

ANATOMISCH ONDERZOEK VAN DE ZGN.
„KURKVLEKKEN” IN HET VRUCHTVLEESCH
VAN APPELS

DOOR

CAROLINE H. KLINKENBERG

Bij een algemeen onderzoek naar het voorkomen van abnormale „kurkvlekken” bij plantendeelen, die gewoonlijk geen kurk vormen, kreeg ik appels in handen, waarbij in het vruchtvleesch bruine vlekken voorkwamen. Het bleek, dat dit verschijnsel in Nederland vrij veel voorkomt en te vinden is bij appels, afkomstig van allerlei plaatsen en van verschillende grondsoorten, en ook bij verschillende variëteiten.

In onderstaand artikel geef ik in het kort de uitkomsten van het onderzoek over dit verschijnsel.

Voor de verschillende ziekten, die zich kenmerken door het optreden van bruine vlekken in het vruchtvleesch, wordt nog steeds de algemeene naam „kurkvlekken” gebruikt, hoewel het meestal niet nagegaan is of deze vlekken werkelijk uit kurk bestaan. De in de literatuur gebruikte benamingen, b.v. „kurkvlekken” en „inwendige kurk” zijn ook verwarrend, omdat het bij deze namen lijkt, alsof wij met kurk te maken hebben, zonder dat de aanwezigheid van deze stof is aangetoond.

Bij dit botanisch anatomisch onderzoek werd nagegaan, of de bruine vlekken werkelijk uit cellen met verkurkte celwanden bestaan, dus of deze celwanden reacties vertoonen, die in de botanie als karakteristiek voor kurk worden beschreven. Want alleen dan mag men van kurk spreken; is dit niet het geval, dan spreek ik van „necrotische vlekken”, waarbij ik dus gebruik maak van de benaming, die in de phytopathologie gegeven wordt aan afgestorven weefsel, waarbij een donkere verkleuring optreedt.

Het gebruik in de praktijk van de algemeene naam „kurkvlekken” wordt in de hand gewerkt door de moeilijkheid om de verschillende ziekten te onderscheiden. Dikwijls toch komen er ziektebeelden voor, die overgangen vormen tusschen de symptomen, zooals men die in de literatuur beschreven vindt.

W. M. CARNE, H. A. PITTMAN en H. G. ELLIOT (3) geven, op grond van hun uitgebreide onderzoekingen in Australië, een schema voor het onderscheiden van de verschillende bruine vlek-

ziekten, zooals die in Australië voorkomen. Het mag zeker niet a priori aangenomen worden, dat dit schema ook volledig van toepassing zal zijn in andere landstreken; CARNE c.s. wijzen al op verschillen tusschen de door hen beschreven symptomen en die, genoemd door Amerikaansche onderzoekers.

Hier te lande heeft Dr O. BANGA (1) zich bezig gehouden met het onderscheiden van deze ziekten. In zijn „Handleiding voor het herkennen van eenige niet-parasitaire ziekten en beschadigingen van appels” brengt hij de zgn. „kurkvlekkenziekten” in twee groepen onder, waarbij hij zich oogenschijnlijk bij CARNE c.s. aansluit.

De eerste groep vormen de ziekten, die mogelijk door boriumgebrek in den bodem zouden ontstaan. Dit zijn:

Droogtevlekken (superficial drought spot), waarbij onregelmatig gevormde bruine vlekken optreden in de schil en een oppervlakkige laag weefsel;

„*Inwendige kurk*” (internal cork), waarbij bruine vlekken ontstaan door de geheele appel heen tot vlak bij het klokhuis.

De bruine vlekken, die bij deze ziekten optreden, bestaan niet uit cellen met verkurkte wanden (W. M. CARNE, H. A. PITTMAN en H. G. ELLIOT).

Van de tweede groep ziekten is de oorzaak onbekend; deze zou samenhangen met het ongelijkmatig omzetten van zetmeel in suikers in het vruchtvleesch. (CARNE, 2, 3) ¹⁾.

Deze ziekten, die men vroeger samenvatte onder den naam Bitter Pit of Stippen, worden nu onderscheiden als volgt:

Boomstip (tree pit) als de bruine vlekken optreden als de appel nog aan den boom hangt;

Bewaarstip (storage pit, bitter pit) als de vlekken pas na den pluk optreden.

Ook bij deze ziekten bestaan de bruine vlekken niet uit kurk. Soms treden er vormen op, die tusschen de beide groepen verschijnselen in staan. CARNE, PITTMAN en ELLIOT vatten onder den naam „Orchard Pitting” laat gevormde „cork” ²⁾ en „tree

¹⁾ Deze hypothese van CARNE berust hierop, dat er bij deze ziekten in de vlekken steeds nog zetmeel is, als het zetmeel in de gezonde cellen reeds omgezet is in suikers. Maar soms is er in de vlekken evenmin zetmeel aanwezig als in het gezonde weefsel. R. M. SMOCK en A. v. DOREN (12) wijzen er op, dat er in appels, aangetast door bitter pit, ook zetmeel in gezonde cellen aanwezig kan zijn, zoodat het voorkomen van zetmeel in de vlekken niet de oorzaak, maar een begeleidend verschijnsel zou zijn.

²⁾ „Cork”: een verzamelnaam voor de ziekten van de eerste groep, waarvan tegenwoordig verondersteld wordt, dat boriumgebrek de oorzaak is.

pit" samen, daar deze microscopisch en macroscopisch niet te onderscheiden zijn.

BANGA (1) vat de in de literatuur gegeven feiten als het volgt samen: „wel weten we met zekerheid, dat wat men vroeger „inwendige kurk" en „droogtevlekken" noemde, op boriumgebrek terug te voeren is. En ook weten we met zekerheid, dat „bewaarsnip" en „boomstip" niet het gevolg van boriumgebrek zijn. Wat we echter niet weten is, waar precies de grens ligt tusschen „inwendige kurk" en „boomstip".

In Nederland komen volgens hem zoowel boomstip als bewaarsnip voor. Het is echter voorbarig deze termen in te voeren, zoo lang niet een groote hoeveelheid materiaal in Nederland aan een anatomisch onderzoek is onderworpen, om uit te maken of wij hier met twee verschillende verschijnselen en mogelijk ook twee verschillende ziekten te maken hebben.

Het is o.i. zeker nog niet voldoende nagegaan of de ziekte, veroorzaakt door boriumgebrek hier voorkomt. BANGA geeft als illustratie van „inwendige kurk" in droogtevlekken alleen foto's van appels uit Australië en Amerika.

R. MULDER (10) meent terecht, dat het voorkomen van „inwendige kurk" hier te lande nog niet is geconstateerd. Om te weten te komen, of wij te maken hebben met „inwendige kurk" of bewaarsnip moet men niet, zooals Mulder aangeeft, alleen na-gaan of de verschijnselen verdwijnen na boriumbemesting. Daarvoor is allereerst een anatomisch onderzoek van een ruime hoeveelheid materiaal noodzakelijk. Daarna is het noodig proeven met boriumbemesting te nemen.

Zoowel van „inwendige kurk" als van bewaarsnip zijn in de literatuur anatomische beschrijvingen te vinden.

A. J. MIX (9) geeft een beschrijving van de pathologische anatomie van „inwendige kurk" en droogtevlekken, waarvoor hij resp. de namen „cork" en „drought spot" invoert. Bij „cork" beschrijft hij groepen cellen in het vruchtvleesch, waarbij de inhoud bruin geworden en samengeschrumpeld is. MIX gebruikt hiervoor de term „corky portions", zonder zich echter uit te spreken, of wij hier met kurk te maken hebben. Buiten deze celgroepen zijn gezonde cellen te vinden, die laddervormig gerangschikt zijn, alsof zij door verminderde druk vanuit de zieke plek tot snelle deelingen aangezet zijn.

Het optreden van deze celdeelingen is dus te beschouwen als een wondreactie van den appel. Er wordt niet gezegd, of er bij deze nieuwgevormde cellen verkurking van den celwand kan optreden. Bij „superficial drought spot" beschrijft MIX het optreden van een bruinkleuring van enkele lagen van het hypodermale paren-

chym. De inhoud van deze cellen is bruin en amorph, doch er wordt niet over kurkvorming gesproken. In een later stadium van de ziekte ontstaan er onder dit bruingekleurde, afgestorven weefsel een aantal lagen kleine, rechthoekige cellen, door herhaalde deelingen van het aangrenzende, niet verkleurde, weefsel gevormd. Hier hebben we weer te maken met een wondreactie van het gezonde weefsel. Een of meer van deze cellagen, gelegen aan den kant van het zieke weefsel, gaan inderdaad verkurken: met chloorzinkjodium en met een oplossing van chlorophyll zijn de voor kurk karakteristieke kleurreacties in de celwanden te zien.

De eigenlijke zieke cellen hebben hier dus geen kurk gevormd, wel het weefsel, dat door den appel gevormd is als reactie op de ziekte.

CARNE, PITTMAN en ELLIOT (3) geven een uitvoerige beschrijving van de anatomie van „inwendige kurk” en wel speciaal van den vorm, die zij als „blotchy cork” onderscheiden; hierbij zijn de bruine vlekken zoowel in het inwendige van den appel, tot dicht bij het klokhuis toe, als vlak onder de schil te vinden. Zij wijzen hier op de verdikking van de celwanden in de bruine vlekken, een verschijnsel, dat bij de stipziekten niet optreedt. In tegenstelling met de waarnemingen van MIX werd nooit de vorming van lagen kleine, rechthoekige cellen waargenomen. Zij leggen er den nadruk op, dat in de wanden der cellen in de bruine vlekken nooit kurkstof is aan te toonen, zoodat het gebruik van den term „kurk” in den botanischen zin van het woord niet gefundeerd is. Zij kunnen de celwanden in de necrotische vlekken wel kleuren met rutheniumrood; dit wijst op het voorkomen van pectinestoffen in deze wanden.

Bij de stipziekten (bitter pit) merken CARNE, PITTMAN en ELLIOT (3) op, dat de celwanden in de bruine vlekken niet verdikt zijn. Resten van afgestorven, donker gekleurd protoplasma, waarin vaak nog zetmeelkorrels aanwezig zijn, liggen tegen deze celwanden aan, die soms bruin gekleurd zijn door langzame impregnatie met oxydatieproducten van looizuur. De celwanden zijn vaak verscheurd, zoodat er groote holten in de vlekken kunnen ontstaan.

Zij bevestigen de waarnemingen van D. Mc.Alpine (8) en A. M. J. Smith (11), dat er in de celwanden geen kurkstof of houtstof is aan te toonen. Evenals I. B. Farmer (6) bevinden zij, dat de necrotische celwanden sterk kleuren met rutheniumrood, en dus pectinestoffen bevatten. Ook de resultaten van M. H. CARRE en A. S. HORNE (4), volgens wie pectinestoffen gevormd worden in de wanden van de cellen, grenzend aan de necrotische vlekken, kunnen zij bevestigen.

Een groot aantal appelvariëteiten werd door mij onderzocht op het voorkomen van bruine vlekken. Het materiaal was grootendeels afkomstig uit Lunteren, Wageningen en Kesteren; ¹⁾ een deel der onderzochte goudreinetten was van onbekenden herkomst.

Bewaarstip, dus vlekken die vooral voorkomen in de buitenste helft van de vrucht, bij appels, die reeds eenigen tijd, meest vrij lang geleden, geplukt waren, kwam alleen voor bij de volgende variëteiten: Brabantsche Bellefleur, Westlandsche Bellefleur, GoudreINETte, Kesterensch Wijnzuur, Lemoenappel, Zoete Paradijsappel en Reinette du Chené. Bij drie variëteiten, nl. Allington Pippin, OranjereINETte en Early Victoria kwamen vlekken voor, ontstaan toen de appel nog aan den boom hing. Ik meen deze vlekken onder te mogen brengen onder boomstip; bij het microscopisch onderzoek was geen verdikking van de celwanden waar te nemen en het beeld was typisch voor de stipziekten.

Om dus uit te maken, of er in Nederland kurk optreedt in de bruine vlekken van de appels, moet ik mij verzekeren van een reactie op kurkstof. De samenstelling van kurkstof is niet geheel bekend en het onderzoek hierover vereischt uitgebreide chemische proefnemingen. Er zijn bij het botanisch anatomisch onderzoek een aantal kleurstoffen in gebruik, die celwanden, die kurkstof bevatten, duidelijk kleuren: het feit, dat dezelfde kleurstoffen ook andere stoffen, hetzij vetten, hetzij houtstof, kunnen kleuren, is in de practijk geen overwegend bezwaar, omdat deze laatste stoffen vooral in andere weefsels der plant voorkomen, en ook met andere methoden aangetoond kunnen worden. Indien de kleurreacties een negatief resultaat geven, gecombineerd met het oplosbaar zijn van de celwanden in geconcentreerd chroomzuur bij gewone temperatuur en in geconcentreerd zwavelzuur, mag men aannemen, dat er geen kurkstof aanwezig is; kurkstof is nl. in de genoemde zuren onoplosbaar.

De beste kleuring van celwanden, die kurkstof bevatten, is die met Soedan IV. Deze kleurstof is verwant aan Soedan III, maar geeft een donkerder, meer intensief roode kleur. Dit is een voordeel boven de zwakkere, meer oranjeroode kleur van Soedan III, vooral wanneer men met necrotische weefsels werkt, die in veel gevallen geel of bruin gekleurd zijn. Het is echter wel mogelijk deze kleur weg te nemen door behandeling met Eau de Javelle; ook daarna kleurt Soedan IV zeer goed. Deze kleurstof is in den handel onder de namen Scharlach Rot Grüber en Scarlet

¹⁾ Het verschaft materiaal dank ik aan de vriendelijke tussenkomst van Dr G. WILBRINK en Prof. Ir A. M. SPRENGER.

Red, maar, aangezien alleen de naam Soedan IV een aanwijzing geeft over den aard van de stof, prefereert de Amerikaansche Commission on Standardization of Biological Stains de naam Soedan IV (H. J. CONN, (5)).

Versche coupes worden eerst in 70% alc. gebracht, en dan 5—15 minuten in een verzadigde oplossing van de kleurstof in gelijke deelen 70% alc. en aceton; daarna wordt met 70% alc. uitgewasschen en de coupes via glycerine in glycerine-gelatine ingesmolten. Naast Soedan IV werden gebruikt Soedan III, versche verzadigde chlorophyll-oplossing in gelijke deelen 70% alc. en aceton, neutraalviolet, cyanine en brillantblauw.

Indien de reacties met Soedan IV en de verder genoemde reagentia een positief resultaat geven, neem ik aan, dat er in de onderzochte celwanden kurkstof aanwezig is.

Naast gekleurde coupes werden ook versche handcoupes in alcohol of in glycerine bestudeerd.

Bij herhaald onderzoek van alle genoemde variëteiten werd in geen enkel geval in de bruine vlekken een voor kurkstof karakteristieke kleuring in de celwanden waargenomen. Ook lost het geheele necrotische weefsel op bij behandeling van de coupes met chroomzuuroplossing en met geconcentreerd zwavelzuur. Hieruit mag dus geconcludeerd worden, dat er in de bruine vlekken, veroorzaakt door de stipziekten, geen kurkstof in de celwanden afgezet wordt.

In enkele gevallen kon ik een wondreactie constateeren. In de variëteit Allington Pippin, behept met boomstip, treedt aan de randen van de vlekken sterke callusvorming op (fig. 1-3). Er worden dan celrijen gevormd, die als draden in de holten van het verscheurde, necrotische weefsel uitgroeien en zich kunnen vertakken. De cellen van deze callusdraden zijn kleiner dan die van van het vruchtweefsel en bevatten, evenals de necrotische cellen zelf, zetmeelkorrels, terwijl het zetmeel uit de cellen van het gezonde weefsel geheel verdwenen is. De wanden van de cellen van deze „callusdraden”, die niet aan andere cellen grenzen, maar aan intercellulair en vrij in de holten van het necrotische weefsel uitsteken, dragen verdikkingen of wratjes (fig. 3). Deze cellen komen geheel overeen met die van de uitgroeïende celdraden in het klokhuis van appels, die door MASSART (7) werden opgemerkt; deze auteur geeft in zijn afbeelding wèl de wratjes op de celwanden weer, doch bespreekt dit verschijnsel niet nader in den tekst. P. SORAUER (13) gebruikt voor dergelijke celrijen in het klokhuis van appels den naam „Wollstreifen” en vat de wratjes op de celwand, „Protuberanzen” op als plaatselijke zwellingen van de middenlamel. De waarneming van SORAUER, dat deze wratjes meer voorkomen op de celwanden van de uiterste cellen van de draden,

dan bij cellen, die aan den voet liggen, heb ik kunnen bevestigen.

Volgens M. H. CARRÉ en A. S. HORNE (4) komt er bij de stipziekten soms een wondcambium voor in de nabijheid van de doode cellen, waarbij de nieuw gevormde cellen draadvormig uitsteken in de holten van de necrotische vlekken; zij gaan niet op den bouw van de celwanden der callusdraden in.

Bij de variëteit Lemoenappel, aangetast door bewaarstip, treedt deze callusvorming eveneens op, hoewel niet in zoo sterke mate. Naast deze reactie van het weefsel kan er in zeldzame gevallen nog een andere optreden, en wel de vorming van een kurkcambium (fig. 4). Aan de grens van necrotische en gezonde weefsels zijn enkele rijen kleine, rechthoekige cellen op te merken, die na behandeling met Soedan IV een duidelijke roodkleuring van de celwanden vertoonen; deze wanden bevatten dus kurkstof. Dit is in de teekening aangegeven door een fijne stippellijn langs deze celwanden. Deze kurkvorming is dus duidelijk secundair en een reactie van de vrucht tegen de ziekte.

Dit werd door mij slechts tweemaal waargenomen, alleen bij de variëteit Lemoenappel. Dat er geen principiëel verschil bestaat tusschen de boven beschreven wondreacties, blijkt uit het feit, dat aan de randen van één necrotische vlek aan den éenen kant een kurkcambium en aan den anderen kant callusdraden gevormd worden.

De deelingen aan de randen van necrotische vlekken bij „drought spot” en „cork”, die MIX (9) beschrijft, zijn ook reacties van den appel tegen de ziekte. Deze reacties, vorming van een callus en van een cambium, dat celrijen gaat vormen, die voor een deel gaan verkurken, zijn niet specifiek voor een bepaalde ziekte, maar kunnen optreden bij beschadigingen, door allerlei oorzaken ontstaan.

Het is dus geen speciaal kenmerk van deze bruine-vlekziekten, dat het gezonde weefsel van den appel met kurkvorming kan reageeren.

Fig. 5 geeft een afbeelding van een vlek van bewaarstip bij Westlandsche Bellefleur, die het algemeen voorkomende beeld vertoont. In het midden van deze vlek is het weefsel bruin en verscheurd, aan de randen zijn alleen de wanden van eenige lagen cellen eveneens verkleurd; aan deze cellen grenst het gezonde weefsel. Midden in de necrotische vlekken, waar de protoplasten donker gekleurd en afgestorven zijn, is nog vaak zetmeel aanwezig, ook als dit in de gezonde cellen reeds geheel verdwenen is.

Op grond van dit onderzoek mogen wij aannemen, dat de bruingekeurde vlekken, die zich in het vruchtvleesch van appels ontwikkelen, niet bestaan uit cellen, waarvan de wanden kurk-

stof bevatten, aannemende, dat onder kurk wordt verstaan een stof, die reageert met Soedan IV, chlorophyll-oplossing, en de verder genoemde reagentia, doch dat zij eenvoudig necrotische verschijnselen zijn. Het gebruik van de benamingen „kurkvlekken” en „inwendige kurk” voor deze ziekten is verkeerd en niet gefundeerd. Het verdient aanbeveling om deze namen in de praktijk geheel te laten vervallen. Daarnaast kan er niet voldoende op aangedrongen worden dat, wanneer er zich ziekteverschijnselen in het vruchtvleesch van appels voordoen, alleen het anatomisch onderzoek uitsluitsel kan geven.

Baarn,

PHYTOPATHOLOGISCH LABORATORIUM
„WILLIE COMMELIN SCHOLTEN”

LITERATUUR

1. BANGA, O. Handleiding voor het herkennen van eenige niet-parasitaire ziekten en beschadigingen van appels. Mededeelingen van den Tuinbouwvoorlichtingsdienst No 7, 's-Gravenhage 1938.
2. CARNE, W. M. A preliminary note on a theory as to the origin of bitter pit in Australia. J. Dept. Agr. W. Austr. 1927, 4, 382-385.
3. CARNE, W. M., PITTMAN, H. A., and ELLIOT, H. G. Bitter pit of apples in Australia. Bull. No 41, Counc. f. Sci. and Ind. Res. Melbourne 1929.
4. CARRÉ, M. H., and HORNE, A. S. An investigation of the behaviour of pectic materials in apples and other plant tissues. Ann. Bot. 1927, 41, 193-237.
5. CONN, H. J. Biological Stains. Comm. on Stand. of biol. stains Geneva N.Y. 1937, 52-54.
6. FARMER, J. B. Bitter pit in Cape Apples. Kew Bull. Misc. Inform. 1907, 250.
7. MASSART, J. La Cicatrisation chez les Végétaux. Mem. de l'Ac. Roy. de Belgique, 1898, 57, 1-68.
8. McALPINE, D. Bitter pit investigations. Progress Reports 1911-1912 en 1912-1913. Government Printer, Melbourne.
9. MIX, A. J. Cork, drought spot and related diseases of the apple. Bull. 426 New York Agr. Exp. Sta. Geneva N.Y. 1916.
10. MULDER, R. „Kürk”-verschijnselen bij appels. De fruitteelt 1938, 28 12, 213-215.
11. SMITH, A. J. M. Bitter pit in apples. A review of the problem. Brit. Dept. of Sci. and Ind. Res. Food Invest. Bd. Spec. Rep. 28, 1926.
12. SMOCK, R. M. and VAN DOREN, A. The histology of bitter pit in apples. Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 35, 1938, 176-179.
13. SORAUER, P. Handbuch der Pflanzenkrankheiten, 3e Aufl. 1909 Bd. I, 324-326.

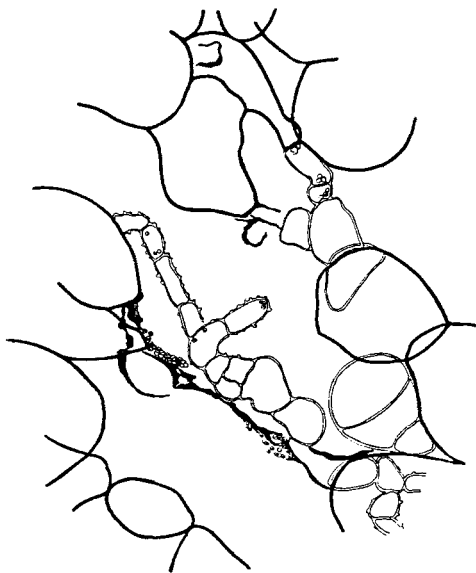


Fig. I

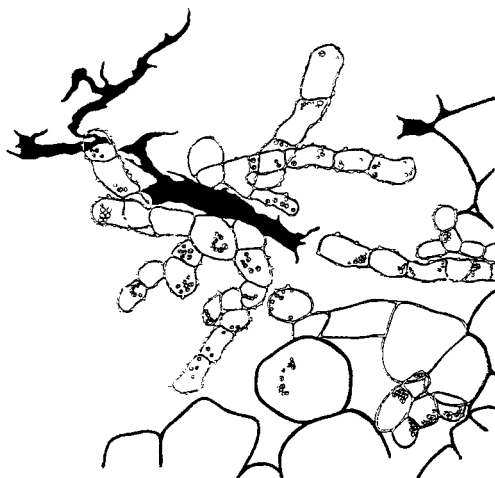


Fig. II

Fig. I en II. Doorsnede van den rand van een necrotische vlek bij de variëteit Allington Pippin met callusvorming. Necrotisch weefsel is zwart aangegeven. $140 \times$.

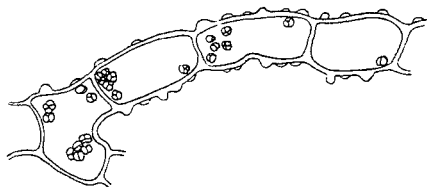


Fig. III. Een callusdraad in een necrotische vlek van Allington Pippin, sterker vergroot. $354 \times$.

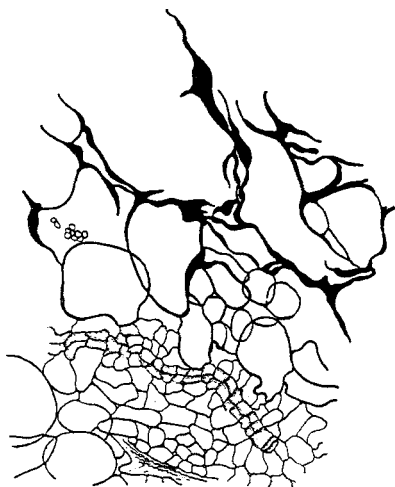


Fig. IV. Lemoenappel: aan den rand van een necrotische vlek (zwart aangegeven in de teekening) treedt een kurkcambium op (2 rijen gestippelde cellen).



Fig. V. Westlandsche Bellefleur: doorsnede van een deel van een necrotische vlek, (zwart aangegeven in de teekening), die grenst aan gezond weefsel. $57 \times$.