsoleerde mycelium geënt was, werden geplaatst in diffuus daglicht bij kamertemperatuur (17° — 21° C.). Twintig dezer buizen waren aanwezig zoowel met de cultures geïsoleerd van de Maastrichtsche als van de Venlosche zieke knollen.

Zeer spoedig werd in al deze buizen overvloedig mycelium gevormd, zoodat zij na korten tijd geheel daarmee gevuld waren. Aanvankelijk waren geen pycniden te zien; de eerste werden opgemerkt na een maand, terwijl er daarna meer ontstonden. Het viel mij echter op, dat het aantal pycniden in deze buizen

nogal verschilde. Dit was zoowel het geval bij de Maastrichtsche als bij de Venlosche cultures.

Uit eenige buizen van beide partijen werden een aantal pycniden geïsoleerd en hiervan een verdunde sporensuspensie uitgezaaid in petriscalen in een kleine hoeveelheid lauw warme agar.

Daar op dat oogenblik geen selderij-agar meer aanwezig was, werden de op dezen agar ontkiemde sporen overgebracht in schalen met kers-agar en deze in een thermostaat bij 24° C. geplaatst. Na een paar dagen bleek dat sommige dezer cultures niet uitgegroeid waren. Dit was het geval zoowel bij de Maastrichtsche als bij de Venlosche isolaties. Op de plaats, waar de ontkiemde sporen geënt waren, hadden zich in den agar bruine korreltjes gevormd. Andere overgebrachte ontkiemde sporen groeiden uitstekend en vormden een dik grijsachtig wit mycelium.

Ofschoon dergelijke slecht-groeiende cultures zoowel bij de Maastrichtsche als bij de Venlosche isolaties werden geconstateerd, dacht ik aanvankelijk nog aan ongunstige omstandigheden, die sommige der overentingën hadden doen mislukken. Om hieromtrent zekerheid te verkrijgen, werd de geheele hiervoor beschreven isolatie nogmaals uitgevoerd. Het resultaat was hetzelfde als hiervoor is weergegeven. Het lag toen voor de hand te veronderstellen, dat zoowel bij de Venlosche als bij de Maastrichtsche isolaties twee verschillende zwamvormen aanwezig waren, waarvan de eene goed op kers-agar groeit de andere niet.

Om nader uit te maken of deze veronderstelling juist was, werden pycnosporen, zoowel der Venlosche als der Maastrichtsche cultuur, afkomstig van bovengenoemde gesteriliseerde knolselderij, uitgezaaid op selderij-agar, daarnaast ook op kers-agar. Het bleek spoedig, dat de ontkieming op selderij-agar vlugger plaats vond dan op kers-agar en verder dat een temperatuur afwisselend tusschen 17° en 21° C. een weinig gunstiger was dan een constante temperatuur van 24° C., zooals onderstaand lijstje nader moge aantoonen. Er was ook in dit opzicht geen verschil te constateren tusschen de Venlosche en Maastrichtsche isolaties.

Tijd, noodig voor het zichtbaar worden der kolonies van Venlosche en Maastrichtsche herkomst.

Uitgezaaid in	Bij 17°—21° C.	Bij 24° C.
Selderij-agar.....	4 dagen	4 dagen
Kers-agar	7 dagen	8 dagen

Deze proef was in triplo uitgevoerd. De zeer jonge kolonies in de 3×4 petriscalen waren met het bloote oog niet van elkaar te onderscheiden en niets deed vermoeden, dat twee vormen aanwezig zouden zijn.

Eenige geheel afzonderlijk liggende kolonies werden uit de petriscalen met selderij-agar afgezonderd en overgebracht op andere schalen met selderij-agar. De helft dezer schalen werd gezet bij een wisselende temperatuur van 17° — 21° C., de andere helft bij een constante temperatuur van 24° C. Thans groeiden alle geïsoleerde kolonies uitstekend bij beide temperaturen.

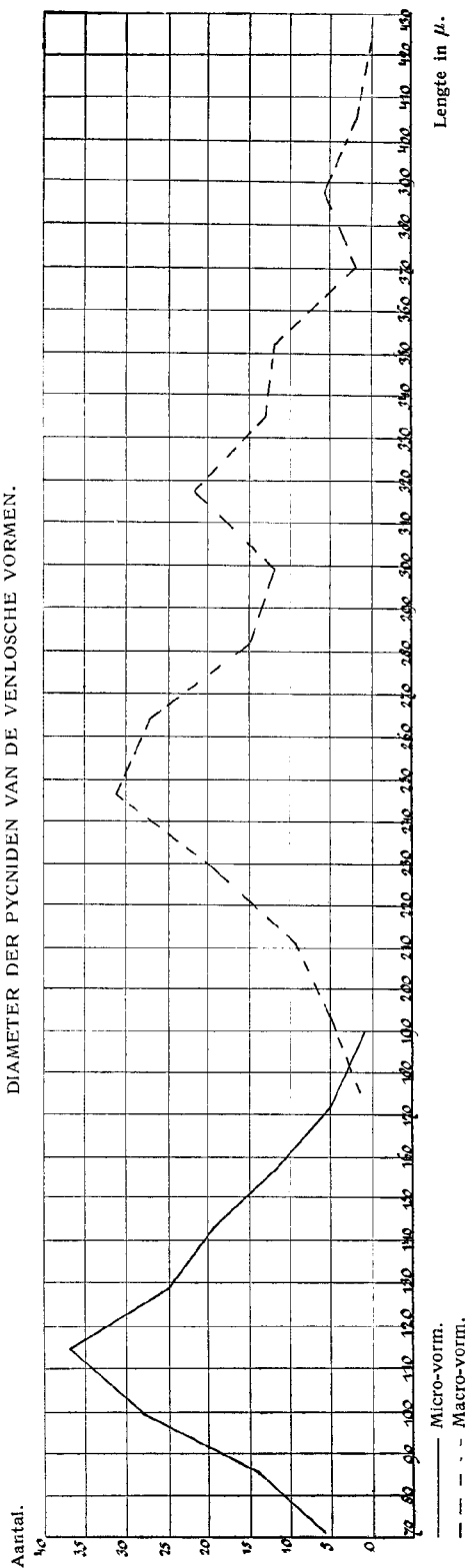
Spoedig kon men nu met het bloote oog twee vormen onderscheiden. Er waren kolonies, die spoedig een dik wollig mycelium vormden, aanvankelijk wit, later grijs van kleur, waarin geen pycniden gevormd werden. Andere kolonies maakten niet zoo'n wollig mycelium doch de hyphen groeiden vlak over en in de agar en vormden, in tegenstelling met die van de andere zwamvorm, spoedig een groot aantal kleine pycniden. (Plaat XVII fig. 4.) Deze laatste kolonies groeiden na overenting op kers-agar bij 24° C. niet verder uit, hetgeen dus werkelijk mijn vermoeden bevestigde, dat er een vorm in mijn cultures aanwezig was, die niet of moeilijk op kers-agar groeide.

Van de sporen, uitgezaaid op kers-agar, werden er eveneens een aantal na ontkieming overgebracht zoowel op schalen met selderij-agar als op schalen met kers-agar. De helft van iedere partij schalen werd wederom gezet bij een constante temperatuur van 24° C., de andere helft bij een wisselende temperatuur van 17° — 21° C. Alle aanwezige kolonies ontwikkelden zich op de twee voedingsbodems bij beide temperaturen tot witte, wollige myceliën, waarin geen pycniden te zien waren. Op de kers-agar, waarin de sporen gezaaid waren, was dus blijkbaar maar één vorm tot ontwikkeling gekomen, of de „pycnide vorm” was door den „mycelium vorm” overwoekerd. De kers-agar had in dit opzicht selectief gewerkt.

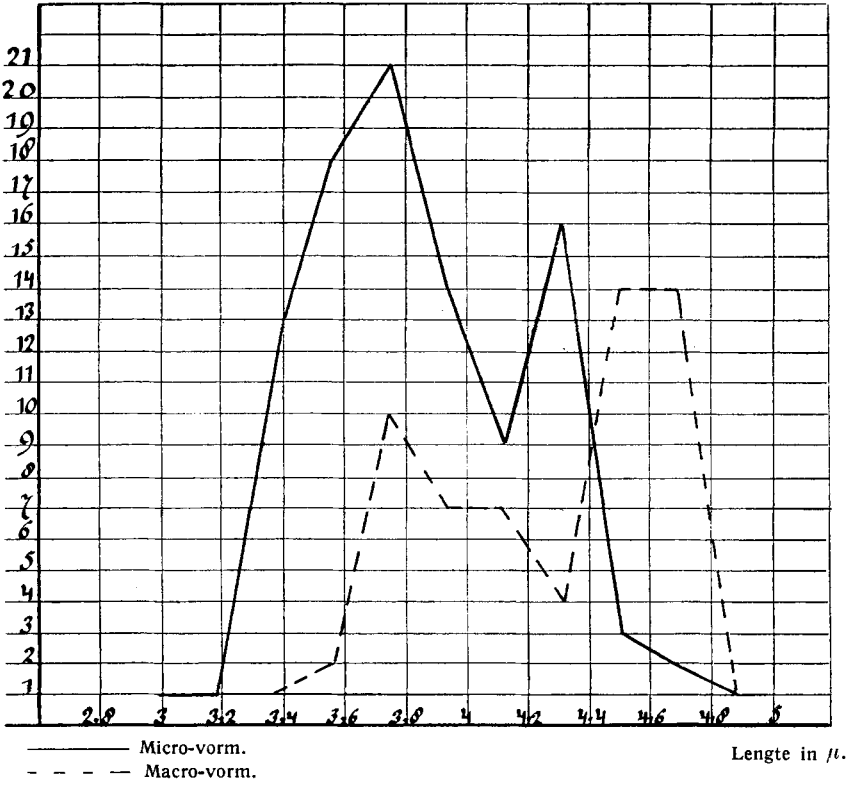
Toen de petriscalen met kers-agar 17 dagen na de uitzaaiing nog eens nauwkeurig bekeken werden, zag ik op sommige open plekken enkele achterblijvers als een bruine punt zichtbaar worden. Een daarvan werd overgebracht op kers-agar en bij een temperatuur van 24° C. geplaatst; er trad geen verdere groei op, maar wel werden na eenigen tijd weer de bruine korreltjes zichtbaar, waarvan hierboven reeds sprake was. Een andere dezer achterblijvers werd eveneens op dezen voedingsbodem overgebracht, doch bij 17° C. geplaatst. De groei was in de eerste weken zeer gering; later schijnt de schimmel zich echter te hebben aangepast aan het minder gunstige substraat, althans er is na langen

Graphiek 1 en 2.

DIAMETER DER PYCNIDEN VAN DE VENLOSCHE VORMEN.



Aantal. LENGTE DER SPOREN VAN DE VENLOSCHE VORMEN.



tijd een kolonie ontstaan, die weinig luchtmycelium, doch wel veel kleine pycniden vormde. De groei was echter zeer matig.

Ook op de kers-agar waren, zooals nu te verwachten was, de beide verschillende zwammen aanwezig geweest, doch doordat deze voedingsbodem voor een ervan minder geschikt is, werd deze door de andere spoedig overwoekerd. Uit het voorgaande blijkt, dat wij te maken hebben met twee vormen; een van deze groeit niet goed op kers-agar; op selderij-agar vormt hij weinig luchtmycelium, maar vele kleine pycniden. Ik noem dezen daarom in het vervolg den „micro-vorm”. De andere groeit uitstekend zoowel op selderij- als op kers-agar, vormt veel luchtmycelium, maar, zooals later zal blijken, veel minder pycniden en dan nog slechts op bepaalde voedingsbodems; deze pycniden, die na langeren tijd ontstaan, zijn grooter dan die van den vorigen vorm; ik noem hem daarom den „macro-vorm”. De groeiwijze en de pycniden van den „macro-vorm” komen overeen met de beschrijving, die door KLEBAHN van *Phoma apicola* gegeven wordt.

Om de afmetingen der pycniden van deze beide vormen te kunnen vergelijken moet men ze kweken op een voedingsbodem, waarop zij spoedig en veel pycniden vormen. Verschillende methoden en voedingsbodems werden beproefd. De volgende methode werd ten slotte het best bevonden. De beide vormen werden gekweekt in cultuurbuizen op plat gedrukte selderij-bladstelen; deze buizen werden geplaatst in diffuus daglicht bij een wisselende temperatuur van 17°—21° C. Niet alleen de beide micro-vormen, doch ook de beide macro-vormen maakten onder deze omstandigheden zeer spoedig pycniden. Nadat er van elk der vormen een voldoende aantal aanwezig was, werd de platgedrukte steel uit de buis gehaald en overgebracht op enkele objectglaasjes; de pycniden werden daarna met behulp van het microscoop gemeten.

De diameter der pycniden van den Venloschen macro-vorm varieerde van 175—420 μ , zooals nader blijkt uit (Graphiek 2). Het viel mij op, dat de pycniden, die het verst van de entplaats ontstaan waren, dus blijkbaar de jongste, een lichtgele kleur en een zwarten mond hadden; de overige pycniden waren geheel zwart gekleurd. Deze lichtgeel gekleurde waren over het algemeen kleiner dan de zwarte. Blijkbaar gaat met het ouder worden der pycniden de gele kleur over in zwart, terwijl zij dan ook nog wat in grootte toenemen.

De diameter der pycniden van den Venloschen micro-vorm varieerde van 70—185 μ . (Graphiek 1.)

De sporen dezer beide pycniden-soorten werden gemeten in een 10 % gelatine-oplossing (om Brownsche beweging te voorkomen).

en zij werden gekleurd met Gentiaan-violet. Zooals uit graphiek 3 en 4 blijkt, is de variatiebreedte der sporengrootte der beide zwam-vormen ongeveer gelijk (nl. van 3,37—4,87 en van 2,99—4,87); alleen heeft het grootste aantal der sporen van den macro-vorm grootere afmetingen, terwijl het grootste aantal der sporen van den micro-vorm kleinere afmetingen heeft. Doordat enkele buizen met den macro-vorm wegens een opgetreden verontreiniging werden verwijderd, is van dezen zwamvorm een kleiner aantal sporen gemeten dan van den micro-vorm.

3. *Locale rassen.*

Daar à priori met de mogelijkheid rekening moest worden gehouden, dat de Venlosche, van humusrijken zandgrond afkomstige, en de Maastrichtsche, van kleigrond afkomstige zwam, in pathogene eigenschappen zouden verschillen, zijn alle infectieproeven met cultures van beide herkomsten verricht. Eerst later, toen ik zocht naar de beteekenis van het afsplitsen der micro-vormen, kwamen bepaalde verschillen tusschen de Venlosche en de Maastrichtsche zwam voor den dag, die mij aanleiding gaven ze te beschouwen als locale rassen. In pathogeen karakter verschillen zij echter niet van elkaar, zoodat de beschrijving ervan eerst in het mycologische deel zal worden gegeven. De zwam, die gekweekt werd uit een zieken knol geoogst te Wageningen van humusarmen zandgrond, kwam overeen met het Maastrichtsche ras.