

MYCOLOGISCH DEEL.

HOOFDSTUK I.

DE OVERGANG DER BEIDE ZWAMVORMEN IN ELKAAR.

1. *De afsplitsing van den micro- uit den macro-vorm.*

Uit de in het vorig deel beschreven infectieproeven bleek, dat twee zwamvormen de schurftziekte van de knolselderij kunnen veroorzaken. De macro-vorm komt overeen met de zwam, die vroegere onderzoekers reeds ontdekten als oorzaak der ziekte. In de literatuur was echter, afgezien van HALSTED's onvolledige mededeeling, niets bekend van een zwam van het type van den micro-vorm als oorzaak van een knolselderijziekte. Het lag dus voor de hand na te gaan, of de micro-vorm inderdaad op Phomazieke planten voorkomt en of hij tot bepaalde deelen daarvan beperkt blijft. Zooals in het voorgaande vermeld is, treft men pycniden aan op de bruine vlekken van den knol en eveneens op den voet van de buitenste in een krans geplaatste bladstelen. Het was mij opgevallen, dat de pycniden, die op den knol voorkomen, kleiner en donkerder van kleur zijn dan die, welke men op den voet van de bladstelen vindt; deze laatste zijn grooter en lichter van kleur. Een dergelijk verschil bestaat er tusschen de pycniden der beide zwamvormen. Er werden daarom op selderij-agar sporen van deze twee soorten pycniden afzonderlijk uitgezaaid. Van knollen uit Maastricht, Venlo en Wageningen werden 7 pycniden en hiervan 62 kolonies en van bladsteelvoeten van dezelfde herkomst werden 3 pycniden en hiervan 36 kolonies geïsoleerd. Spoedig bleek, dat geen enkele kolonie van den micro-vorm aanwezig was, ze behoorden alle tot den macro-vorm.

Uit vroegere onderzoekingen was gebleken, dat de micro-vorm bij een temperatuur van 24° C. niet op kers-agar groeit. Om na te gaan of wellicht in dit opzicht toch nog eenig verschil tusschen de geïsoleerde kolonies bestond, werden zij alle geënt in buizen met kers-agar en bij een constante temperatuur van 24° C. gezet. Alle kolonies groeiden echter uitstekend. De pycniden, die iets verschilden in uiterlijk en van twee verschillende plantendeelen afkomstig waren, zijn dus in werkelijkheid niets anders dan pycniden van den macro-vorm. Het eigenaardige feit, dat de micro-vorm in den herfst van 1926 van deze knollen niet werd geïsoleerd, terwijl hij zoowel in de Venlosche als in de Maas-

trichtsche cultüres in het voorjaar van 1926 wel werd gevonden, zou op een van de drie volgende manieren kunnen worden verklaard:

1.° De micro-vorm komt betrekkelijk zelden op den knol of op den bladvoet voor; een tiental pycniden zou daarom een te gering aantal zijn om daaronder dezen vorm aan te treffen.

2o. De micro- en de macro-vorm hebben in de zieke plant ieder hun bepaald gebied, zij volgen elkander op in verschillende ziekte-stadia. De micro-vorm zou bv. meer binnen in den knol kunnen zitten, terwijl de macro-vorm meer buiten op het reeds door den micro-vorm aangetaste weefsel aanwezig zou kunnen zijn.

3°. De micro-vorm is als zoodanig niet van de plant te isoleeren, doch is als een „constante variatie” op een der gesteriliseerde voedingsbodems ontstaan.

Onderzoek naar aanleiding van de 1ste hypothese.

Volgens de hiervoor beschreven methode waren slechts 10 pycniden en 98 kolonies nagegaan; terwijl volgens de nu te beschrijven methode een grooter aantal pycniden en kolonies in het onderzoek betrokken werd. Van de knollen afkomstig uit Maastricht werden 20 pycniden afgezonderd en deze te zamen in één steriele buis met een weinig gesteriliseerd water gebracht. Uit deze buis werden sporen in 10 petrischalen met selderij-agar uitgezaaid. Nadat deze sporen ontkiemd waren, werden telkens ongeveer 10 kolonies te zamen in één buis op gesteriliseerde knolselderij overgebracht. Er waren een twintigtal dergelijke cultuurbuizen aanwezig.

Op dezelfde manier werden twintig pycniden geïsoleerd van den verbreedten voet der stelen van Maastrichtsche knollen. Er waren dus veertig pycniden en circa 400 kolonies in het onderzoek betrokken. Was er nu in een dezer buizen een micro-vorm aanwezig, dan zou in die buis, in tegenstelling met de andere, spoedig pycnidevorming moeten optreden. Door zulk een vruchtlichaampje af te zonderen en de sporen ervan uit te zaaien, zou de micro-vorm gemakkelijk te isoleeren zijn. Iets dergelijks had echter niet plaats. In al de buizen was de groei precies gelijk; er ontstond zeer veel luchtmycelium; pycnidevorming had voorloopig in geen der buizen plaats, na drie weken waren er nog geen aanwezig. Ook nu was blijkbaar alleen de macro-vorm geïsoleerd.

Onderzoek naar aanleiding van de 2de hypothese.

EDSON (1915) meent aangetoond te hebben, dat *Phoma betae*

Fr. in suikerbieten, die van de zgn. wortelbrand genezen zijn en uiterlijk niets meer van deze ziekte laten zien, toch nog inwendig aanwezig kan zijn, maar dan in een rusttoestand, die voor de plant op dat oogenblik niet schadelijk is. Hij meent verder, dat de zwam weer actief gaat worden, wanneer dergelijke van de ziekte herstelde bieten bewaard worden voor zaadwinning; in den winter zou de zwam weer in een schadelijken vorm overgaan. Het gelukte EDSON in genezen planten microscopisch een intracellulair mycelium aan te toonen. Terwijl in aan wortelbrand lijdende planten de wand en de kern der aangetaste cellen op een bepaalde manier reageeren op het binnendringen van het mycelium, zoodat men kan verwachten, dat ze spoedig zullen afsterven, schijnen de cellen van genezen planten geen hinder te hebben van de binnengedrongen zwam. Het mycelium in deze cellen is steeds onvertakt en heeft een ander voorkomen dan het mycelium in planten, die zichtbaar aan wortelbrand lijden.

EDSON vermeldt niet of hij deze zwam „apparently established in a condition of reduced virulence” als reincultuur geïsoleerd en daarmee infectieproeven verricht heeft, om aldus het bewijs te leveren, dat de door hem bedoelde zwamvorm werkelijk tot *Phoma betae* Fr. behoorde.

Naar aanleiding van EDSON's hypothese zou men zich kunnen voorstellen, dat de Phomazwam in een zieken selderijknol in twee vormen aanwezig is: in de nog pas aangetaste weefsels zou de zwam onder den invloed van nog gezonde cellen gedwongen zijn een bepaalden vorm aan te nemen en wel de micro-vorm, terwijl, wanneer de weerstand der cellen eenmaal gebroken is, er een overgang zou kunnen plaats hebben van den micro- in den macro-vorm. Zoo zou het te verklaren zijn, waarom door het uitzaaien der sporen van de pycniden, die aan de oppervlakte der zieke planten te vinden zijn, alleen de macro-vorm geïsoleerd kan worden, terwijl door het kweken van den parasiet uit de dieper liggende, nog meer gezonde weefsels de micro-vorm te voorschijn kan komen.

Om dit nader na te gaan werden knollen onderzocht, die begin October 1926 van het proefveld gerooid en tot in Januari 1927 in een vorstvrijen kelder bewaard waren. Deze knollen vertoonden de ziekte in slechts zeer geringe mate, het waren de beste knollen van het proefveld, dat over 't algemeen ernstig door de ziekte was aangetast.

Met een steriel mes werden kleine stukjes uit den knol gesneden en uitgelegd in petriscalen met selderij-agar. In zeer veel gevallen kwamen bacteriën te voorschijn, doch ook *Phoma apicola* als macro-vorm.

Er werden meerdere knollen op deze wijze onderzocht; in geen enkel geval kon een zwam, die op den micro-vorm geleek, geïsoleerd worden. Het lijkt me daarom niet aannemelijk, dat de micro-vorm als zoodanig in den knol aanwezig is.

Onderzoek naar aanleiding van de 3de hypothese.

De micro-vorm was in 't voorjaar van 1926 't eerst opgemerkt in cultures ontstaan uit pycnosporen, die zich ontwikkeld hadden op gesteriliseerde knolselderij. Om te onderzoeken of het ontstaan van den micro-vorm afhankelijk is van de cultuur op dezen voedingsbodem werden de volgende isolaties en entingen uitgevoerd. Er werden in 1926 opnieuw éénspore cultures gekweekt uit pycnosporen, geïsoleerd van knollen afkomstig van Maastricht en Venlo. Mycelium van elk dezer éénspore-cultures werd geënt zoowel op gesteriliseerde knolselderij als op vloeipapier gedrenkt in Coons' oplossing.

Alle éénspore-cultures, zoowel Venlosche als Maastrichtsche, groeiden uitstekend op Coons' oplossing en vormden er spoedig pycniden op. Pycnosporen, die geïsoleerd waren van deze cultures werden uitgezaaid in schalen met selderij-agar. De kolonies, die in deze schalen ontstonden, waren alle duidelijk als de macro-vorm te herkennen. Onder de éénspore-cultures was geen enkele micro-vorm als zoodanig aanwezig.

Op de gesteriliseerde knolstukjes had aanvankelijk een krachtige myceliumgroei plaats, zoodat de geheele buis er mee gevuld was. De eerste 3 weken werden geen pycniden gevonden. Toen de buizen anderhalve maand na de enting nauwkeurig gecontroleerd werden, waren in bijna alle buizen pycniden aanwezig.

De pycnosporen, die ontstaan waren op deze gesteriliseerde knolstukjes, werden op selderij-agar uitgezaaid. Na ontkieming zag men in al deze schalen naast den macro-vorm ook den micro-vorm te voorschijn komen. Hiermede was het bewijs geleverd, dat een éénspore-cultuur van den macro-vorm door pycnidevorming op gesteriliseerden knol een nieuwen zwamvorm, den micro-vorm, afsplitst. Dat we niet te maken hebben met twee verschillende rassen, die reeds in de levende knol aanwezig waren en hun aanwezigheid pas op den gesteriliseerden knol openbaren, volgt reeds uit het feit, dat ik uitging van éénspore-cultures.

Om dit echter nog op een andere manier te bewijzen, entte ik een kolonie van den macro-vorm, afkomstig van een spore ontstaan op gesteriliseerden knol, voor de tweede maal op dezen voedingsbodem. Was er sprake van twee rassen dan zou deze tweede passage nu uitsluitend den macro-vorm moeten opleveren. Dit was niet het geval, ook nu was na uitzaaiing der opnieuw ontstane

pycnosporen, zoowel de macro- als de micro-vorm aanwezig.

Op de levende plant komt blijkbaar maar één *Phoma apicola* voor, doch deze zwam splitst bij de vorming der pycniden op den gesteriliseerden knol telkens den micro-vorm af.

Bij de Venlosche cultuur had er op gesteriliseerde knolselderij behalve de bovengenoemde ook nog een tweede verandering plaats gehad. Door enting van den Venloschen macro- en micro-vorm op COONS' oplossing bleek, dat er van groei op dezen voedingsbodem thans geen sprake meer was. De beide Maastrichtsche vormen groeiden er uitstekend op. De resultaten, die ik het vorig jaar kreeg, worden hierdoor bevestigd en nader verklaard.

§ 2. De overgang van den micro- in den macro-vorm.

Dat het ontstaan van den macro-vorm uit den micro-vorm onder bepaalde omstandigheden mogelijk moet zijn was zeer waarschijnlijk, daar gebleken was, dat beide vormen constante variaties zijn van een en dezelfde zwam. Dat deze overgang inderdaad plaats heeft, bleek mij in den herfst 1926 uit de volgende waarnemingen.

In twee op een zuid-helling gelegen broeibakken was in het voorjaar van 1926 een partij jonge selderijplantjes (20 verschillende variëteiten) uitgeplant. De eene aldus beplante bak was bespoten met een sporensuspensie van den Venloschen micro-vorm, de andere op dezelfde wijze beplante bak was bespoten met een sporensuspensie van den Maastrichtschen micro-vorm.

Tusschen deze twee geïnfecteerde bakken lag een derde, kleinere bak, die wel beplant maar niet geïnfecteerd was en als contrôle dienst deed.

Van de geïnfecteerde planten werden zoowel de bladeren als de knolletjes en de wortels ziek. Deze planten werden verwijderd, zoodat slechts de besmette grond overbleef. In dezen grond werden in de maand Juni halfvolwassen knolselderijplanten, die tot dien tijd in steriele aarde gegroeid waren en die dan ook volkomen gezond bleken, uitgepoot. Na een maand vertoonden de planten in de bakken, die door de Venlosche zwam geïnfecteerd waren, zoowel als die in de bakken, die door de Maastrichtsche zwam besmet waren, de ziekteverschijnselen duidelijk, terwijl de planten in den contrôle-bak daartusschen gezond gebleven waren.

In de maand November werden de knollen dezer drie bakken gerooid; die uit de geïnfecteerde bakken waren typisch schurft-ziek; de verschijnselen der ziekte, die door de Venlosche zwam waren teweeggebracht, kon men niet onderscheiden van die,

welke de Maastrichtsche zwam had veroorzaakt. De knollen uit den contrôle-bak waren gezond. Op de knollen en op de verbrede voeten der stelen van de zieke planten waren de pycniden gemakkelijk te vinden. Om na te gaan of het typisch verschil tusschen de Venlosche en Maastrichtsche cultuur ook nu nog aanwezig was, werden pycnosporen andermaal uitgezaaid op selderij-agar. Tot mijn verwondering zag ik, dat verreweg de meeste kolonies, zoowel der Venlosche als der Maastrichtsche cultures zich ontwikkelden tot den macro-vorm, terwijl toch oorspronkelijk elk der beide bakken met den micro-vorm geïnfecteerd was. Ofschoon tengevolge van het open liggen dezer bakken gedurende meerdere maanden, een besmetting van buiten af heel goed denkbaar was, sprak toch reeds het uitblijven der ziekte in den contrôle-bak tegen deze mogelijkheid. Dat er inderdaad geen andere dan opzettelijke besmetting heeft plaats gehad, wordt bevestigd door de volgende waarnemingen:

Geen der kolonies van den macro- en micro-vorm, geïsoleerd uit den broeibak, die infecteerd was met den Venloschen micro-vorm groeiden op Coons' oplossing, terwijl de kolonies dezer beide vormen uit den broeibak, die geïnfecteerd was met den Maastrichtschen micro-vorm alle op deze oplossing groeiden. Daaruit volgt niet alleen, dat er geen besmetting was overgegaan van den eenen naar den anderen bak, hetgeen reeds bekend was uit het uitblijven van ziekte in den contrôle-bak, doch ook kan nu met zekerheid gezegd worden, dat er van buitenaf geen besmetting heeft plaats gehad. Het is duidelijk, dat elk der zwammen, de Venlosche zoowel als de Maastrichtsche, alleen aanwezig was in den broeibak, waarin zij opzettelijk was gebracht en bovendien is het volkomen zeker, dat er een verandering heeft plaats gehad van den micro- in den macro-vorm.

Bij mijn vroegere infectieproeven, waarbij planten direkt in aanraking werden gebracht met mycelium en sporen van de verschillende zwamvormen en waar een verblijf in den grond niet had plaats gehad, is een dergelijke verandering niet waargenomen; evenmin heb ik haar opgemerkt op de vele voedingsbodems, waarop ik de zwam in het laboratorium kweekte. Voor het tot standkomen der verandering van den micro- in den macro-vorm schijnt het dus noodig te zijn, dat de zwam een tijdlang in den grond aan de natuurlijke afwisseling van temperatuur is blootgesteld. Om hierover meer te weten te komen, entte ik sporen van den Venloschen micro-vorm in een aantal cultuurbuizen, waarin een kleine hoeveelheid op drie achtereenvolgende dagen gesteriliseerden grond (een mengsel van klei, zand en turfmoel) gebracht was. Er vormde zich vrij spoedig bij een temperatuur

van 16°—21° C, een grijsgroen mycelium, doch het typische vlok-kige mycelium van den macro-vorm was niet te zien.

Nadat de cultures op dezen grond ongeveer een maand gegroeid waren, vond ik door microscopisch onderzoek, dat hierin micro-pycniden gevormd werden. Ik entte mycelium dezer cultures op gesteriliseerde selderij-bladstelen. De algemeene habitus en de pycniden op de selderij-bladstelen geleken over 't algemeen zeer sterk op den habitus en de pycniden van den micro-vorm. De ontstane pycnosporen werden uitgezaaid op selderij-agar en honderd afzonderlijk liggende kolonies werden met behulp van het binoculair microscoop geïsoleerd. Na eenige dagen bleek, dat er van deze honderd éénspore-cultures slechts drie tot den macro-vorm behoorden.

Het blijkt dus, dat de verandering tijdens of na groei op gesteriliseerden grond tot stand gekomen was, ofschoon in geringe mate.

Naderhand werd gevonden, dat deze omzetting in veel sterkere mate plaats heeft, wanneer de pycniden van den micro-vorm zich ontwikkelen bij een betrekkelijk lage temperatuur, nl. 0—5° C.

De proef, waaruit dit bleek, werd aldus uitgevoerd.

Sporen van den Maastrichtschen micro-vorm werden geënt op selderij-stelen in cultuurbuizen. Drie dezer cultuurbuizen (groep I) werden gezet in een kamer met een temperatuur van 17°—21° C.; hier vormden zich na ongeveer 8 dagen reeds zeer veel pycniden. Zes andere buizen (groep 2) werden gezet in een koelruimte waar de temperatuur wisselde van 0 tot 5° C. Na verloop van een maand had zich in deze laatste buizen veel mycelium gevormd. Pycniden waren echter nog niet aanwezig. Een drietal dezer buizen werd toen overgebracht naar een kamer met een temperatuur van 17° tot 21° C., waar zich nu na 5 dagen zeer veel pycniden vormden.

De overige drie buizen (groep 3) bleven nog een maand langer in de koelruimte; toen hadden zich ook in deze buizen enkele pycniden gevormd. Van elke groep werden vervolgens pycnosporen uitgezaaid op selderij-agar. Het bleek toen, dat in groep 1 en 2 uitsluitend sporen van den micro-vorm aanwezig waren, doch in groep 3 waren tot een belangrijk percentage sporen van den macro-vorm ontstaan.