

TRANSPORT
VAN CONIDIOSPOREN VAN *OPHIOSTOMA ULMI* (BUISM.)
NANNF. (SYN. CERATOSTOMELLA ULMI BUISM.)
DOOR DEN SAPSTROOM

REFERAAT VAN H. VAN VLOTEN

Het staat vast, dat de iepenziekte wordt veroorzaakt door een ascomycet, *Ophiostoma Ulmi* (Buism.) Nannfeld. Elke twijfel die aanvankelijk hierover bestond, is weggenomen nadat Christine Buismán een methode had gevonden, om gezonde iepen door injectie van een sporensuspensie in het hout acuut ziek te maken (12 : 24-25).

De peritheciën van de zwam komen niet zoo vaak voor en men mag aannemen, dat de ascosporen bij de directe uitbreiding van de ziekte een geringe beteekenis hebben. Anders is het met de andere sporenvormen.

Wanneer men stukjes tak of hout met inwendige symptomen van de iepenziekte op kersagar steriel uitlegt, krijgt men in korten tijd een cultuur van de zwam. In een dgl. cultuur komen aanvankelijk twee vormen van vegetatieve sporen voor, nl. een *Cephalosporium* en een gistachtige vorm, waarvan de sporen zich door spruiting zeer snel kunnen vermeerderen. Later ontwikkelt zich vooral op de uitgelegde stukjes hout de derde vorm van sporen, de bekende coremiën van *Graphium*.

Wanneer men den parasiet in het zieke hout zoekt met behulp van den mikroskoop, doet zich het merkwaardige geval voor, dat het slechts bij uitzondering gelukt, om het mycelium in de vaten te ontdekken. Er bestaan teekeningen van Buismán (12 : 17) en Wollenweber (14 : Tafel II O) en mikrofoto's van Clinton en McCormick (6 : Plate V 5, 7, 8). Maar alle onderzoekers zijn het erover eens, dat het vinden van mycelium de grootste moeite kost. Clinton en McCormick b.v. hebben vele kleurmethoden toegepast op dwarse, radiaire en tangentieele coupes met een weliswaar positief, maar toch zeer poover resultaat (6 : 725). Zij vonden ook slechts weinig conidiën.

En toch moeten wij aannemen, dat de zwam in vrij wel alle zieke deelen aanwezig is. Bij isolatie komt zij voor bijna 100% te voorschijn.

Men vraagt zich hierbij af, hoe het mogelijk is, dat een parasiet zulke hevige ziekteverschijnselen kan teweeg brengen, terwijl hij toch slechts in een dgl. geringe hoeveelheid aanwezig is. Bij andere ziekten — men denke maar aan *Synchytrium*, *Phytophthora*, meeldauw, *Sclerotinia*, *Ascochyta*, roest, *Stereum* of *Armillaria* — is het anatomische beeld zoo kennelijk een bewijs van een contact tusschen waardplant en parasiet, dat men geen moeite heeft zich een voorstelling te maken van de parasitaire verhouding. Bij de iepenziekte ontbreekt dit volkomen.

Daarbij komt nog dat de iepenziekte vaak een buitengewoon snel verloop heeft. Het afsterven van geheele boomen gaat in een tempo dat er op wijst, dat de zwam zich wel met een abnormaal groote snelheid in de takken en de stam moet uitbreiden. Dit gaat veel sneller dan met de optimale groei van *Ophiostoma Ulmi* in reincultuur is te rijmen. Evenmin hebben wij te maken met een werking op grooten

afstand van een of andere toxische stof. Immers practisch is de parasiet uit alle deelen, die de ziekte vertoonen te isoleeren!

Het is dus begrijpelijk, dat Wollenweber in 1929 over de biologie van de zwam schrijft: „De zwam leeft hoofdzakelijk in de vaten van het spinthout, die voor watertransport dienen. Zij doorgroeit deze echter slechts spaarzaam met haar mycelium. Maar zij gaat zoo gemakkelijk tot fructificatie (*Cephalosporium* en gist-vorm) over, die bij de gistachtige spruiting bijzonder snel plaats vindt, dat zij zich met haar conidiën door de sapstroom in de plant passief kan laten drijven en daardoor door den geheelen boom versleepen. Daar waar de conidiën terecht komen, belemmeren zij door de snelle vermeerdering de waterbeweging in de vaten en remmen ten slotte de voedingsstroom zoodanig, dat de planten verwelken en de takken afsterven” (13 : 2-3).

Hiervan schrijft v. Tubeuf in 1935: „Ik heb te vergeefs in de literatuur gezocht naar het bewijs voor dezen gang van zaken, die eenig in zijn soort zou zijn en kan mij niet voorstellen, dat de tracheeën, die” (immers) „waterarm, verstopt en voor transport niet meer geschikt zijn, de hen toegeschreven rol zouden kunnen vervullen” (9: 67).

Radulescu heeft o.a. over deze kwestie eenige proeven genomen (8: 15-29). Hij heeft daarbij gewerkt met onder water afgesneden, bebladerde takken, die met het snijvlak in een sporensuspensie werden geplaatst. Na 14 uur vond hij bij mikroskopisch onderzoek en door herisolatie, dat de sporen over een afstand van 50 cm getransporteerd waren.

Verder heeft hij een dgl. tak met een 1,2 m lange slang opgehangen aan een trechter, waarin een sporensuspensie werd gegoten. De zijtakjes en bladeren werden ingekort en na $\frac{1}{2}$ uur begon water uit de opengesneden vaten te druppelen. De druppels werden steriel opgevangen en door uitstrijken op een steriele voedingsbodem op sporen van *Ophiostoma Ulmi* gecontroleerd. Na $\frac{1}{2}$ uur werden op afstanden van 26, 35 en 41 cm van het ondergedompelde snijvlak nog geen sporen gevonden. Binnen de 24 uur was echter het resultaat positief over afstanden tot 91 cm, terwijl na $2\frac{1}{2}$ uur reeds sporen werden aangetroffen op 20 cm van het snijvlak dat met de suspensie in aanraking was.

Bovendien werd van onder water afgesneden takken het snijvlak met heete paraffine afgesloten en werden 30-35 bladeren aan de top van den tak in een sporensuspensie gedompeld. De bovenste helft van elk blad werd onder de vloeistof afgesneden. Na 16 uur werden op vele plaatsen, tot ca. 3,5 m ver van de opzuigende bladeren, in de tak en diens zijtakken mikroskopisch en door isolatie sporen van *Ophiostoma* aangetoond. Van de 90 isolaties uit den jongsten jaarring en uit bladnerven waren 72 positief. 25 isolaties uit de 2-3 jaar oudere jaarringen waren alle negatief.

Soortgelijke proeven nam Radulescu met takken die hij aan den boom liet. Op dezelfde wijze als bij de vorige proef werden 35 bladeren aan den top ondergedompeld en onder de suspensie afgesneden. In een bepaald geval vond de inoculatie plaats op 1 Juli en werd op 10 Juli daaropvolgend tot ca. 8 m toe op vele plaatsen aan zijtakken en tot in de nerven van verschillende bladeren de aanwezigheid van sporen aangetoond.

Uit deze proeven blijkt, dat de conidiën van *Ophiostoma Ulmi* in de houtvaten naar boven en naar beneden getransporteerd kunnen worden. De anatomische bouw van de vaten levert blijkbaar geen belemmering op voor dit transport.

Aan May was het trouwens al eerder gelukt in enkele minuten sporen van *O. Ulmi* te persen door een stuk iepenhout van ca 1 m lengte (7: 13).

Christine Buisman had reeds in 1927 de abnormaal snelle uitbreiding van de zwam geconstateerd. Bij inoculatie van een *Ulmus foliacea* Wheatleyi kon *O. Ulmi* na 24 dagen op 3,45 m van de infectie-plaats worden geïsoleerd (12: 27). In 1935 liet zij sporen doorzuigen en wel door takken van verschillende soorten iepen, waarbij zeer vatbare en zeer resistente (5: 38-44). Het doorzuigen gelukte, maar bleek door hout van resistente even goed te gaan als door hout van vatbare iepen.¹⁾ Zij vond echter wel dat de uitbreiding van de zwam in afgesneden takken veel minder snel plaats vindt, dan in takken aan den boom. Zij kwam zeer terecht tot de conclusie dat de uitbreiding zoo snel is, dat men wel degelijk moet aannemen, dat de sapstroom een rol erbij speelt (5: 39).

Dgl. proeven geven nog geen definitief antwoord op de vraag, of de sapstroom nu ook werkelijk in de natuur de sporen door den geheelen boom verspreidt. De proeven van Radulescu brengen ons wel verder. Maar het definitieve bewijs leveren eenige Amerikaansche onderzoekingen, waarvan helaas slechts de zeer korte autoreferaten van de auteurs tot onze beschikking staan.

Banfield en Smith vonden sporen en een zeer dun verspreid mycelium in zieke iepen. In de vaten zagen zij de vorming van conidiën (3). Banfield heeft sporen gebracht in gezonde iepenboomen van 10 tot 20 cm diameter; hij deed dit op verschillende tijdstippen van het vroege voorjaar tot in de late herfst (1). De inoculatie geschiedde door een trechtervormige pan die om de boomen heen werd aangebracht. De pan werd met sporensuspensie gevuld en er werden insnijdingen in alle actief geleidende vaten gemaakt in contact met en onder de suspensie.

In April bedroeg de uitbreiding maximaal na drie dagen 5 cm naar boven en 65 cm naar beneden; in Juni was zij na drie uur reeds 10 m boven de plaats van injectie; in October na 2 dagen 8 m naar beneden. Bij andere proeven werden metalen kragen rond de boven-einden van den stam aangebracht en hierin steriel water gedaan. Door insnijdingen kon dit water in de houtvaten binnendringen en onderaan de stambases werd uit wonden het uittredende vocht opgevangen en op sporen onderzocht. Op deze wijze werden uit den sapstroom van natuurlijk zieke boomen in Mei, Juni en September sporen van *O. Ulmi* opgevangen.

In 1938 heeft Banfield dit onderzoek nog uitgebreid (2). *O. Ulmi*, biërgist, Oostindische inkt en ijzercolloïden werden gedurende de vegetatieperiode bij in totaal 135 iepen geprobeerd. In boomen van 20 m lengte werd *O. Ulmi* na 1 uur teruggevonden op 16,7 m omhoog; in een speciaal vermeld geval was de boom 21,7 m lang en bedroeg de uitbreiding na 1 uur 20,7 m boven de plaats van injectie. Het transport omlaag was 13,3 m beneden de injectie bij 2 boomen die op 13,7 m boven den grond waren geïnjecteerd. De ijzercolloïden kwamen niet hooger dan drie meter. Biërgist werd tot 8,3 m boven de injectie getransporteerd. Oostindische inkt daalde in 6 minuten tot 12 m onder de injectie.

In alle gevallen vond de verspreiding plaats door groote voorjaarsvaten van het loopende seizoen.

Oudere jaarringen bleken door thyllen geblokkeerd, de vaten in de wortels

¹⁾ Johanna C. Went heeft in 1938 nog eens nagegaan, hoever de verkleuring van het hout als gevolg van de inoculatie zich uitstrekte. Bij zeer gevoelige iepen bleek een sterke verkleuring door den geheelen boom te vinden te zijn. Bij minder gevoelige iepen hangt het van de uitwendige verschijnselen af, of de verkleuring doorloopt. Als boomen geen uitwendige ziekteverschijnselen vertoonen, zijn de cijfers van de uitbreiding omlaag over het algemeen heel klein. Bij de resistente iep „Christine Buisman” varieerden deze cijfers van 9 tot 162 cm (11 : 57-59).

waren vrij van thyllen. In de vaten van het zomerhout van den laatsten jaarring was de uitbreiding maximaal 37,5 cm. Vóór het verschijnen van de bladeren echter bedroeg de uitbreiding in alle gevallen (ook in het voorjaarshout) slechts 5 cm („enkele inches”).

v. Tubeuf kon zich in 1935 niet voorstellen dat de geblokkeerde vaten nog voor transport van de sporen zouden kunnen dienen (men vergelijkte het hierboven weergegeven citaat over de voorstelling die Wollenweber zich van een en ander had gemaakt). Dit is volkomen juist, maar de uitbreiding heeft blijkbaar vóór het blokkeeren plaats.

De hier medegedeelde resultaten geven ons de verklaring in handen, waarom de inoculaties met *Ophiostoma Ulmi* juist in juni, juli tot half Augustus positieve uitkomsten geven en misschien ook, waarom inoculaties van boomen die pas verplant zijn of die slecht groeien zooveel minder goed slagen. Christine Buisman schreef in 1933: „*Ceratostomella Ulmi* ist ein recht virulenter Parasit. Dieser Pilz wächst ja am besten in den kräftigsten Exemplaren seines Wirtes, wie die Beobachtung in der Natur, sowie die Ergebnisse der künstlichen Infektion uns gezeigt haben” (4: 436).

Dat *O. Ulmi* een zeer virulente parasiet is, daaraan kan men niet twijfelen, maar het feit dat juist krachtig groeiende boomen zwaar ziek worden, ligt niet in de eerste plaats aan deze virulentie, maar aan den boom zelf. Door zijn eigen sapstroom zorgt de iep dat de parasiet overal komt, en door de hevige reactie op de aanwezigheid van de zwam pleegt de boom ten slotte zelfmoord.

Men zou een zekere tegenstrijdigheid kunnen zien in het feit, dat — zooals Johanna C. Went in een samenvatting over het resistentie-onderzoek in Nederland schrijft (10: 16–19) in het watertransport en de transpiratie van vatbare en resistente iepen geen verschil is gevonden, maar vatbaarheid en gevoeligheid of resistentie behoeven niet noodzakelijkerwijze op verschil in watertransport te berusten, doch kunnen samenhangen met het tweede deel van het ziekteproces, de reactie van den boom.

Toen bovenstaand referaat reeds was ingediend bij de redactie van het Tijdschrift over Plantenziekten, arriveerde de overdruk van een uitvoerige publicatie van Banfield ¹⁾. Het referaat kan dus met gegevens van deze belangrijke bijdrage tot het onderwerp worden uitgebreid.

Het onderzoek van Banfield werd hoofdzakelijk verricht met *Ophiostoma Ulmi*, daarnaast op kleinere schaal met *Verticillium Dahliae* Kleb. en *Dothiorella (Cephalosporium) Ulmi* Verrall en May. De methode van onderzoek wordt uitvoerig beschreven en de resultaten worden gedocumenteerd met foto's, teekeningen en tabellen. De iepen die voor het onderzoek dienst deden, behoorden tot de soorten *Ulmus americana* en *U. fulva* Michx.

Met behulp van de boven reeds genoemde, hier nauwkeurig beschreven trechtervormige metalen kragen injecteerde B. 0,1–89 liter sporensuspensie in het hout onder of boven aan den stam der boomen door met een beitel het hout onder de vloeistof aan te snijden. Na verloop van tijd, dit varieerde van enkele uren tot vijf weken na afloop van de injectie, controleerde hij op twee manieren, hoe ver de sporen verspreid waren.

1. De boomen werden direct na de injectie geveld en in ca 1 m lange stukken

¹⁾ Banfield, W. M., „Distribution by the sap stream of spores of three fungi that induce vascular wilt diseases of elm.” Jour. Agric. Res. 62 (11): 637–681, 1941.

gezaagd. De snijvlakken werden onmiddellijk bestreken met of gedoopt in een heet mengsel van vaseline en paraffine, om binnendringen van verontreinigingen zoo veel mogelijk tegen te gaan. De stukken werden vertikaal opgehangen. B. liet dan, met de noodige voorzorgen, steriel water door de buitenste jaarringen loopen en ving aan de toegespitste ondereinden 50–500 ccm vloeistof op in steriele Erlemeyerkolven. Het sap werd gecentrifugeerd en onderzocht op eventueel aanwezige levende sporen. Dit gebeurde mikroskopisch en door uitstrijken in bepaalde verdunningen op een voedingsbodem.

2. De boomen werden na afloop van de injectie geveld, onmiddellijk in stukken van 1–6 m gezaagd, de snijvlakken behandeld en de bladen verwijderd. De stukken bleven op een beschutte plaats liggen en werden na verscheiden weken onderzocht op verkleuring van de houtvaten. Op typische plaatsen van de boomen werd uit de verkleurde vaten de zwam geïsoleerd door uitleggen van kleine stukjes hout.¹⁾

Ook probeerde B. een suspensie te injecteeren in eindscheuten. Verder inoculeerde hij de zwam nog in den boom. Daarvoor maakte hij met een beitel soortgelijke wonden als bij de injectie, maar niet onder een suspensie, integendeel wachtte hij eenigen tijd alvorens de sporen op de wond te strijken. Hierbij konden de sporen niet met den stroom worden getransporteerd, maar moest de zwam door middel van mycelium binnendringen. De uitbreiding van de zwam werd weer geconstateerd door de verkleuring van de vaten en bevestigd door herisolatie. Zij bleek zeer onregelmatig en in het algemeen veel langzamer te zijn dan na injectie.

Bij de injectie in het een-jarige hout bleef de uitbreiding van de zwam beperkt tot enkele centimeters en bereikte in geen enkel geval het oudere hout. Dit is in opvallende tegenspraak met de boven aangehaalde resultaten, die Radulescu meedeelt bij zijn injectieproeven in de bladen.

In de eerste helft van het groeiseizoen bedroeg bij de proeven van B. de gemiddelde uitbreiding in 9 kleinere boomen ca $3\frac{1}{2}$ m omhoog bij een gemiddelde hoogte dezer boomen van $4\frac{1}{4}$ m, bij 23 langere boomen, van gemiddeld $16\frac{1}{4}$ m lengte, gemiddeld $14\frac{3}{4}$ m. In de tweede helft van het groeiseizoen kon *Ophiostoma Ulmi* niet hooger worden teruggevonden dan op ca halve hoogte van 25 boomen die van $4\frac{1}{4}$ –20 m hoog waren. De gemiddelde uitbreiding was toen ca $3\frac{1}{2}$ m omhoog bij een gemiddelde totale lengte van bijna 10 m. In de rustperiode („non leafy season”) kwam de zwam niet hooger dan 60 cm boven de injectie in 12 boomen die met groote hoeveelheden suspensie waren geïnjecteerd.

Bij inoculatie in Juli bedroeg de uitbreiding één week na de inoculatie niet meer dan 35 cm; 19 dagen na inoculatie was zij maximaal ca 5 m en ongeveer 4 maanden na de behandeling varieerde de uitbreiding in 25 boomen (tot $16\frac{1}{4}$ m lang) van 50 cm tot alle takken en den geheelen stam.

Gekleurde suspensies van colloïden of gekleurde gistcellen bleken in de groote vaten van het voorjaarshout in den jongsten jaarring met betrekkelijk groote snelheid te worden getransporteerd. De eerste $1\frac{3}{4}$ m werden in 8–15 seconden afgelegd. De maximale uitbreiding omhoog bedroeg $6\frac{3}{4}$ m in minder dan 10 minuten, omlaag 12 m in 6 minuten.

¹⁾ Banfield maakt slechts melding van twee met steriel water behandelde speciale controle-boomen. Een grooter aantal zou de resultaten van het onderzoek een grootere zekerheid hebben gegeven. Ook een controle op de identiteit van de herisolaties door middel van inoculatieproeven zou wenschelijk zijn geweest.

Banfield vond, dat de houtvaten waarin de drie onderzochte parasitaire zwammen terecht kwamen altijd verkleurden tot aan de grens van hun uitbreiding. In de meeste gevallen bleken zij ook in alle verkleurde vaten aanwezig te zijn, maar nergens anders (geconstateerd door isolatie). Vergeleken met de uitbreiding door middel van sporen in den sapstroom is het doordringen van *Ophiostoma Ulmi* door middel van het mycelium uiterst langzaam. Nog niet gepubliceerde proeven met stamstukken in een vochtige kamer gaven na 2 maanden een uitbreiding over 4 cm te zien. Het is uitgesloten, dat de afstanden die de zwam bij de proeven van B. heeft afgelegd, door groei bereikt zijn.

Transport heeft ook plaats in de kleinere vaten van het oudere hout, maar is hier langzaam en gaat niet ver. Over groote afstanden gaat het door de groote vaten in het voorjaarshout van het loopende jaar. Maar deze kunnen hiertoe pas dienen, als zij volledig ontwikkeld zijn.

*Laboratorium voor Mycologie en
Aardappelonderzoek, Wageningen
(November 1941—Januari 1942)*

LITERATUUR

1. Banfield, W. M. „Distribution of spores of wilt-inducing fungi throughout the vascular system of the elm by the sapstream.” *Phytopath.* 27: 121, 1937.
2. ——— „The relation of sap flow, vessel length, spore distribution to development of dutch elm disease in american elm.” *Phytopath.* 28: 3, 1938.
3. Banfield, W. M. and Smith, A. L., „Growth and distribution of *Ceratostomella ulmi* in tissues of elm.” *Phytopath.* 26: 86, 1936.
4. Buisman, Christine, „Ueber die Biologie u. den Parasitismus der Gattung *Ceratostomella* Sacc.” *Phytop. Ztschr.* 6 (4): 429–439, 1933.
5. ——— „Verslag v. d. onderzoekingen over de iepenziekte enz. gedurende 1935. *Tijdschr. o. Plantenziekten* 42: 21–44, 1936.
6. Clinton, G. P. and McCormick, Florence A. „Dutch elm disease”. *Connecticut Agric. Exp. Station Bull.* 389: 701–752, 1936.
7. May, Curtis, „Outbreaks of the dutch elm disease in the United States” *U.S.A. Circular* 322, 19 pp. August 1934.
8. Radulescu, Th., „Beiträge zur Kenntnis der Baumkrankheiten”. *Diss. Univ. v. München*, 36 pp., 5 Juni 1937 (*Forstwissensch. Centralbl.* 59 (19, 20, 21), 1937).
9. Tubeuf, C. Freiherr v., „Werdegang der Erforschung der sog. Ulmenkrankheit in Europa”. *Ztschr. f. Pflanzenkrankheiten* 45: 49–78, 161–189, 1935.
10. Went, Johanna C., „Compilation of the investigations on the susceptibility of different elms to *Ceratostomella ulmi* Buisman in the Netherlands”. *Phytopathologische Ztschr.* 11 (2): 181–201, 1938.
11. ——— „Verslag van de onderzoekingen over de iepenziekte gedurende 1938.” *Tijdschr. o. Plantenziekten* 45: 52–62, 1939.
12. Westerdijk, Johanna en Buisman, Christine, „De iepenziekte”. *Uitg. Nederl. Heidemij.*, 78 pp., 1929.
13. Wollenweber, H. W., „Das Ulmensterben und sein Erreger”. *Biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstwirtschaft, Flugbl.* 94, Juni 1929.
14. Wollenweber, H. W. und Stapp, C., „Untersuchungen über die als Ulmensterben bekannte Baumkrankheit”. *Arbeiten a. d. Biol. Reichsanstalt* 16 (2): 283–324, 1928.