

ONDERZOEKINGEN OVER SCHIMMELS,
DIE PARASITEREN OP DE CYSTE-INHOUD VAN HET
AARDAPPELCYSTENAALTJE
(*HETERODERA ROSTOCHIENSIS* WOLLENW.)

*With a summary: Investigations on fungi, predacious on the cyst contents of the
potato root eelworm (Heterodera rostochiensis WOLLENW.)*

DOOR

P. A. VAN DER LAAN

Laboratorium voor Phytopathologie, Wageningen¹⁾

1. BIOLOGISCHE BESTRIJDING VAN OP PLANTEN PARASITERENDE AALTJES

De bestrijding van planteziekten met behulp van de natuurlijke vijanden van de ziekteverwekker of de plaag, lijkt altijd zeer aantrekkelijk. Weliswaar is de kans van slagen van een dergelijke bestrijding niet groot, daar men de oecologische omstandigheden, waaronder de vijand en zijn parasieten leven, veelal onvoldoende kent, maar toch wordt deze wijze van bestrijding steeds weer geëntameerd. In de gevallen immers, waar zij slaagt, wordt de kwaal ook voorgoed beteugeld.

Tot nu toe hebben bij de cystenaaltjes de directe bestrijdingsmethoden nog niet tot een succes geleid, ondanks vele jaren onderzoek. Wel zijn thans de resultaten van het resistentie-onderzoek, in het bijzonder met betrekking tot het aardappelcystenaaltje (*Heterodera rostochiensis* WOLLENW.) zeer hoopvol, doch op korte termijn moet men zijn verwachtingen in dit opzicht niet te hoog stellen.

Dat de vooruitzichten op een succesvolle biologische bestrijding van de aaltjes niet groot zijn, moge blijken uit de volgende kleine bloemlezing uit de literatuur.

Reeds MARCINOWSKI (1909) schonk in haar onderzoek over planteziekten veroorzakende aaltjes, aan de mogelijkheden van biologische bestrijding weinig aandacht, daar de vooruitzichten op praktische toepassing volgens haar niet groot zouden zijn. STEINER & HEINLI (1922) kweekten *Mononchidae* (grote roofoaaltjes), doch potproeven mislukten helaas, en zij achtten de kans zeer gering, dat deze roofoaaltjes van enig praktisch nut zouden kunnen zijn. BAUNACKE (1923) vestigde wel de aandacht op de verschillende mogelijkheden van biologische bestrijding, maar werkte er ook al niet verder over door. RADEMACHER & SCHMITT (1933), evenals de voorgaande onderzoeker over het bietecystenaaltje (*Heterodera schachtii* SCHMIDT) werkende, achtten parasieten van cystenaaltjes van weinig betekenis, daar er in Europa geen gevallen uit de praktijk bekend waren, waarbij parasieten de populatie der aaltjes beïnvloedden.

Ook THORNE (1928), die in de U.S.A. zeer veel over het bietecystenaaltje werkte, besteedde aandacht aan de natuurlijke vijanden van dit aaltje. Tijdens een studie van meer dan 38.000 cysten vond hij vaak andere soorten aaltjes in de cysten. Meestal waren dit echter kleine, vrijlevende aaltjes zonder stekel, die niet parasitair zijn (*Acrobeles*- en *Cephalobus*-soorten). Soms werd *Dorylaimus obtusicaudatus* aangetroffen, enkele malen met een ei op de stekel gespietst. Op een zo groot aantal cysten heeft dat evenwel niets te betekenen. LINFORD, YAP & OLIVEIRA (1938) vonden in potproeven met toevoeging van organische stof, waarin zich vele aaltjesvangende schimmels en roofoaaltjes ontwikkelden, wel een afnemende van de populatie van het wortelknobbelaaltje (*Meloidogyne* sp.), doch ook dit onderzoek leidde niet tot een toepassing

¹⁾ Gedetacheerd door de Werkgroep Onderzoek Bestrijding Aardappelcystenaaltje T.N.O.; thans: Laboratorium voor Toegepaste Entomologie, Amsterdam.

in de praktijk¹⁾. Eveneens kregen Franse onderzoekers (DESCHIENS c.s., 1943) bij *Meloidogyne* in potproeven enig resultaat na toevoeging van aaltjesvangende schimmels. Ook in Rusland verricht men de laatste jaren onderzoek over biologische bestrijding van *Meloidogyne* met deze aaltjesvangende schimmels (GORLENKO, 1956).

DOLLFUS (1946) beschreef in zijn lijvige bibliografie „Parasites des helminthes” wel een zeer groot aantal parasietesoorten van aaltjes, maar moest eveneens erkennen, dat de biologische bestrijding nog niet gerealiseerd kon worden. Meer dan 50 soorten aaltjesvangende schimmels werden door DRECHSLER (1941) beschreven. DUDDINGTON (1950) isoleerde vele aaltjesvangende schimmels, doch achtte het onderzoek naar de biologische bestrijding moeilijk, omdat daarvoor veel oecologische kennis nodig is. De parasitaire schimmels bleken vooral aanwezig in organisch rijke grond. GOFFART (1952), de verschillende soorten cystenaaltjes onderling vergelijkend, kwam tot de conclusie, dat *Heterodera rostochiensis* weinig parasieten heeft. Andere *Heterodera*-soorten, vooral *H. major* FRANKLIN en ook *H. schachtii*, bleken steeds een groter aantal beschimmelde, verrotte of loze cysten dan het aardappelcystenaaltje te vertonen. *H. rostochiensis* is blijkbaar een zeer vitale soort met grote weerstand tegen ongunstige uitwendige omstandigheden.

In hun overzicht over aaltjes als planteparasieten constateerden CHITWOOD & OTEIFA (1952), dat de natuurlijke vijanden der nematoden zeer talrijk zijn. Vele protozoën en bacteriën zijn bekend als parasieten van vrij levende aaltjes. De carnivore aaltjes hebben een te laag reproductievermogen, om een rol van betekenis te kunnen spelen. Hoopvoller waren de schrijvers gestemd ten opzichte van sommige parasitaire *Aphelenchoidae*, speciaal van het geslacht *Seinura*, gekenmerkt door een lange staart. Deze roofaaltjes vermenigvuldigen zich sneller, doch zijn niet specifiek in hun voedselkeuze.

HUTCHINSON & MAI (1954) entten de aaltjesvangende schimmel *Dactylaria eudermata* DRECHSL. op agarplaten met een dunne laag gesteriliseerde tuingrond. Na 10 dagen had de schimmel zich over de gehele plaat verbreid en werden er 5000 larven van *Heterodera rostochiensis* aan toegevoegd. Nadat de aaltjes drie weken met de schimmel in aanraking waren geweest, werd de inhoud van de plaat gemengd door een pot met steriele grond. Deze proef werd vele malen herhaald, doch had geen enkel positief resultaat.

Enkele gegevens zijn iets bemoedigender. De reeds boven aangestipte proeven van LINFORD c.s., DESCHIENS c.s. en GORLENKO met *Dactylella*-, *Dactylaria*- en *Arthrobotrys*-soorten, welke schimmels de aaltjes door middel van speciale vangapparaten vangen en doden, hadden in potten wel resultaat. Doch het onderzoek geschiedde bij *Meloidogyne*, die geen cysten vormt en waarvan de larven steeds in de grond verblijven. Bijzonder interessant is de waarneming van GOODEY (1938), dat *Arthrobotrys oligospora* zelfs de aaltjes (in dit geval *Ditylenchus dipsaci*) in de bladeren van planten aantastte. De genoemde schimmels dringen evenwel geen cysten binnen, zoals wij konden aantonen. Daar bij cystenaaltjes de larven de langste tijd binnen de cyste doorbrengen, ligt het voor de hand, dat dergelijke schimmels, die dus alleen de vrijlevende stadia aanvallen, als parasieten van cystenaaltjes van weinig betekenis zullen zijn.

Voorts verdient hier besproken te worden het onderzoek van SCHAEFFENBERG & TENDL (1951) over de betekenis van Enchytraeïden als aaltjes-vijanden. De schrijvers baseerden hun onderzoek op de waarnemingen van JEGEN (1920), die constateerde, dat bij aardbeien, aangetast door soorten van de aaltjesgeslachten *Tylenchus* en *Aphelenchoides*, Enchytraeïden van de genera *Enchytraeus*, *Pachydrilus* en *Fridericia* de ontwikkeling van genoemde aaltjessoorten remden. JEGEN veronderstelde, dat de Enchytraeïden door uitwendige vertering de aaltjes zouden doden, doch vermeldt hierover geen waarnemingen. Enchytraeïden komen speciaal in organisch rijke grond voor en geven vaak aanleiding tot betere structuur van de grond.

SCHAEFFENBERG & TENDL infecteerden potplanten van bieten met *Heterodera schachtii* en voegden daarna Enchytraeïden (*Fridericia* sp.) toe. Het resultaat van de proeven werd slechts beoordeeld aan de stand van de bieten en het uiteindelijk aantal cysten in de potten. Of de Enchytraeïden de aaltjes doodden werd niet geobserveerd. Gunstige resultaten werden verkregen, indien de Enchytraeïden werden toegevoegd aan bieteplanten met beginnende aaltjes-aantasting. De bieten werden dan weer gezond, de controles zonder Enchytraeïden en met aaltjes, werden zieker. Het effect van de Enchytraeïden op bieten met oudere aaltjes-aantasting was juist omgekeerd: de Enchytraeïden hielpen de zieke bieten eerder aan hun einde dan de aaltjes alleen! De verklaring voor deze, deels gunstige invloed der Enchytraeïden op de aaltjes-aantasting moet m.i. niet gezocht worden in het – nooit geconstateerde – feit dat de wormen

¹⁾ Ook blijft de vraag open, of inderdaad de aaltjesvijanden de geringere aaltjes-aantasting in deze proeven hebben veroorzaakt, of dat een indirecte invloed van de organische stof in de grond, via de plant op de aaltjesontwikkeling in het spel was (vgl. VAN DER LAAN, 1956).

op de aaltjes parasiteren. Dat deze detritus-eters ook wel eens nematoden naar binnen krijgen, lijdt voor mij geen twijfel. Welke factoren dan wel het achteruitgaan van populaties van parasitaire aaltjes bij aanwezigheid van Enchytraeïden bepalen, is evenwel nog onbekend.

Van meer belang voor ons onderzoek kunnen zijn de schimmels, die *Heterodera*-cysten binnendringen en de eieren aantasten. In de loop der jaren zijn verschillende soorten bekend geworden, voornamelijk gevonden in de cysten van het bietecystenaaltje (*H. schachtii*). De oudste berichten zijn afkomstig van KORAB (gerefereerd door GOFFART, 1932). In Zuid-Rusland vond KORAB sterke parasitering van de cysten van het bovengenoemde aaltje, tot 80% toe; de onderzoeken zouden berusten op 250.000 cysten. De belangrijkste parasiet was *Torula heteroderae* JACQ., thans *Phialophora heteroderae* (JACQ.) VAN BEYMA geheten. Deze doodt de larven en de eieren en kleurt de cyste-inhoud roodbruin. Later vond ROZSYPAL (1934) in Tsjechoslowakije bij een onderzoek van 25.000 cysten ook verscheidene schimmelsoorten, vooral *Trichosporium populneum* L. et F. De stam van deze schimmel, afkomstig van ROZSYPAL, werd door VAN BEYMA THOE KINGMA (1937) identiek bevonden met *Phialophora heteroderae*. Het lag dus voor de hand aan deze *Phialophora* bij ons onderzoek in de eerste plaats aandacht te schenken.

Ook de schimmel *Isaria destructor* wordt telkens genoemd als parasiet van de cyste-inhoud (BAUNACKE, 1923; RADEMACHER & SCHMITT, 1933). Deze soort is identiek met *Metarrhizium anisopliae* SOROKIN, die reeds sinds 75 jaar één der meest geliefde objecten is voor het onderzoek naar de biologische bestrijding van insecten in de warmere streken (vgl. FRIEDERICHs, 1920). Het onderzoek aan deze schimmel (de „green muscardine”) gaat terug tot METSCHNIKOFF in 1879 (vgl. SCHOEVERS, 1916). In 1884 richtten Russische groot-grondbezitters reeds een fabriek op, waar deze schimmel op rijst werd gekweekt. De fabriek leverde sporensuspensies af, die tegen de larven van de bietesnuitkever in de suikerbietenvelden werden gebruikt. Ook op andere plaatsen ter wereld (Trinidad o.a.) heeft men op grote schaal onderzoek met deze schimmel gedaan, maar ten slotte heeft men deze methode van bestrijding opgegeven, waarschijnlijk ook, omdat sindsdien de chemische bestrijding naar voren kwam. *M. anisopliae* heeft talrijke gastheren, doch volgens FRIEDERICHs moet het insect tevoren verzwakt zijn, voordat van aantasting sprake is. In Duitsland, noordelijker gelegen dan de andere vindplaatsen, trof hij deze schimmel niet aan. Dat deze parasitaire schimmel, vijand van talrijke insectesoorten, ook de cyste-inhoud der aaltjes aantast, lijkt waarschijnlijk.

Behalve *Phialophora* en *Metarrhizium* zijn er nog opgaven van enige andere schimmels, die in de cysten zijn aangetroffen, o.a. ook soorten van het bekende geslacht van insektenaantastende schimmels *Entomophthora*. Verder wil ik hier nog één soort noemen, nl. *Cylindrocarpon radicola*. Deze schimmel is echter tevens bekend als planteparasiet. GOFFART (1932) vond *Cylindrocarpon* herhaaldelijk in cystenmateriaal, dat lang bewaard was.

Andere micro-organismen, die aaltjes aantasten, zijn verscheidene malen beschreven. Bij DOLLFUS kunnen wij er vele vinden. Het zijn echter alle min of meer incidentele vondsten, niet speciaal aan cystenaaltjes, en hun betekenis voor de biologische bestrijding is twijfelachtig. Zo beschreef THORNE (1940) de Sporozoe *Duboscquia penetrans* als een specifieke parasiet van het weideaaltje (*Pratylenchus pratensis* DE MAN). Protisten of bacteriën, die de cyste-inhoud aantasten, zijn echter tot nu toe niet bekend geworden.

Ten slotte moeten wij hier spreken over de aaltjesvangende amoebe (WEBER, ZWILLENBERG & VAN DER LAAN, 1952; ZWILLENBERG, 1953; VAN DER LAAN, 1954), thans beschreven als *Theratomyxa weberi* ZWILLENB. Dit organisme is zeer actief in het verslinden van grote hoeveelheden larven van het aardappelcystenaaltje. Het is in de vrije natuur tweemaal gevonden, beide malen in cysten van *H. rostochiensis* uit zandgrond (Ter Apel en Noordwijk).¹⁾ Waarschijnlijk is het een parasiet van vrijlevende aaltjes in de grond, die af en toe ook wel eens een cyste binnendringt. Tevens valt het de larven van *Heterodera*-soorten aan. Voor de bestrijding van het aardappelcystenaaltje in de praktijk is het evenwel van weinig betekenis.

2. a. De oorsprong van de schimmels, die cysten kunnen aantasten

In ons onderzoek hebben wij ons beperkt tot schimmels, die de cyste-inhoud aantasten. Enkele soorten waren bekend, zoals boven besproken is. Andere hebben wij geïsoleerd uit cysten van *Heterodera rostochiensis*, die afkomstig waren uit verschillende delen van Nederland en Engeland, als ook van de Kanaaleilanden.²⁾

Het onderzoek kwam in een nieuwe fase, toen bleek, dat het aardappelcystenaaltje oorspronkelijk afkomstig moet zijn geweest uit Zuid-Amerika (WILLE & BAZAN DE SEGURA, 1952). Daar men bij het onderzoek naar natuurlijke vijanden deze steeds moet zoeken in het land van oorsprong, werd dan ook onmiddellijk bij mijn onderzoek aan materiaal van *H. rostochiensis*, afkomstig van Peru,³⁾ voorrang gegeven. Uit deze „Peruviaanse” cysten werd een groot aantal schimmels geïsoleerd, waarvan enige meer dan 10-maal. Naast vele, kennelijk saprofytisch levende fungi, werden er enkele gevonden, die nader onderzoek waard leken. Het Centraal Bureau voor Schimmelcultures verleende zijn bemiddeling bij de determinatie, waarbij bleek, dat enkele schimmels mycologisch van belang waren (STOLK, 1954).

Op deze wijze werd een reeks schimmelstammen verkregen, die mogelijk parasitair waren tegen het aardappelcystenaaltje. Of ze werkelijk de cyste-inhoud aantastten, moest echter nader worden onderzocht.

Een cyste is een nematode-wijfje, dat afgestorven is en waarin naast de levende eieren tevens de resten van de organen van het wijfje nog aanwezig zijn. De cyste heeft twee openingen, de oorspronkelijke mondopening en de vulva van het wijfje; steriel is dus de cyste-inhoud allerminst en de kans, naast parasitaire schimmels ook saprofyt te isoleren, is groot.

2. b. De gebruikte schimmelsoorten

Voor het isoleren van de parasitaire schimmels was het nodig, de cysten gedurende een bepaalde tijd onder te dompelen in een desinfectans en ze daarna te enten op een steriele agarbuis. Verschenen er dan na verloop van enige weken geen schimmels of bacteriën, dan kon men aannemen, dat de cyste, althans uitwendig, ontsmet was. Na enige proevenseries met sublimaat, waterstofperoxyde

¹⁾ Eind 1955 is deze of een dergelijke amoebe ook in Engeland, bij Cambridge gevonden, naar Mr. T. D. WILLIAMS mij meedeelde. Kort daarop trof Dr. R. D. WINSLOW een dergelijk organisme aan als parasiet van het bietecystenaaltje (*H. schachtii*) bij Sarnia, Ontario, Canada.

²⁾ Gaarne zeg ik hierbij Prof. B. G. PETERS, destijds Rothamsted Experimental Station, hartelijk dank voor zijn medewerking.

³⁾ Senora Ing. C. BAZAN DE SEGURA dank ik hierbij gaarne voor het ter beschikking stellen van materiaal.

en alcohol, bleek een onderdompeling gedurende een tot twee minuten in 75% alcohol het beste resultaat te geven. Als men voorts aldus behandelde cysten in aardappelwortelsecrēt legt, blijken de larven er normaal uit te komen; de inhoud is dus niet beschadigd door de behandeling.

Vervolgens werd een aantal cysten geïnfecteerd met een parasitaire schimmel (*Phialophora heteroderae*). Daartoe ontsmetten wij de cysten op bovenbeschreven wijze en entten ze op agarbuizen met een *Phialophora*-cultuur. Na drie tot vier weken werden de cysten er uit gehaald, weer oppervlakkig ontsmet en in een schone agarbuis gebracht. Dan bleek *Phialophora* er weer uit te voorschijn te komen. Pas na drie minuten dompelen in alcohol bleken de *Phialophora*-sporen gedood te zijn. Parasitaire schimmels, die in de cysten zijn binnengedrongen, konden dus op deze wijze geïsoleerd worden.

Ook door observatie van grote hoeveelheden cysten onder de prepareermicroscop konden parasitaire schimmels worden gevonden. Sommige cysten vertoonden zwarte vlekken. Deze werden afzonderlijk op buizen met kers- en moutagar geënt en van de schimmel, die er het talrijkst uitkwam, werd een rein-cultuur gemaakt.

Voorts werden honderden cysten na oppervlakkige ontsmetting met alcohol één voor één op buizen geënt. De schimmels, die er vele malen uit groeiden, werden geïsoleerd.

Zo werden ten slotte stammen verkregen, die mogelijk parasitair zijn.

In de regel gebruikte ik jonge cysten, die grotendeels gevuld waren met eieren met levende inhoud. Oudere, reeds half lege cysten zijn namelijk gevuld met allerlei afval, waarop saprophyten welig tierē. Uit dergelijke cysten is het heel moeilijk parasieten te isoleren.

1. Over de pycniden van een *Phoma*, die in cysten van Nederlandse oorsprong geregeld worden aangetroffen (Fig. 1), werd al eerder bericht (VAN DER LAAN, 1953). Sindsdien is deze soort door het Centraal Bureau voor Schimmelcultures (C.B.S.) te Baarn gedetermineerd als *Phoma tuberosa* MELH., ROSENB. & SCHULTZ. Een onderzoek naar cysten, verzameld in verschillende delen van Nederland, wees uit, dat de aantasting nooit meer dan 5% bedroeg, zodat deze inheemse parasiet blijkbaar niet zeer belangrijk is.
2. Andere cysten van Nederlandse oorsprong vertonen vele, kleine zwarte stippen (Fig. 2). Hiervan isoleerden wij de schimmel *Colletotrichum atramentarium* (BERK. et BR.) TAUB., die ook wel aardappels aantast. Deze schimmel is nauwelijks als parasiet aan te merken.
3. Regelmatig isoleerden wij uit Nederlandse cysten de schimmel *Monotospora daleae* MASON, een vrij algemene bodemschimmel, die in het oog valt door de typische aleurio-sporen (Fig. 5). Blijkbaar komt deze schimmel ook in Denemarken in de cysten voor, daar Dr. P. BOVIEN mij in 1953 een preparaat van een cyste met deze schimmel toonde.
4. Een aantal schimmels werd geïsoleerd uit een partij cysten, ontvangen uit Engeland. Van enig belang is wellicht *Pseudeurotium ovalis* STOLK, die uit materiaal van het eiland Jersey te voorschijn kwam. Deze schimmel vormt zeer duidelijk herkenbare vruchtlichamen met ronde asci (Fig. 6).
5. Eveneens uit Engels materiaal werd geïsoleerd de gele *Penicillium vermiculatum* DANGEARD, een algemene, ook hier voorkomende soort, die mogelijk ook als parasiet fungeert.

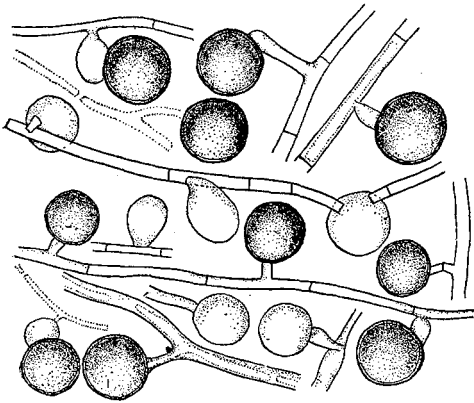


Fig. 5

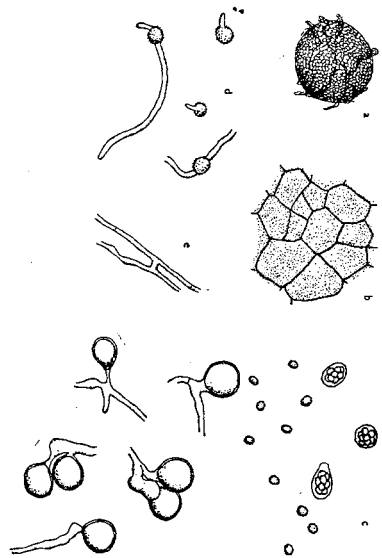


Fig. 7

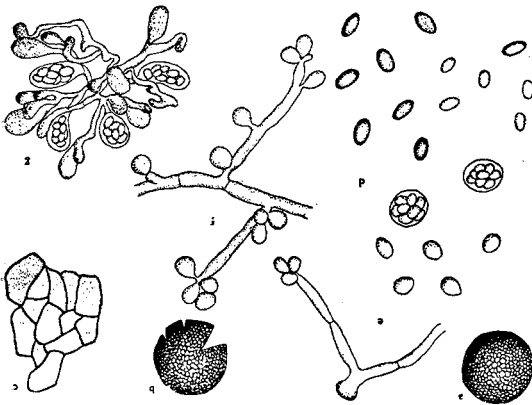


Fig. 6

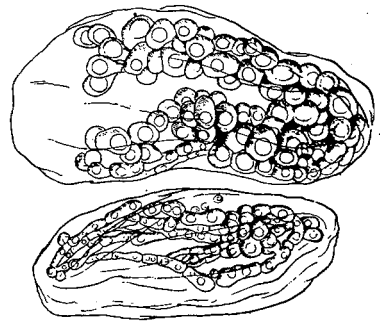


Fig. 8

FIG. 5. *Monotospora daleae*, aleuriosporen aan de hyfen (naar MASON, 1933).

Monotospora daleae, hyphae with aleuriospores (after MASON, 1933).

FIG. 6. *Pseudeurotium ovalis*, peritheciën, asci en ascosporen (naar STOLK, 1955).

Pseudeurotium ovalis, perithecia, asci and ascospores (after STOLK, 1955).

FIG. 7. *Anixiopsis stercoraria*, peritheciën, asci en ascosporen (naar STOLK, 1955).

Anixiopsis stercoraria, perithecia, asci and ascospores (after STOLK, 1955).

FIG. 8. Eieren van *Heterodera schachtii*, aangetast door *Phialophora heteroderiae* (naar ROZSYPAL, 1934).

Eggs of *Heterodera schachtii*, affected by *P. heteroderae* (after ROZSYPAL, 1934).

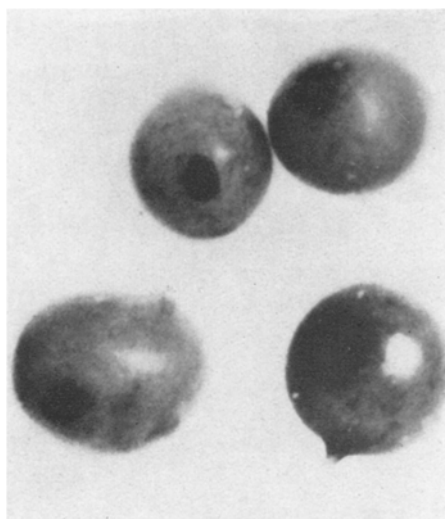


Fig. 1
Cysten met pycniden van *Phoma tuberosa*.
Cysts with pycnids of *Phoma tuberosa*.

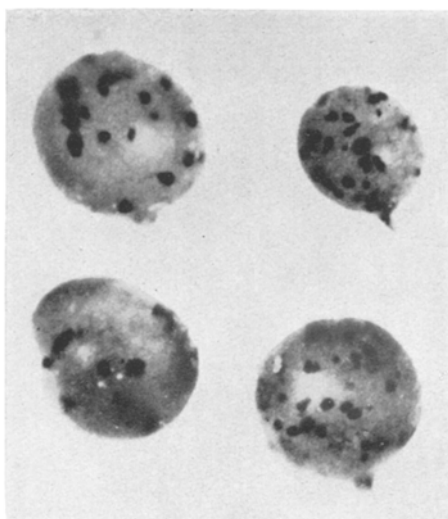


Fig. 2
Cysten met sklerotiën van *Colletotrichum atramentarium*.
Cysts with sclerotia of *Colletotrichum atramentarium*.

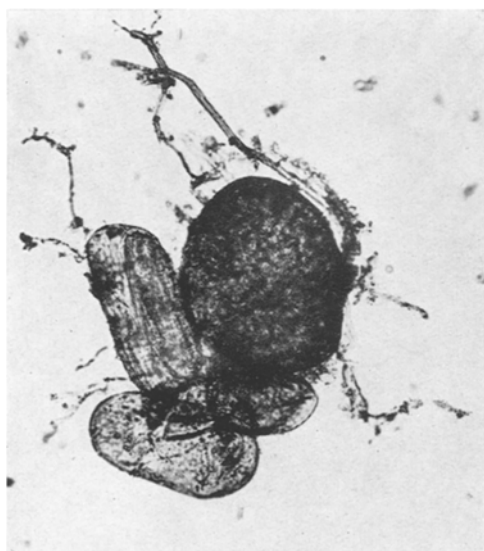


Fig. 3
Een vruchtlichaam van *Anixiopsis stercoraria* tussen eieren van *Heterodera rostochiensis*.
A fruitbody of *Anixiopsis stercoraria* between eggs of *Heterodera rostochiensis*.



Fig. 4
Ei van *Heterodera rostochiensis* in het mycelium van *Phialophora heteroderae*.
An egg of *H. rostochiensis* in the mycelium of *P. heteroderae*.



Fig. 9

Aantasting van eieren van *Heterodera rostochiensis* door *Phialophora heteroderae*. Eggs of *Heterodera rostochiensis* affected by *P. heteroderae*.

FIG. 9. Begin der aantasting.

Beginning of attack.

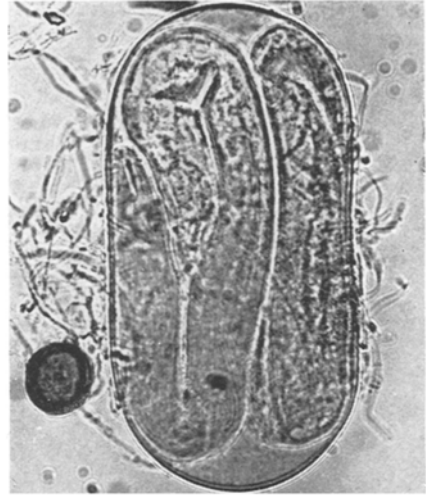


Fig. 10

FIG. 10. De schimmel is het ei binnengedrongen en zuigt de larve uit.

The fungus has penetrated the egg and is sucking the larva out.

FIG. 11. De uitgezogen larve-huid blijft achter.

The empty cuticle of the larva is left.



Fig. 11



Fig. 12

FIG. 12. Hyphen en rustmycelium van *Cylindrocarpon radiculicola* op eieren van *Heterodera rostochiensis*. De schimmel dringt het ei niet binnen.

Hyphae and resting mycelium of Cylindrocarpon radiculicola on eggs of Heterodera tochiensis. This fungus does not penetrate the egg.

6. Een groot aantal schimmelstammen werd uit Peruviaanse cysten geïsoleerd. Uit een oogpunt van parasitaire activiteit was verreweg de belangrijkste de soort *Anixiopsis stercoraria* HANSEN (vgl. ook STOLK l.c.), een zeer typische Ascomyceet met bolvormige peritheciën en ronde asci (Fig. 3 en 7). Van deze schimmel kon, zoals hierachter volgt, aangetoond worden, dat hij actief de cysten binnendringt.
7. Een zwarte, vrij langzaam groeiende schimmel, waarvan de sporen verwantschap toonden met *Phialophora*, werd door het C.B.S. gedetermineerd als *Margarinomyces heteromorpha* MANGENOT. Ook deze is uit Peru afkomstig en waarschijnlijk parasitair.
8. Een derde schimmel, uit het Peruviaanse materiaal verkregen, is verwant aan *Penicillium* en door het C.B.S. voorlopig in het geslacht *Scrophulariopsis* geplaatst. In dit artikel wordt hij onder deze naam aangeduid.
9. Een stam van *Phialophora heteroderae* (JACQ.) VAN BEYMA, werd van het C.B.S. ontvangen. (Fig. 4 en 8–11)
10. Van *Metarrhizium anisopliae* SOROKIN werd een drietal stammen van het C.B.S. verkregen.
11. Ook *Cylindrocarpon radiculicola* WOLLENW. werd uit de collectie van het C.B.S. betrokken. (Fig. 12)

3. METHODIEK

Om nu te bepalen of deze schimmelstammen werkelijk parasitair op het aardappelcystenaaltje waren, gingen we als volgt te werk. Een 50-tal uitgezochte cysten, die levende inhoud hadden, werden gedurende 1–2 minuten in alcohol 75% ontsmet en geplaatst in een 3 weken oude cultuur van de schimmel in buizen. Na 6–8 weken bewaard te zijn in een thermostaat bij 25°C werden de cysten eruit gehaald en op vitaliteit onderzocht. Aanvankelijk werden er lokproeven mee genomen, d.w.z. de cysten werden in aardappelwortelsecreet gelegd en het aantal uitkomende larven werd gedurende 6–8 weken geteld. Later bleek de fluorescentie-kleurmethode (VAN DER LAAN & BIJLOO, 1954) uitstekend te gebruiken. In de laatste tijd is ook deze methode verlaten en vervangen door de homogenisatormethode (BIJLOO, 1954). Uit de volgende cijfers blijkt de volkomen vergelijkbaarheid tussen beide methoden (Tabel 1).

TABEL 1. Vergelijkende bepalingen van de vitaliteit van de cyste-inhoud van *Heterodera rostochiensis*.

Comparative determination of the viability of the cyst contents of Heterodera rostochiensis.

Monster Sample	Methode Method	Percentage eieren Percentage of eggs			Percentage larven Percentage of larvae
		levend living	leeg empty	dood dead	
I	Homogenisator <i>Homogenizer</i>	25,3	47,5	24,6	2,6
I	Fluorescentie <i>Fluorescence</i>	25,5	48,0	25,0	1,5
II	Homogenisator <i>Homogenizer</i>	32,3	47,7	19,7	0,3
II	Fluorescentie <i>Fluorescence</i>	30,7	50,8	18,2	0,3

Tevens werd de inhoud van een aantal cysten microscopisch onderzocht en werden preparaten van aangetaste eieren gemaakt (Fig. 9-12).

Dit onderzoek bleek helaas niet altijd een indruk te geven van de parasitaire eigenschappen der schimmels, daar het optreden van schimmelziekten in hoge mate afhankelijk is van de omstandigheden. Zo werkt vochtigheid het optreden zeer in de hand. Tevens verzwakken vochtigheid en hoge temperatuur de vitaliteit der cysten. Een behandeling gedurende 6-8 weken bij 25°C in de agarbuizen is dus uitermate gunstig voor de schimmel. Ook zwakte-parasieten krijgen hier hun kans. Een en ander bleek uit het hoge percentage dode en verschimmelde cysten, dat steeds weer in de blanco-serie optrad. Het was daarom noodzakelijk deze proeven in grond uit te voeren. Daartoe werden potten gevuld met 500 cysten gemengd in zand- of kleigrond. Vervolgens werd de inhoud van erlenmeyers van 300 ml met schudcultures van de te onderzoeken schimmel door de grond gemengd. Er werd een grondbedekking aangebracht en de grond werd natgehouden.

Na 6 maanden werden de cysten door opspoelen met de Fenwick-kan uit de grond geïsoleerd en werd nagegaan of de schimmel binnengedrongen was. De cysten werden daartoe na oppervlakkige ontsmetting afzonderlijk op agarbuizen geënt. Tevens werden met de cysten lokproeven ingezet, terwijl ook met de kleurmethode een eventuele achteruitgang van de vitaliteit ten opzichte van de blanco's werd nagegaan.

4. AARD VAN HET PARASITISME DER SCHIMMELS

Onderzocht werd of de schimmels een stof afscheidde, die giftig is voor de aaltjes. Van *Phialophora heteroderae*, *Metarrhizium anisopliae* en *Cylindrocarpon radicola* werden cultures in vloeibare voedingsoplossing (volgens CZAPEK) ingezet. Nadat de schimmels goed gegroeid waren, werden de cultures door een bacteriekaars gefiltreerd. De filtraten werden door Ir. J. D. BULLO onderzocht op nematicide werking. Geen enkele giftige werking werd geconstateerd.

Vervolgens werd de inhoud van cysten, die kort tevoren geïnfecteerd waren met *Phialophora heteroderae*, microscopisch onderzocht. De meeste eieren vertoonden hyfen van de schimmel aan het oppervlak. Door een speciale kleuring¹⁾ gelukte het de loop der hyfen te vervolgen. Het bleek, dat zij in sommige gevallen door de eiwand heen geboord waren; de hyfen waren zichtbaar binnen de eischaal, in de met voedingsvloei-stof gevulde ruimte tussen de eiwand en de larve van het aaltje. Aantasting van het aaltje zelf werd niet geobserveerd (Fig. 9, 10 en 11).

In een later stadium werden vele eieren aangetroffen, die er verdroogd uitzagen. De larven in het ei waren nog aanwezig, maar verschrompeld. Blijkbaar voeden deze schimmels zich van de ei-inhoud, die de larve omgeeft, zonder het aaltje zelf aan te tasten, hetgeen echter toch de dood van de larve ten gevolge heeft. Dikwijls kon echter worden waargenomen, dat slechts een deel der eieren aldus was gedood, terwijl de rest wel hyfen aan het oppervlak vertoonde, doch duidelijk intact was gebleven. Soms werden in de cysten ook vruchtlichamen der schimmel aangetroffen, o.a. de pycniden van *Phoma tuberosa* en de peritheciën van *Anixiopsis stercoraria* (Fig. 3).

¹⁾ 2 ml van een 1/2% oplossing van waterblauw met 10 ml van een verzadigde picrinezuuroplossing; 24 uur koud kleuren; monteren in glycerine met glyceel.

5. RESULTATEN DER INFECTIEPROEVEN

1. Cultures van de schimmels werden ingezet op vloeibare voedingsbodem (volgens CZAPEK). Nadat de kolven goed gegroeid waren, werden per kolf 20–30 cysten toegevoegd. Na 41 dagen, steeds bij 21°C, werden de cysten eruit gehaald en werd er een lokproef mee ingezet, d.w.z. ze werden in schaalpjes met aardappelwortelsecreet gelegd en het aantal uitgekomen larven werd wekelijks geteld. Dit duurde 4 weken. De uitkomst is in Tabel 2 weergegeven.

TABEL 2. Infectieproeven met schimmels op cysten op vloeibare voedingsbodem.
Infections of cysts with fungi in liquid nutrient medium.

Serie	Aantal cysten Number of cysts	Aantal gelokte larven per cyste Number of hatched larvae per cyst	Serie	Aantal cysten Number of cysts	Aantal gelokte larven per cyste Number of hatched larvae per cyst
<i>Phialophora</i> I	22	23	<i>Cylindrocarpon</i> I	13	450
” II	22	8	<i>Monotospora</i> I	18	0,5
” III	30	10	<i>Arthrobotrys</i> I	12	110
<i>Metarrhizium</i> I	18	525	” II	17	125
” II	18	450	” III	17	120

Deze uitkomst is zeer merkwaardig: *Metarrhizium* en *Cylindrocarpon* hebben de cysten niet aangetast, want zeer veel larven zijn uitgekomen. *Arthrobotrys*, een schimmel, die de cyste niet binnendringt, zoals tevoren microscopisch was onderzocht, diende als controle. Doch het aantal aaltjes, dat gelokt werd, was hier veel lager.

Nu is hier een complicatie in het spel: De schimmels vormden een dik vlies op de vloeistof, waarop de cysten lagen. Slechts bij *Arthrobotrys* was dit niet het geval, zodat daar de cysten gedurende 41 dagen bij 21°C onder water lagen. De vitaliteit gaat als gevolg daarvan achteruit. Deze proef geeft een aanwijzing, dat *Phialophora* en *Monotospora* onder deze omstandigheden parasitair zijn, *Metarrhizium* en *Cylindrocarpon* niet.

Wegens de complicatie van de achteruitgang van de vitaliteit werd deze methode daarna verlaten.

2. De schimmels werden geënt op cultuurbuizen; na een maand werden de cysten er in gebracht. Weer 6–8 weken later werden de cysten er uitgehaald. De vitaliteit van de cyste-inhoud werd bepaald met de fluorescentie-methode (VAN DER LAAN & BIJLOO, 1955) (Tabel 3).

Deze cijfers geven wel enige aanwijzingen, maar van een bijzonder sterke parasitaire werkzaamheid is bij geen van deze schimmels sprake. Nergens werd meer dan 50 % van de inhoud gedood. Daar wij uiteindelijk toch geen goed beeld verkregen, omdat de omstandigheden in deze proeven niet vergelijkbaar zijn met die in de grond, werd ook deze methode verlaten.

TABEL 3. Infectieproeven met schimmels op cysten in cultuurbuizen.
Infections of cysts with fungi in agar tubes.

Naam schimmel <i>Name fungus</i>	Percentage dode eieren in de cysten <i>Percentage killed eggs in cysts, determined by fluorescent staining</i>						Gemiddelde <i>Mean</i>	Parasitaire werking <i>Parasitic activity</i>
	Herhalingen (<i>replications</i>)							
	1	2	3	4	5	6		
<i>Arthrobotrys oligospora</i> (standaard) ¹⁾ (<i>standard</i>) ¹⁾	13	10	14	13	15	12	13	—
<i>Dactylella</i> sp. (standaard) ¹⁾ (<i>standard</i>) ¹⁾	8	14	14	15			13	—
<i>Dactylaria</i> sp. (standaard) ¹⁾ (<i>standard</i>) ¹⁾	15	15	9				13	—
<i>Margarinomyces</i> <i>heteromorpha</i>	16	9	7				11	—
<i>Scrophulariopsis</i> sp.	33	18	20	15	16		20	+?
<i>Anixiopsis stercoraria</i>	19	20	18	18			19	+?
<i>Colletotrichum atramentarium</i>	15	15					15	—
<i>Monotospora daleae</i>	10	12	27	20			?	?
<i>Phoma tuberosa</i>	10	13	17	14			13	—
<i>Pseudeurotium ovalis</i>	47	53	40	36	56	65	50	++
<i>Penicillium vermiculatum</i>	46	27	24	26	26		30	+
<i>Phialophora heteroderæ</i>	23	18	34	31			26	+
<i>Metarrhizium anisopliae</i>	17	17	22	20	40	36	?	?
<i>Cylindrocarpon radicola</i>	43	43	16	13	26	25	?	?

¹⁾ Deze schimmel dringt de cysten niet binnen. *This fungus does not penetrate the cysts*

3. Schimmels werden gebracht in een aantal potten, die met cysten besmette zandgrond bevatten. De inhoud van telkens drie cultuurbuizen werd daartoe met water gemengd in de Waring Blendor fijn gemalen en in een pot met 2600 gram grond gebracht. Daarna bleven de potten staan in een ongestookte kas van september-februari (5 maanden). Gedurende deze tijd werden ze regelmatig begoten. De cysten werden toen door opspoelen uit een deel der pot-inhoud geïsoleerd, gedurende 1–2 minuten oppervlakkig ontmets in 75 % alcohol en op cultuurbuizen met kersagar geënt, telkens één per buis. De rest van de pot-inhoud werd bezaaid met een grondbedekker en bleef tot september staan (12 maanden). Als de infectie in de grond geslaagd is, moeten de parasitaire schimmels uit de cysten te voorschijn komen (Tabel 4).

TABEL 4. Potproeven, waarin parasitaire schimmels aan grond met cysten werden toegevoegd. Uit elke pot werden 20 cysten op buizen met kersagar geënt.

Pot experiments in which parasitic fungi were added to soil mixed with cysts. Twenty cysts from each pot were incubated on tubes with cherry agar.

Naam van de schimmel <i>Name of fungus</i>	Aantal geslaagde herisolaties <i>Number of successful re-isolations</i>	
	na 5 maanden <i>after 5 months</i>	na 12 maanden <i>after 12 months</i>
<i>Arthrotrrys oligospora</i> (standaard, <i>standard</i>)	0	0
<i>Margarinomyces heteromorpha</i>	2	5
<i>Scrophulariopsis</i> sp.	1	1
<i>Anixiopsis stercoraria</i>	4	4

Een herhaling op grotere schaal van deze proef had plaats in de zomer van 1954. Bovendien werden toen twee series potten genomen, nl. één met zandgrond en één met kleigrond. Telkens werd de inhoud van 4 buizen met een der schimmels door de inhoud van de pot à 1 kg gemengd. De proef duurde van 26 mei–26 november, dus 6 maanden. Daarna werden de cysten door opspoelen uit de potten geïsoleerd. Van een deel dezer cysten werd de vitaliteit bepaald met de fluorescentie-methodiek (Tabel 5).

TABEL 5. Soortgelijke proef als in Tabel 4 weergegeven. Vitaliteitsbepalingen van de cyste-inhoud met de fluorescentiemethode.

Similar experiment as represented in Table 4. Determination of viability of cyst contents with the fluorescence method.

Herhalingen Replications → Naam schimmel Name of fungus	Zandgrond Sandy soil Percentage dode eieren Percentage killed eggs			Kleigrond Clay soil Percentage dode eieren Percentage killed eggs		
	I	II	Parasitaire werking Parasitic activity	I	II	Parasitaire werking Parasitic activity
<i>Arthrobotrys oligospora</i> (standaard, standard)	15	10	—	20	15	—
<i>Margarinomyces heteromorpha</i>	16	7	—	27	34	+
<i>Scrophulariopsis</i> sp.	13	7	—	17	13	—
<i>Anixiopsis stercoraria</i>	30	36	++	23	30	+
<i>Colletotrichum atramentarium</i>	21	26	+	14	17	—
<i>Monotospora daleae</i>	18	20	?	19	15	—
<i>Phoma tuberosa</i>	18	13	—			
<i>Pseudeurotium ovalis</i>	16	20	?	16	12	—
<i>Phialophora heteroderae</i>	49	51	++	24	26	+
Mengsels van bovengenoemde schimmels <i>Mixture of above fungi</i>	24	23	+	24	24	?

Voorts werd een ander deel van de cysten uit dezelfde proef op buizen kersagar geënt, na op de gebruikelijke wijze oppervlakkig ontsmet te zijn. In Tabel 6 wordt het aantal herisolaties der schimmels vermeld. Steeds werden per pot 20 cysten afzonderlijk op buizen geënt.

TABEL 6. Dezelfde proefserie als weergegeven in Tabel 5.

Same series of experiments as represented in Table 5.

Naam van de schimmel Name of fungus	Aantal geslaagde herisolaties uit 20 cysten Number of successful re-isolations from 20 cysts	
	zand sandy soil	klei clay soil
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	0	0
<i>Margarinomyces heteromorpha</i>	0	0
<i>Scrophulariopsis</i> sp.	0	2
<i>Anixiopsis stercoraria</i>	7	5
<i>Colletotrichum atramentarium</i>	0	0
<i>Monotospora daleae</i>	1	0
<i>Pseudeurotium ovalis</i>	0	0
<i>Phialophora heteroderae</i>	0	0

In het voorjaar van 1955, dus een jaar na het begin van de laatst vermelde proef, werd een viertal potten nog eens onderzocht. Uit elke pot werden 2×100 cysten geïsoleerd en hieruit werden gedurende 6 weken de larven in aardappelwortelsecreet gelokt (Tabel 7).

TABEL 7. Dezelfde proefserie als weergegeven in Tabellen 5 en 6. Totaal aantal uitgelokte larven per cyste.

Same series of experiments as represented in Tables 5 and 6. Total number of hatched larvae per cyst.

	I	II
<i>Anixiopsis</i> – zandgrond <i>sandy soil</i>	122	145
<i>Colletotrichum</i> – zandgrond <i>sandy soil</i>	166	170
<i>Anixiopsis</i> – kleigrond <i>clay soil</i>	99	86
<i>Colletotrichum</i> – kleigrond <i>clay soil</i>	89	95

De behandeling met *Anixiopsis* schijnt in deze potproef in zandgrond vermindering van de levende inhoud van de cyste te geven, in kleigrond niet. Voorts wordt hier weer eens bevestigd, dat de cysten, die in kleigrond zitten, een minder groot aantal larven per cyste bevatten, dan die, welke onder gelijke omstandigheden in zandgrond verkeren.

In een potproef, in 1955 genomen, werd de grond van de helft van de potten besmet met een mengsel van 7 verschillende schimmels. Dit waren: *Anixiopsis stercoraria*, *Scrophulariopsis* sp. *Margarinomyces heteromorpha*, *Monotospora daleae*, *Phoma tuberosa*, *Pseudeurotium ovalis* en *Phialophora heteroderae*. Er waren drie series potten, nl. met stalmest (S)-, compost (C)- en kunstmest (K)-bemesting en elke serie bevatte voor de helft parasitaire schimmels (het reeds bovengenoemde zevental). De series bestonden elk uit 12 potten met schimmels (S +, C + en K +) en 12 potten zonder schimmels S –, C –, K –). Elke pot bevatte 2000 gram zandgrond die 253 cysten per 100 gram bevatte. Per pot werd 250 ml „schimmelbrij” toegediend, een mengsel van schimmels, voedingsbodems (rijst-, kers-, mout-, en havermoutagar) en water. De potten zonder schimmels kregen slechts hetzelfde volume water toegediend. Per pot werd een aardappel geplant.

Toen de planten 26 dagen oud waren, werden van elke serie 2×7 planten geoogst, d.w.z. het volledige wortelstelsel werd per pot gewonnen, ontdaan van knolletjes en stolonen, oppervlakkig gedroogd, gewogen, in kleine stukjes geknipt en in de Waring Blendor gemalen. De suspensie van worteldeeltes, waaruit de in de wortels aanwezige aaltjeslarven vrij gekomen waren, werd dan verdund tot een bepaald volume en in monsters daarvan werden de aaltjes geteld, onderscheiden naar de stadia hunner ontwikkeling (VAN DER LAAN, 1956).

De uitkomsten van deze tellingen zijn in Tabel 8 vermeld, waar de gemiddelden van telkens 7 planten zijn aangegeven. Op de verschillen, door de bemestingen veroorzaakt, wordt hier niet ingegaan. Wel blijkt hieruit zeer duidelijk, dat bij twee der drie bemestingen een groot verschil in aantallen binnengedrongen aaltjes, zowel omgerekend per gram wortel als in totaal, optreedt. Bij de S + en K + series zijn slechts half zoveel nematoden binnengedrongen als in de respectievelijke – series. Statistisch bleken deze verschillen betrouwbaar. Bij het verschil tussen S + en S – was $P = 0,01$, bij dat tussen K + en K – was $P = 0,04$.

TABEL 8. Bepaling van aantallen Heterodera-larven per gram wortel van aardappelplanten, geteeld in potten grond, besmet met cysten. S = stal mest, C = compost, K = kunstmest; + = met schimmels, — = zonder schimmels.

Determination of Heterodera larvae per gram of root from potato plants grown in soil infested with cysts. S = farmyard manuring, C = compost, K = artificial fertilizer, + = with predacious fungi, — = without predacious fungi.

Serie no. No.	Wortelgewicht in g Weight of roots in g	Heterodera-larven per g wortel <i>H. larvae per g of root</i>			tot. aantal larven per plant <i>total number of larvae per plant</i>
		stad. 1 <i>stage 1</i>	stad. 2 <i>stage 2</i>	tot. alle stad. <i>total all stages</i>	
S +	21,31	125	157	283	6030
S —	30,73	130	225	355	10909
C +	23,53	213	313	527	12400
C —	20,76	220	285	505	10483
K +	23,13	92	40	132	3053
K —	24,91	202	82	284	7074

Een aantal potten bleef staan, totdat de aardappelplanten afgestorven waren. Daarna werden uit 3 potten van elke serie twee monsters van 100 gram grond genomen en het aantal cysten erin bepaald. In Tabel 9 is de uitkomst, het gemiddelde van elke serie, vermeld.

TABEL 9. Aantal cysten per 100 g grond; dezelfde proef als in Tabel 8.

Number of cysts per 100 g of soil; same experiment as in Table 8.

	S +	S —	C +	C —	K +	K —
Voor de proef <i>Before the experiment</i>	253	253	253	253	253	253
Na de proef <i>After the experiment</i>	1306	1754	816	1533	1517	1899

Het aantal cysten in de + series, waaraan dus schimmels zijn toegevoegd, is in alle series geringer dan in de — series. Hoewel uit slechts 3 herhalingen geen statistische verschillen te berekenen zijn, geven deze cijfers wel een aanwijzing, dat in de potten, waar de schimmels aan toegevoegd zijn, de cystenaanwas minder sterk is geweest.

Aan de inhoud van deze cysten werd ten slotte nog met de homogenisator-methode, het percentage dode eieren aan telkens 200 cysten bepaald. De cijfers, wederom gemiddelden van 3 potten, zijn in Tabel 10 vermeld.

TABEL 10. Percentage dode eieren per 200 cysten; dezelfde proef als in Tabellen 8 en 9.

Percentage dead eggs pro 200 cysts; same experiment as in Tables 8 and 9.

S +	S —	C +	C —	K +	K —
34	21	27	18	28	26

Wederom is er een sterke aanwijzing voor een positieve werkzaamheid der toegevoegde schimmels in twee van de drie series.

6. BESPREKING DER RESULTATEN

a. Infectieproeven

Het is duidelijk, dat onder bepaalde omstandigheden sommige schimmels de

cysten binnendringen en een gedeelte van de inhoud doden. Merkwaardig is echter, dat de uitkomsten der verschillende proefreeksen elkaar niet dekken. Zo is bij de infecties in buizen *Pseudeurotium ovalis* bijzonder werkzaam, terwijl *Anixiopsis stercoraria* niet duidelijk pathogeen is geweest. In de infectieproeven in potten is het anders: daar is *Anixiopsis* verreweg het actiefst en *Pseudeurotium* heeft geen aantoonbare infecties teweeggebracht. Dit is wel verklaarbaar: schimmels zijn bijzonder gevoelig voor oecologische omstandigheden: vocht, temperatuur en in de grond zeker ook voor andere micro-organismen (bij de potproeven werd doelbewust niet met steriele grond gewerkt!). Antibiotische werkingen van micro-organismen onderling kunnen optreden, waardoor een bepaalde schimmel niet tot ontwikkeling komt.

Behalve beide genoemde schimmels, waarvan, zoals gemeld, *Anixiopsis* van Peruviaanse herkomst is, en *Pseudeurotium* van de Kanaaleilanden afkomstig is, is een aantal geslaagde infecties opgetreden met (in volgorde van belangrijkheid): *Phialophora heteroderae*, *Penicillium vermiculatum*, *Margarinomyces heteromorpha* en *Scrophulariopsis* spec. Van deze soorten was *Phialophora* reeds lang bekend door de onderzoeken van KORAB en ROZSYPAL; *P. vermiculatum* is een algemene grondschemmel, terwijl *Margarinomyces* en *Scrophulariopsis* uit Peru afkomstig zijn.

b. Invloed der schimmels op de activiteit der nematoden

Hierover zijn nog slechts aanwijzingen gevonden. In de proef in 1954 (blz. 310, Tabel 7) was de vitaliteit der cysten in kleigrond in de potten met schimmels lager dan in die zonder schimmels. In zandgrond was geen verschil zichtbaar. In de potproef in 1955, waar bemesting en schimmels gecombineerd werden, geven zowel de bepalingen van het aantal binnengedrongen larven in de wortels (Tabel 8), als de bepalingen der vermeerdering der cysten (Tabel 9) verschillen te zien, die erop wijzen, dat de schimmels actief zijn geweest. Ook de percentage dode eieren in de cysten geven dezelfde verschillen te zien.

Hoewel er dus talrijke aanwijzingen zijn, dat de schimmels de aaltjes inderdaad aantasten, is het moeilijk in dit stadium van onderzoek reeds uitsluitsel te geven over de praktische mogelijkheden van de toepassing dezer schimmels. Het is niet uitgesloten, dat in zwaar door *Heterodera* besmette akkers, geïnfecteerd met deze schimmels, de cysten eerder zullen afsterven. Evenwel zullen slechts proeven, die een aantal jaren de vitaliteit der cysten in de grond vervolgen, hierover uitsluitsel kunnen geven. Zelfs dan is het nog moeilijk, zekerheid te verkrijgen, dat inderdaad de schimmels de vervroegde afsterving hebben veroorzaakt. Hoe houdt men controle-vakken vrij van de schimmels?

Dat de schimmels niet de gehele cyste-inhoud doden, behoeft geen bezwaar te zijn. Het zou van grote betekenis zijn, indien zij de afstervingsperiode, thans voor de cysten van *H. rostochiensis* op 15-20 jaar gesteld, zouden bekorten.

7. SUMMARY

Nematodes have many natural enemies (DOLLFUS, 1946), but few are able to destroy them wholesale. A review of literature gives little hope of successful biological control. Populations of *Meloidogyne* may be reduced by adding nematode trapping fungi (e.g. *Arthrobotrys*) to the soil but, so far, success has been obtained only in pots (DESCHIENS, 1943; LINDFORD, 1938; GORLENKO, 1956).

Cysts are not attacked by these fungi. Enchytrid worms or nematode trapping amoebae (*Theratomyxa*) do not seem very promising. The amoeba occurs rarely in soil and has a slow rate of reproduction. Carnivorous nematodes also increase too slowly.

The author's investigations were directed towards a group of parasitic fungi which hitherto have been neglected. These fungi attack the eggs within the cysts, killing the larvae within. Some of the fungi are already known, the most important being *Phialophora heteroderae*. Certain other fungi were found repeatedly in or on cysts, including *Phoma tuberosa* and *Colletotrichum atramentarium* both of which have also been found on potatoes. *Monotospora daleae* was also found many times. Cysts from Jersey (Channel Islands) contained *Penicillium vermiculatum* and *Pseudeurotium ovalis*, the later being newly described by STOLK (1955) from an isolation prepared by the author.

The finding of *Heterodera rostochiensis* in Peru in 1952 threw new light on the problem. South America is presumed to be the place of origin of this nematode and it would be logical to search for natural enemies there. Cysts of potato root eelworm from Peru contained various fungi, the most important being *Anixiopsis stercoraria*, *Margarinomyces heteromorpha* and *Scrophulariopsis* sp. (Fig. 1-8).

Cysts are easily invaded by fungi via the relatively large openings found at the head and vulva. Parasitized cysts were sectioned and the contents were surveyed. Hyphae of fungi were found on the surface of most eggs (Fig. 9-11), staining revealed that hyphae sometimes penetrated through the egg shell but not through the larval cuticle. Hyphae were visible between egg shell and larva. It was concluded that this space was sucked dry by the fungus. Later stages of infection showed eggs dried out with dead, shrivelled larvae inside, other eggs bore many hyphae on the surface but the contents were unharmed.

Filtrates of cultures of several fungi were tested for nematicidal activity but none was found.

The rate of infection of cysts by fungi was difficult to assess as fungal attack is always very dependent on external conditions. The author placed cysts, previously surface sterilised by dipping for 1-2 minutes in 75% ethyl alcohol, in cultures of fungi in liquid nutrient media (Table 2). He also tried introducing cysts into cultures in agar tubes (Table 3). Other experiments were done with fungi in pots of nematode infested soil (Tables 4-6). Fungi capable of parasitising cysts in agar tubes did not always do so in pots and vice versa. As conditions were so different this result was not surprising.

Data were obtained upon the effect of adding fungi to soil containing cysts. Cysts floated from the soil 6 months later showed lower vitality in hatching tests (Tables 7-10). In a pot experiment in which potatoes were grown, the density of larvae within the roots was lower in pots to which fungi were added. In the same experiment a greater increase in the number of cysts occurred in the control pots without fungus and the number of dead eggs per cyst was lower. It is concluded that fungi attack cyst contents and lower their vitality, but from the author's observations, it cannot be stated whether the application of fungi to infested soil would shorten the period of larval infectivity. Further experiments are necessary over a longer period.

LITERATUUR

- BAUNACKE, W. – 1923. Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung des Rüben-nematoden *Heterodera schachtii*. Arb. Biol. Reichsanst. 11: 185–288.
- BEYMA THOE KINGMA, F. H. VAN – 1937. Beschreibung einiger neuen Pilzarten IV. Z.bl. Bakt. II, 96: 427–430.
- BIJLOO, J. D. – 1954. A new method for estimating the cyst contents of the potato root eelworm *Heterodera rostochiensis* Wollenw. J. Helminth. 27: 123–126.
- CHITWOOD, B. G. & B. OTEIFA – 1952. Nematodes parasitic in plants. Ann. Rev. Microbiol. 6: 151–184.
- DESCHIENS, R., L. LAMY & E. VAUTRIN – 1943. Essais pratiques de prophylaxie de l'anguillulose des végétaux par l'emploi d'hyphomycètes prédateurs. C.R. Acad. Sci., Paris 216: 539–541.
- DOLLFUS, R. PH. – 1946. Parasites des helminthes. Paris, Paul Lechevalier Ed. 481 p.
- DRECHSLER, C. – Some hyphomycetes parasitic on free-living terricolous nematodes. Phytopath. 31: 773–802.
- DUDDINGTON, C. L. – 1954. Nematode-destroying fungi in agricultural soils. Nature 173: 500–501.
- FRIEDERICH, K. – 1920. Über die Pleophagie des Insektenpilzes *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. Z.bl. Bakt. II, 50: 335–356.
- GOFFART, H. – 1932. Untersuchungen am Hafernematoden *Heterodera schachtii* Schm. Arb. Biol. Reichsanst. 20: 1–28.
- GOFFART, H. – 1952. Vierzig Jahre Kartoffelnematoden-bekämpfung in Deutschland. Gesunde Pfl. 4: 261–264.
- GOODEY, T. – 1938. Observations on the destruction of the stem eelworm, *Anguillulina dipsaci*, by the fungus *Arthrobotrys oligospora* Fres. J. Helminth. 16: 159–164.
- GORLENKO, M. V. – 1956. Predatory fungi and their utilisation in nematode control. Nematologica 1: 147–150.
- HUTCHINSON, S. A. & W. F. MAI – 1954. A study of the efficiency of the catching organs of *Dactylaria eudermata* Drechsl. in relation to *Heterodera rostochiensis* in soil. Pl. Dis. Repr. 38: 185–186.
- JEGEN, G. – 1920. Zur Biologie und Anatomie einiger Enchytraeiden. Viertelj. Schr. Naturf. Ges. Zürich 65: 100–208.
- LAAN, P. A. VAN DER – 1953. Een schimmel als parasiet van de cyste-inhoud van het aardappelcystenaaltje (*Heterodera rostochiensis* Wollenw.). T.Pl.ziekten 59: 101–103.
- LAAN, P. A. VAN DER – 1954. Nader onderzoek over het aaltjesvangende amoeboïde organisme *Theratomyxa weberi* Zwillenberg. T.Pl.ziekten 60: 139–145.
- LAAN, P. A. VAN DER – 1956. The influence of organic manuring on the development of *Heterodera rostochiensis*. Nematologica 1: 112–125.
- LAAN, P. A. VAN DER & J. D. BIJLOO – 1955. Bepaling van de vitaliteit van de cyste-inhoud van het aardappelcystenaaltje (*Heterodera rostochiensis* Wollenw.) door fluorochromeren met acridine orange. T.Pl.ziekten 61: 69–75.
- LINFORD, M. B., F. YAP & J. M. OLIVEIRA – 1938. Reduction of soil populations of the root-knot nematode during decomposition of organic matter. Soil Sci. 45: 127–140.
- MARCINOWSKI, K. – 1909. Parasitisch und semiparasitisch an Pflanzen lebende Nematoden. Arb. K. Biol. Anst. Land. Forst. Wiss. 7: 1–192.
- RADEMACHER, B. & O. SCHMITT. – 1933. Die bisherigen Erfahrungen in der Bekämpfung des Rüben-nematoden. Arch. Pfl.bau 10: 237–296.
- ROZSPAL, J. – 1934. Pilze in cysten von *Heterodera schachtii* Schmidt aus mährischen Rüben-boden. Bull. Acad. Tchecosl. Agric. 10: 413–422.
- SCHAEFFENBERG, B. & H. TENDL. – 1951. Untersuchungen über das Verhalten der Enchytraeiden gegenüber der Zuckerrüben-nematoden *Heterodera schachtii* Schm. Z. angew. Entom. 32: 476–488.
- SCHOEVERS, T. A. C. – 1916. Iets over bestrijding van schadelijke insecten door zwammen en bacteriën. T.Pl.ziekten 22: 131–202.
- STEINER, G. & H. HEINLI – 1922. The possibility of control of *Heterodera radicola* and other plant injurious nemas by means of predatory nemas, especially by *Mononchus papillatus* Bastian. J. Wash. Acad. Sci. 12: 367–386.
- STOLK, A. C. – 1955. The genera *Anixiopsis* Hansen and *Pseudeurotium* van Beyma. Anth. Leeuwenh. 21: 65–79.
- THORNE, G. – 1927. The life history, habits and economic importance of some Mononchs. J. agric. Res. 34: 265–286.

- THORNE, G. – 1928. Nematodes inhabiting the cysts of the sugarbeet nematode (*Heterodera schachtii* Schmidt). J. agric. Res. 37: 571–575.
- THORNE, G. – 1940. *Duboscqia penetrans* n. sp. (Sporozoa, Microsporidia, Nosematidae), a parasite of the nematode *Pratylenchus pratensis* (De Man) Filipjev. Proc. Helminth. Soc. Wash. 7: 51–53.
- WEBER, A. PH., L. O. ZWILLENBERG & P. A. VAN DER LAAN. – 1952. A predacious amoeboid organism destroying larvae of the potato root eelworm and other nematodes. Nature 169: 834.
- WILLE, J. E. & C. BAZAN DE SEGURA. – 1952. La Anguilata dorada, *Heterodera rostochiensis*, una plaga del cultivo de las papas, recién descubierta en el Perú. Min. Agric. Biol. (Lima) 48: 1–17.
- ZWILLENBERG, L. O. – 1953. *Theratomyxa weberi*, a new proteomyxaceous organism from soil. Anth. Leeuwenh. 19: 101–116.