

zoösporen – binnen 10–20 min. – tot een bolvormig lichaam, dat binnen 20 min. na de versmelting met een kiembuis kiemde.

Over de betekenis van het versmelten van zoösporen in de levenscyclus van *P. infestans* is nog niets bekend. Het gedrag van de kernen bij het versmelten van de zoösporen kon nl. niet nader worden onderzocht, omdat het nog niet is gelukt cytologische preparaten van de samengestelde zoösporen te maken.

SUMMARY

Zoospores of *Phytophthora infestans* were seen to fuse in pairs. Generally within 30 min. after zoospore discharge, fusion started by the formation of a connection between touching zoospores. Gradually the connection became shorter and thicker (fig. 1, 2 and 3), and within 30 min. the two zoospores united to form a spherical body (fig. 4). The flagella were thrown off just before the compound zoospore assumed the spherical shape. The compound zoospores germinated by a germ tube within 30 min. after their formation. The analogy with CRITOPOULOS' observations on zoospore fusion in *P. capsici* is discussed.

LITERATUUR

- BRUYN, H. L. G. DE – 1934. Methode voor het vaststellen van de vatbaarheidsgraad van aardappelknollen voor de aardappelziekte. T. Pl. ziekten 49: 77–96.
BRUYN, HELENA L. G. DE – 1951. Pathogenic differentiation in *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Phytopath. Z. 18: 339–359.
CRITOPOULOS, P. D. – 1951. Collar rot of tomato in California caused by *Phytophthora capsici*. Phytopathology 41: 937 (abstr.).

NADER ONDERZOEK OVER HET AALTJESVANGENDE AMOEBOIDE ORGANISME *THERATROMYXA WEBERI* ZWILLENBERG

With a summary:

*Some additional notes about the Nematode catching amoeboid organism,
Theratromyxa weberi Zwillenberg*¹⁾

DOOR

P. A. VAN DER LAAN

Laboratorium voor Phytopathologie, Wageningen ²⁾

1. INLEIDING

In Juni 1950 bemerkte Prof. Dr A. PH. WEBER tijdens proeven met het aardappel-cystenaaltje (*Heterodera rostochiensis* WOLLENW.), dat vele larven verdwenen, terwijl in de bakjes witte bolvormige lichaampjes verschenen, 150 tot 300 μ groot, waarin soms nog restanten van aaltjes zichtbaar waren. In samenwerking met Prof. Dr A. J. P. OORT kon toen vastgesteld worden, dat een amoeboïd organisme de aaltjes aanviel, omhulde en verteerde op de wijze, zoals reeds van andere in de grond levende amoeben bekend was (DOBELL, 1913).

¹⁾ Ontvangen voor publicatie Dec. 1953

²⁾ Gedetacheerd door de „Werkgroep Onderzoek Bestrijding Aardappelcystenaaltje T.N.O.”

Deze soorten vallen echter bacteriën, algen en diatomeeën aan, maar als vijanden van aaltjes waren amoeben nog niet bekend. Over het onderzoek verscheen een voorlopige mededeling (WEBER, ZWILLENBERG & VAN DER LAAN, 1952), terwijl later een systematische beschrijving werd gepubliceerd (ZWILLENBERG, 1953), waarbij het amoeboïde organisme de naam *Theratromyxa weberi* ZWILLENBERG ontving. Het organisme werd voorlopig ingedeeld bij de familie der *Vampyrellididae* (DOFLEIN) en de orde *Proteomyxa* (LANKESTER).

In glazen en „perspex” bakjes met cysten en larven van *H. rostochiensis* kunnen kruipende amoebe-stadia veelvuldig optreden (fig. 1); deze amoeben kunnen zich op elk moment delen of verenigen met andere amoeben van dezelfde soort tot een groter individu. Niet zelden verenigen zich vele amoeben tot één groot netvormig lichaam (fig. 2), dat vele aaltjes tegelijk vangt. Deze netten kunnen soms een grote uitgebreidheid krijgen. Wij namen waar, dat het gehele oppervlak van het bakje (diameter 30 mm) ermee bedekt was. In dit stadium is er meer overeenkomst met een slijmzwam (Myxomyceet) dan met een amoebe-achtig organisme.

Als een kruipende amoebe geen voedsel ontmoet, trekt zij zich samen tot een bolvormig lichaam met een diameter van 25–40 μ (fig. 3), dat zeer lang, zeker een jaar, onder water in leven kan blijven. Brengt men aaltjes in de buurt van deze ruststadia (hypnocyten), dan ziet men eerst zeer fijne hyaline pseudopodiën te voorschijn komen en vervolgens verandert de cyste zeer snel in een kruipende amoebe. Van het levende aaltje gaat blijkbaar een aantrekkingskracht op de amoebe uit, die het best gedemonstreerd wordt door het feit, dat de amoeben de aaltjes ook opzoeken in de aaltjescyste, ja zelfs in het ei. Wij komen hier later op terug. Dode of bewegingloze aaltjes worden door *Theratromyxa* niet aangevallen.

De amoeben zijn bijzonder kleverig en hechten zich aan alle vaste substanties, die ze kruipend tegenkomen.

Theratromyxa hecht zich dus aan het aaltje (fig. 4) en omhult het (fig. 5). Er ontstaan witte verteringscysten, die allerlei vormen kunnen hebben, van komvormig tot bolronde (fig. 6). Soms worden vele aaltjes tegelijk omhuld; in dat geval kunnen de verteringscysten zeer groot worden; vaak bevatten ze enige tientallen aaltjes. Eenmaal werden in een bolronde cyste van 350 μ diameter liefst 128 larven van *H. rostochiensis* geteld (fig. 7). In korte tijd zijn al die aaltjes verteerd, meestal in 4–5 dagen (fig. 8). Dan gaat de inhoud van de verteringscyste zich delen (fig. 9), of zij treedt naar buiten en de amoebe, die eruit kruipt, deelt zich verder, terwijl de lege hulzen van de verteringscysten achterblijven (fig. 10). De amoeben zijn direct hierna weer in staat aaltjes te attaqueren. Soms worden in de verteringscysten of in grotere rustcysten spore-achtige lichaampjes van zeer kleine afmetingen gevormd (6–7 μ), zie bij ZWILLENBERG (l.c.). Wat er verder met die sporen gebeurt is nog onbekend. Eveneens toonde ZWILLENBERG aan, dat de amoeben vele kernen bevatten (multinuclear).

2. KWEEKEN VAN DE AMOEBE¹⁾

Na de ontdekking is het WEBER gelukt om de amoebe gedurende 2 jaar thuis in cultuur te houden. Pogingen om de cultuur over te brengen naar een labora-

¹⁾ Hoewel het taxonomisch niet geheel correct is, wordt het besproken organisme hier korthedshalve met de naam „amoebe” aangeduid, daar het amoeboïde stadium van deze *Proteomyxa*-achtige bij onze waarnemingen het sterkst naar voren komt.

torium mislukten aanvankelijk doordat infecties de amoeben overwoekerden. Thans hebben wij goede cultures, doch wij kunnen ze niet steriel krijgen. De kleverige aard van alle stadia brengt met zich mee, dat *Theratromyxa* nooit vrij is van bacteriën, schimmelsporen e.d. Daar de amoeben slechts traag kruipen, zijn ze ook niet te zuiveren door ze door een agarlaag te laten kruipen, zoals men dat met Myxomyceten doet. De verteringscysten zijn zeer teer en desinfectie is niet gelukt. De cultuur bevat dus allerlei micro-organismen en slechts door steeds te zorgen voor voldoende aaltjes, kan men zorgen, dat de amoebe de overhand houdt.

Oorspronkelijk hield WEBER zijn cultures in kleine bakjes van perspex, die een uitholling bevatten. De ruwe binnenkant der holten is bijzonder aantrekkelijk voor de amoeben om zich vast te hechten. De aaltjes liggen er vaak in dichte kluwens in en het is in deze bakjes, dat wij de grote „kluwencysten” (fig. 7), die tientallen aaltjes bevatten, aantreffen. De cultures houden wij steeds in aardappelwortelsecreet, waarin de aaltjes beweeglijker zijn. De gunstigste temperatuur is 10–15 °C; licht bevordert de ontwikkeling van groenwieren in de cultures en wordt dus zoveel mogelijk buitengesloten.

Daar de mogelijkheid bestond, dat onze amoebe een imperfecte vorm zou zijn van een calcarine Myxomyceet, werden een aantal cultures enige maanden in een verzadigde CaSO_4 -oplossing gebracht. De cultures onderscheidden zich echter niet van die zonder kalk-toevoeging. Kalkconcreties konden er na toevoeging van zoutzuur niet in aangetoond worden.

Later gelukte het ons eveneens cultures te verkrijgen in kleine schalen met zeer zuivere agar, waarop een dun laagje aardappelwortelsecreet was gegoten. De aaltjes en amoeben verbleven op het oppervlak van de agarlaag. Hier werden slechts verteringscysten gevormd uit enkele aaltjes, nooit kluwencysten; zeer vaak waren de verteringscysten komma-vormig (fig. 6).

Nadat aangetoond was, dat de amoeben in de aaltjes-cysten voorkomen, blijken ze ook uitstekend te kweken te zijn in glazen bakjes (embryoschalen), mits er steeds voldoende aaltjescysten aanwezig zijn.

3. BINNENDRINGEN VAN DE AMOEBE IN DE AALTJESCYSTEN

Reeds geruime tijd was het ons opgevallen, dat de cultures, waarin cysten van *Heterodera rostochiensis* voorkwamen, beter groeiden dan die waarin slechts larven van dit aaltje werden aangetroffen. Soms waren de grote aaltjescysten dicht bezet met de kleine, witte verteringscysten en ruststadia van *Theratromyxa* (fig. 11). Bij opensnijden van dergelijke aaltjescysten werden er soms binnenin amoeben aangetroffen en zelfs werden hypnocysten in de eieren (fig. 12) gevonden. Steeds werd dit waargenomen in de cysten, die grotendeels leeg waren. De buitenwand van dergelijke cysten vertoonde geen beschadiging. Blijkbaar dringt de amoebe door de vulva naar binnen en, eenmaal in de cyste gekomen, valt zij er de larven aan. Het is ons nog niet duidelijk, hoe de amoebe-stadia in de eieren komen. Men treft ze geregeld aan. Of dergelijke eieren gescheurd waren, kon ik niet altijd met zekerheid waarnemen. Ik vermoed echter, dat de amoebe, na in de cyste enige aaltjes geconsumeerd te hebben, de lege eidoppen bij wijze van schuilplaats opzoekt, wellicht, omdat daar de vochtigheid het grootst is.

De vondst van de amoebe-stadia in de eidoppen geeft thans ook de verklaring,

hoe de amoëbe ontdekt moet zijn. Daar *Theratomyxa* in het geheel niet tegen uitdrogen bestand is, was het ons tot nu toe een raadsel, hoe uit het – steeds droog bewaarde – cystenmateriaal de amoëbe te voorschijn kwam. Thans is dat wel duidelijk: de eidoppen van enkele cysten moeten amoëben bevat hebben, die actief werden, toen de cysten in aardappelwortelsecreet gelegd werden.

Wanneer men een groot aantal aaltjescysten, die lang in een cultuur van *Theratomyxa* hebben vertoefd, opensnijdt, blijkt slechts 10 tot 15 % der cysten amoëbe-stadia te bevatten. Deze cysten bevatten weinig volle eieren, ze zijn als regel grotendeels leeg. Een cyste, waarin *Theratomyxa* aanwezig is, bevat als regel veel (5 of meer) individuen van de parasiet. Wellicht komt een amoëbe min of meer toevallig in de cyste terecht en vermenigvuldigt zich erbinnen, steeds aaltjes in of buiten de eieren aanvallend.

In een proef waarbij wij in een aantal kweekbakjes de cysten aansneden, werden deze sterker door de amoëbe aangetast, zoals de volgende cijfers laten zien.

	Aantal	
	met amoëbe	zonder amoëbe
Aangesneden cysten	8	2
Eieren daarin	56	484
Intacte cysten	2	8
Eieren daarin	21	764

4. HET VERVAARDIGEN VAN MICROSCOPISCHE PREPARATEN VAN DE AMOËBE

Uit een amoëbe-cultuur werden met een fijn glazen pipetje een groot aantal stadia opgezogen en op een dekglas geplaatst. Als men dan voorzichtig het water afzuigt, blijven de *Theratomyxa*'s aan het glas kleven en het gehele dekglas kan in de fixatievloeistof (Carnoy) worden overgebracht en vandaar in alcohol 96 %. Deze preparaten werden daarna gemonteerd in alcoholische lactophenol, waardoor de aaltjes in de verteringscysten glashelder uitkomen. De grote verteringscysten blijken uit een zeer dicht kluwen van aaltjes te bestaan. Gekleurd werden deze preparaten niet.

5. WELKE SOORTEN NEMATODEN VALT THERATOMYXA AAN?

Het enige voedsel, dat de amoëben tot nu toe accepteren, zijn beweeglijke kleine Nematoden-stadia, die ongeveer 0,4 tot 0,6 mm lang zijn. De larven der cystenaaltjes *H. rostochiensis* en *H. schachtii* (het bietencystenaaltje), evenals de larven van *Meloidogyne spec.* (= *Heterodera marioni*, het wortelknobbelaaltje) dienden als voedsel. Voorts bleek ook het weideaaltje (*Pratylenchus pratensis*), zowel in volwassen als in larve-stadium, door een actieve amoëbe-cultuur snel verwerkt te worden. Verder werd waargenomen, dat vele vrijlevende aaltjes uit de grond, zoals *Rhabdites*-soorten en *Hemicycliophora*, door *Theratomyxa* werden gegeten. Het stengelaaltje *Ditylenchus dipsaci* is blijkbaar niet zo aantrekkelijk als voedsel voor *Theratomyxa*. Kleine larven werden wel gegeten en af en toe een groter exemplaar, maar deze Nematode is wat te groot en te beweeglijk voor de amoëbe. Grote Nematoden uit de grond, zoals *Mononchus*- en *Dorylaimus*-soorten worden niet aangevallen.

Theratomyxa is dus zeker geen specifieke vijand van de cystenaaltjes, al is

het wel mogelijk, dat de amoebe, doordat hij onder bepaalde omstandigheden in de cysten en eieren kan kruipen, zich beter kan handhaven in cystenaaltjes dan op vrijlevende Nematoden.

6. VÓÓRKOMEN DER AMOEBen

Slechts tweemaal zijn stadia van *Theratomyxa* met de cysten van *H. rostochiensis* uit de grond geïsoleerd, beide malen van zandgrond (bij Ter Apel en bij Noordwijk). In cysten van het bietenaaltje (*H. schachtii*), die hoofdzakelijk in kleigrond worden gevonden, zijn nog geen amoeben gevonden.

7. HOEVEEL KUNNEN DE AMOEBen ETEN?

Het zou belangrijk zijn een indruk te krijgen, in welk tijdsverloop b.v. 1000 *Heterodera*-larven door 100 amoeben verorberd werden. Helaas is het onmogelijk het aantal amoeben in een cultuur met kruipende stadia te tellen, omdat men geen normen heeft, wat een individu van een amoebe is: de amoeben verenigen en splitsen zich vaak en vormen zelfs grote netwerken, zodat het tellen van individuen een onbegonnen taak bleek te zijn. Enige waarnemingen zijn natuurlijk wel te noemen, doch zij hebben betrekkelijke waarde. In glazen bakjes van 3 cm diameter, waarin ongeveer 1000 amoebe-stadia geteld konden worden, bleken ongeveer 10.000 larven van *H. rostochiensis* in een week alle vernietigd te zijn. In 4 bakjes met 8 mm diameter, tezamen ongeveer 400 amoebestadia bevattend, waren in 5 dagen tijds 8000 exemplaren van *Pratylenchus pratensis* opgegeten. De capaciteit tot verdelging der aaltjes is dus onder gunstige omstandigheden zeer groot.

8. INVLOED VAN UITWENDIGE OMSTANDIGHEDEN

Theratomyxa groeit bij zeer veel uiteenlopende temperaturen. Reeds bij 2 °C blijft de amoebe in leven, al is de voortplanting geremd. Bij 10–15 °C is de vermenigvuldiging zeer goed. Vermeerdering is ook bij 24 °C nog mogelijk.

Theratomyxa is echter uitermate gevoelig voor droogte. Als de cultuur voor een zeer korte tijd droog komt te liggen, zijn alle stadia dood, althans niet meer tot activiteit te brengen. Over de sporen kunnen wij niet oordelen, daar wij ze nooit verder konden vervolgen. In elk geval is omtrent de vorming van droogte-resistente stadia niets gebleken.

Voortdurende sterke belichting doet de bewegingen der kruipende amoeben ophouden.

9. PROEVEN IN POTTEN MET GROND

Een poging werd gedaan, de amoebe in het natuurlijk milieu (de grond), cysten van het aardappelcystenaaltje te laten infecteren. In porseleinen potjes werd 150 gram zandgrond gebracht, voorts 100 cysten van oogst 1952, die niet besmet waren met amoeben. Bij een deel van de potjes werden 50 cysten van het aaltje gebracht, die enige maanden in amoebe-cultures hadden vertoefd en veel amoeben bevatten. Een ander deel van de potjes kreeg deze geïnfecteerde cysten niet en diende als contrôle. De potjes werden op constante vochtigheid en temperatuur gehouden. Na 6 maanden werden inderdaad in enkele der geïnfecteerde potjes amoeben teruggevonden. Van vermeerdering der amoeben was echter geen sprake, integendeel, de meeste amoeben waren verdwenen. Waarschijnlijk heeft *Theratomyxa* vele natuurlijke vijanden in de grond.

10. MOGELIJKHEDEN VOOR EEN PRACTISCHE TOEPASSING TER BESTRIJDING VAN DE AARDAPPELMOEHEID

Voor zover wij thans kunnen beoordelen is de kans, dat *Theratromyxa* een bruikbare bestrijding tegen aaltjes zal opleveren, zeer gering. Onder natuurlijke omstandigheden verspreidt de amoebe zich weinig. Doordat hij zo slecht tegen indrogen kan, kan van een kunstmatige verspreiding met behulp van waterige suspensies niet veel verwacht worden. Het is wel mogelijk de amoebe te kweken, maar er kan toch ook weer niet op korte termijn een massale vermeerdering plaats vinden.

De ontdekking, dat de amoebe ook aaltjescysten binnendringt, gaf ons hoop, dat wij hem voor praktische doeleinden zouden kunnen gebruiken. Doch *Theratromyxa* is niet zo actief, dat de meeste cysten er door worden vernietigd. Slechts een gering percentage der cysten wordt aangevallen.

Het feit, dat *Theratromyxa* niet specifiek is voor cystenaaltjes, maar vele kleine Nematoden-soorten kan aanvallen, verkleint de kansen eveneens. Voorts is gebleken, dat op de percelen, waar de amoebe is aangetroffen, de aardappelmoeheid sindsdien zeker niet is afgenomen. Hoe interessant dit organisme uit een wetenschappelijk standpunt ook is, uit practisch oogpunt moeten wij er dus voorschands niet te veel van verwachten.

Het aantal natuurlijke vijanden van Nematoden, dat zeer talrijk is (vgl. DOLLFUS, 1947), kon door deze ontdekking met dit organisme vermeerderd worden, doch evenmin als tot nu toe de Microsporidiën, Bacteriën, schimmels, roofaaltjes en Enchytraeiden, die elk onder bepaalde omstandigheden aaltjes vernietigen, is *Theratromyxa* in dit opzicht bijzonder werkzaam.

Hierbij wil ik graag dr. ir A. P. KOLB en mej. A. A. RIJKS dank zeggen voor hun hulp bij het photographeren en het kweken van *Theratromyxa*.

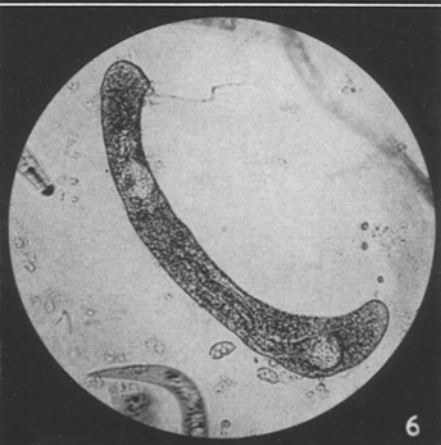
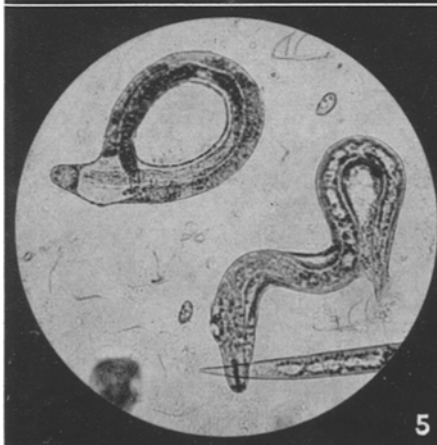
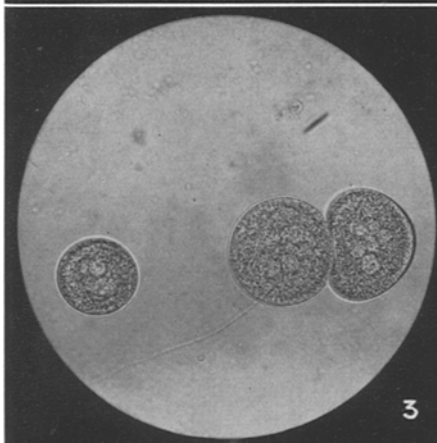
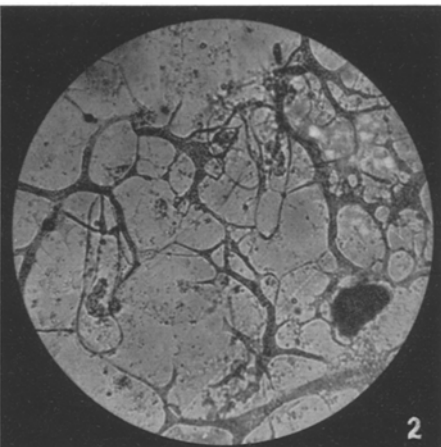
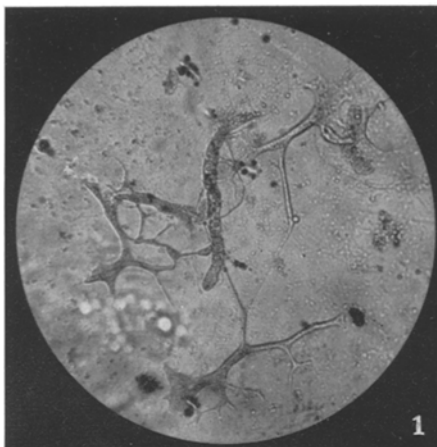
SUMMARY

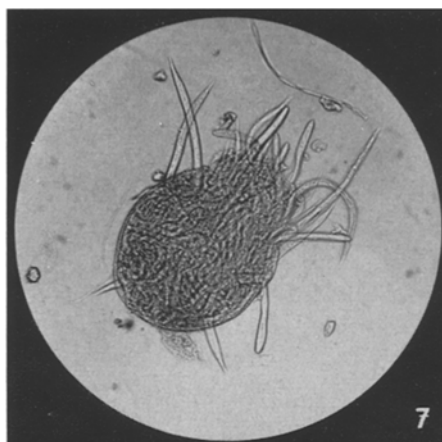
In continuation of the preliminary report (1952), some additional facts are given about the nematode-catching organism *Theratromyxa weberi* ZWILLENBERG (see figures 1-12).

The organisms are capable of penetrating *Heterodera* cysts where they feed on larvae newly hatched from the eggs. Often the resting stages of the organism are found in empty egg shells (fig. 12). They may not be able to penetrate the

Verklaring der figuren (*Explanation of figures*)

- Fig. 1. Kruipende stadia van het organisme.
Creeping stages of the organism.
- Fig. 2. Vele kruipende stadia vormen samen een groot netwerk met een diameter van 30 mm.
Many organisms have fused with each other and have formed a large net-work, diameter till 30 millimetres.
- Fig. 3. Ruststadia van *Theratromyxa*, 25-40 μ diam.
Resting stages of the organism, 25-40 mikron diameter.
- Fig. 4. *Theratromyxa* valt een larve van *Heterodera rostochiensis* aan en hecht zich aan zijn kop.
The organism attacks a larva of H. rostochiensis and clings to the head of the eelworm.
- Fig. 5. De aaltjes worden verder omhuld.
The eelworms are engulfed by the organism.
- Fig. 6. Verteringscyste van *Theratromyxa*, het aaltje is reeds verdwenen.
Digestive cyst of Theratromyxa, the nematode has disappeared already.

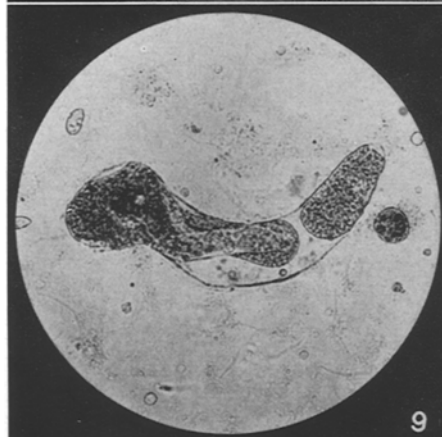




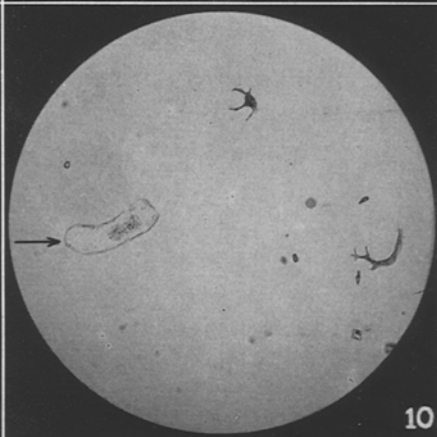
7



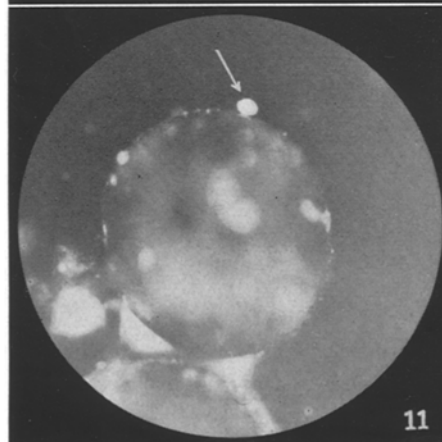
8



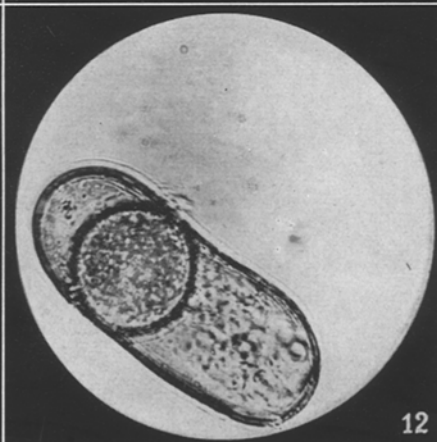
9



10



11



12

egg shell and the supposition is made that the organism is seeking shelter only.

Cultivation of the organism is not yet possible under sterile conditions. Non-sterile cultures, however, are easy to keep. The culturing conditions are in short: Temperature 10 to 15 °C. No light to be admitted. Food to be given weekly, always larvae of *Heterodera rostochiensis*. The cultures should be kept under water, as the organism cannot withstand dryness.

Nematodes attacked by *Theratomyxa* include the genera *Heterodera*, *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Rhabditis*, and *Hemicycliophora*. *Ditylenchus dipsaci* is sometimes eaten, mainly the small larvae. Bigger forms of Nematodes, such as *Mononchus* and *Dorylaimus* are not attacked.

Theratomyxa has been isolated only twice, both times from sandy soil in the Netherlands (near Noordwijk, prov. of South Holland and near Ter Apel, prov. of Groningen). The number of eelworms which the amoeba can destroy may be very large. Once, 128 larvae of *Heterodera* were found in one digestive cyst, which had a diameter of 350 microns (fig. 7). Digestion follows within a few days. However, as the organisms are capable of fusing with each other or dividing by plasmotomy at any time, it is very difficult to estimate the real number of larvae which an amoeba can destroy. Within 5 days 8000 individuals of *Pratylenchus* were eaten by about 400 amoebae. Sometimes the *Theratomyxa* forms large networks with a diameter of 30 millimetres and closely resembles a Myxomycete (fig. 2).

Some small pot experiments were done. The soil was infested with cysts, contaminated with *Theratomyxa* and uncontaminated. The pots were held at constant moisture and temperature. After six months the cysts were removed and examined. No progress in propagation of *Theratomyxa* was found.

The possibilities of biological control of plant-parasitic nematodes by means of *Theratomyxa* are discussed. Owing to the slow rate of spread, the great susceptibility to dryness and the non-specific character of the organism's prey, it must be admitted that no high expectations of its practical use can be entertained.

LITERATUUR

- DOBELL, C. - 1913. Arch. f. Protistenk. 31: 317.
DOLLFUS, R. PH. - 1946. Parasites des Helminthes, Paris. Ed. Le Chevalier.
WEBER, A. PH., L. O. ZWILLENBERG en P. A. VAN DER LAAN - 1952. Nature 169: 834.
ZWILLENBERG, L. O. - 1953. Anth. v. Leeuwenhoek 19: 101.

Verklaring der figuren (*Explanation of figures*)

- Fig. 7. Grote verteringscyste, die meer dan 100 *Heterodera*-larven bevat.
Large digestive cyst, wherein more than 100 nematodes are caught.
- Fig. 8. Verteringscyste met grote excretie-vacuolen.
Digestive cyst with large excretion vacuoles.
- Fig. 9. Deling van de inhoud van de verteringscyste.
Division of the contents of the digestive cyst.
- Fig. 10. Kruipende organismen, juist gedeeld, en een lege huls van de verteringscyste.
Creeping stages of Theratomyxa and the empty hull of the digestive cyst.
- Fig. 11. Cyste van *Heterodera rostochiensis* met de ruststadia van *Theratomyxa* erop vastgekleefd.
Cyst of the potato root eelworm with the small resting stages of the organism attached to it.
- Fig. 12. Lege ei-huls van het aardappelcystenaaltje met een ruststadium van het organisme erin.
Empty egg-shell of Heterodera rostochiensis with a resting stage of Theratomyxa in it.