



Onderzoeken over erwtenanthracnose

<https://hdl.handle.net/1874/311388>

W. J. J. J. J.

ONDERZOEKINGEN OVER ERWTENANTHRACNOSE

C. WEHLBURG

Diss.
Utrecht

1932

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

ONDERZOEKINGEN
OVER ERWTENANTHRACNOSE

ONDERZOEKINGEN OVER ERWTENANTHRACNOSE

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT,
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS
Dr. L. S. ORNSTEIN, HOOGLEERAAR IN DE
FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE,
VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER
UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUUR-
KUNDE TE VERDEDIGEN OP MAANDAG
6 JUNI 1932 DES NAMIDDAGS TE VIJF UUR

DOOR

CORNELIS WEHLBURG
GEBOREN TE BANDOENG

BAARN — N. V. HOLLANDIA-DRUKKERIJ — 1932

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN MIJN OUDERS
AAN MIJN AANSTAANDE VROUW

Aan het einde van mijn studietijd is het mij een behoefte allereerst een woord van dank te richten tot U mijn ouders, die mij in de gelegenheid hebt gesteld deze studie te voltooien.

Hooggeleerde *W e s t e r d i j k*, hooggeachte Promotor, ik ben U zeer erkentelijk voor de belangstelling en de welwillende critiek, die ik tijdens de bewerking van mijn proefschrift van U mocht ondervinden. De groote vrijheid, die gij mij steeds hebt gelaten, heb ik altijd bijzonder op prijs gesteld. De jaren, die ik onder Uw opgewekte leiding in het Baarnsche Laboratorium mocht doorbrengen, zijn voor mij van groote waarde geweest en behooren tot de aangenaamste uit mijn studietijd.

Hooggeleerde *W e n t*, ik acht het een groot voorrecht van U onderwijs te hebben mogen genieten. De wijze, waarop gij Uw studenten weet te leiden bij het bestudeeren van de plantenphysiologie, heeft mij bijzonder getroffen.

Hooggeleerde *P u l l e*, met genoegen denk ik terug aan Uw leerrijke colleges en aan de aangename excursies, welke ik onder Uw leiding mocht meemaken.

Hooggeleerde *J o r d a n*, Uw heldere colleges en boeiende practica zijn voor mij van groote beteekenis geweest.

Hooggeleerde *D e B u s s y*, aan Uw interessante colleges zal ik steeds een aangename herinnering bewaren.

Zeer geachte *V a n L u i j k*, voor de wijze waarop gij mij steeds hebt bijgestaan bij de bewerking van het mycologisch gedeelte van mijn werk, breng ik U mijn oprechte dank.

Ik ben het Bestuur van de stichting „Willie Commelin Scholten” zeer erkentelijk voor de gastvrijheid, welke zij mij op haar laboratorium heeft verleend.

Ten slotte rest mij nog een woord van dank te brengen aan het Utrechtsch Studentencorps en daarvan in het bijzonder aan de Utrechtsche Studenten Roei vereeniging „Triton”, waaraan ik voor een groot deel mijn onvergetelijke studententijd te danken heb.

INHOUD

	blz.
INLEIDING	1
Hoofdstuk I. MORPHOLOGIE.	
§ 1. Beschrijving van de ziekteverschijnselen en infectie	3
§ 2. Beschrijving van de schimmels in reincultuur . .	9
Hoofdstuk II. VOEDINGSPHYSIOLOGIE VAN DE SCHIMMELS IN REINCULTUUR.	
§ 1. Literatuuroverzicht	14
§ 2. Methodiek	17
§ 3. Invloed van de koolstofbron	20
§ 4. Invloed van de stikstofbron	23
§ 5. Invloed van de zuurgraad	30
§ 6. Invloed van enkele mineralen	36
a. Magnesium	36
b. Zwavel	36
c. Fosfor	37
d. Kalium en calcium	39
§ 7. Conclusies	40
Hoofdstuk III. INVLOED VAN DE BEMESTING OP DE INFECTIE.	
§ 1. Literatuuroverzicht	43
§ 2. Methodiek	46
§ 3. Invloed van de stikstofbemesting	51
§ 4. Invloed van de kalibemesting	53
§ 5. Invloed van de fosforbemesting	55
§ 6. Invloed van de calciumbemesting	57
§ 7. Conclusies	59
Hoofdstuk IV. SAMENVATTING	
LITERATUURLIJST	62

INLEIDING

De volgende onderzoeken zijn gedaan met het doel om de veroorzakers van de ziekte, die hier te lande bekend staat als de anthracnose van de erwt, nader te onderzoeken zoowel wat betreft de physiologie van de fungi als wel hun gedrag als parasiet en verder om het verband tusschen de voeding van de voedsterplant en de parasitaire aantasting na te gaan.

Als veroorzaker van de vlekziekte van de erwt wordt gewoonlijk uitsluitend *Ascochyta pisi* Lib. beschouwd. In Amerika echter verdeelt men deze erwtenziekte in drie groepen. Men onderscheidt n.l. *Ascochyta leaf and pod spot* (*A. pisi*), *Mycosphaerella blight* (*M. pinodes* (Berk. & Blox.) Stone) en *Ascochyta footrot* (*A. pinodella* Jones). De afbeeldingen en beschrijvingen welke men in Europeesche handboeken vindt (Sorauer, Frank en v. Tubeuf) komen alle overeen met de symptomen die men in Amerika voor „*Ascochyta leaf and pod spot*” opgeeft. Kirchener en Boltshauser geven echter in hun atlas een afbeelding van de vlekziekte van de erwt waar op de peul, behalve de ronde *Ascochyta*-vlekken, duidelijk de langgerekte, donkergekleurde *Mycosphaerella*-aantastingen te herkennen zijn. Blijkbaar zagen zij deze laatste vlekken voor variaties van de *Ascochyta*-aantastingen aan.

In het algemeen zijn de beschrijvingen van deze ziekten in de Europeesche handboeken zeer onvolledig.

Het lag dus voor de hand om na te gaan of aan de vlekziekten van de erwt hier te lande ook deze drie typen te onderscheiden waren.

Verder was het van belang te onderzoeken in hoeverre de bemesting van de erwt van invloed kon zijn op de aantasting door deze parasieten. Daar proeven in deze richting reeds eerder door Schaffnit & Volk waren verricht, doch alleen met *Ascochyta*

pisi als parasiet, bestond er aanleiding deze proeven niet alleen te herhalen, maar ook uit te breiden door ook de andere parasieten te gebruiken.

Over de physiologie van *Ascochyta pisi* in reïncultuur is slechts weinig bekend. Het eenige onderzoek op dit gebied is dat van Ludwig; het leek mij wenschelijk deze proeven te herhalen en zooveel mogelijk uit te breiden, vooral wat betreft de invloed van de zuurgraad op de groei van de schimmel, waarover Ludwig geen gegevens verstrekt.

HOOFDSTUK I

MORPHOLOGIE

§ 1. Beschrijving van de ziekteverschijnselen en de infectie.

In vochtige zomers kan men in iedere erwtenaanplant op de bladeren, stengels en peulen van de planten kleine bruine of zwarte vlekjes en streepjes aantreffen. Vroeger meende men dat deze ziekte uitsluitend veroorzaakt werd door *Ascochyta pisi*. Linford & Sprague (34) zagen echter in Amerika dat deze vlekken sterk verschilden in vorm en kleur: sommige waren bruin en rond en vertoonden in het midden een lichtgekleurde, doorschijnende plek, waarop de pycniden duidelijk te zien waren („light type”), andere daarentegen waren onregelmatig van vorm, meestal kleiner dan het lichte type en waren donkerbruin tot zwart gekleurd terwijl de pycniden meer naar de rand van de vlek te vinden waren („dark type”). Door isolaties uit deze aangetaste deelen verkregen zij twee verschillende fungi n.l. *Ascochyta pisi*, die het lichtgekleurde type, en *Mycosphaerella pinodes* die het donkere type veroorzaakt. Verder vonden zij nog een derde parasiet die voornamelijk het hypocotyl en de wortels van de erwt aantast. De aantastingen van deze laatste parasiet op de bovenaardsche deelen deden sterk aan die van *Mycosphaerella pinodes* denken. De pycnosporen waren echter veel kleiner dan die van *M. pinodes*, zoodat dit type als de micro-vorm van *M. pinodes* werd aangeduid. L. K. Jones (25) bouwde voort op de bovengenoemde waarnemingen

en stelde de volgende termen voor: 1. *Ascochyta leaf and pod spot*, veroorzaakt door *A. pisi* Lib. en overeenkomend met het lichte type van Linford & Sprague. 2. *Mycosphaerella blight*, veroorzaakt door *M. pinodes* (Berk. & Blox.) Stone en overeenkomend met het donkere type. 3. *Ascochyta footrot*, veroorzaakt door de micro-vorm van Linford & Sprague, en die Jones beschrijft als *Ascochyta pinodella* n.sp.

In 1930 verscheen een onderzoek van Rathschlag (44) waaruit blijkt dat deze drie typen ook in Europa voorkomen.

handelszaad leverden meestal cultures van *Ascochyta pisi* op.

Het is natuurlijk niet uitgesloten dat in de streken waar het zaad

Het is mij dan ook gelukt om de drie bovengenoemde fungi uit inheemsch materiaal te isoleeren. Isolaties uit verschillende monsters vandaan kwam *Ascochyta pisi* meer voorkwam dan *Mycosphaerella pinodes* en *Ascochyta pinodella*. Uit een partij erwten die in Baarn verbouwd was isoleerde ik grootendeels *Mycosphaerella pinodes* terwijl ook hierbij *Ascochyta pinodella* slechts zeer zelden aanwezig was. De ziekte door deze drie fungi veroorzaakt kan, wanneer de weersomstandigheden gunstig voor de groei van de voedsterplant zijn, tot enkele vlekken beperkt blijven zoodat de schade aan het gewas gering is. Treedt er echter een langdurige regenperiode in met lage temperatuur, zoodat de planten slecht groeien en de parasiet integendeel zeer goed, dan kan de ziekte zich snel uitbreiden en in sommige gevallen groote schade aanrichten.

Men neemt aan dat de pycnosporen door regendruppels, die op de bladeren spatten, verspreid worden en zodoende gezonde planten in de nabijheid infecteeren. Bij materiaal, dat in de kas gekweekt werd, heb ik nimmer een verspreiding van de ziekte op andere planten, welke naast geïnfecteerde planten stonden, waargenomen. Bij planten die in de open lucht stonden was een afstand van $1\frac{1}{2}$ meter tusschen geïnfecteerde en gezonde planten voldoende om een infectie van de laatste te verhinderen. Bij een erwtenaanplant, waarbij de planten 50 c.M. uit elkaar stonden, kon ik, eenige dagen nadat er een zware regenbui gevallen was, waarnemen dat de ziekte zich van de geïnfecteerde planten op de in de nabijheid staande gezonde exemplaren verspreidde.

L.K. Jones meent dat een overbrenging van de pynosporen door insecten mogelijk is, terwijl hij ook een verspreiding van de

ziekte door middel van de ascosporen, die met kracht uit de asci zouden worden geslingerd, mogelijk acht.

De pycnosporen, welke in een druppel water op een blad terecht komen ontkiemen spoedig en vormen een kiembuis die door de cuticula dringt. Dit kan men gemakkelijk op de volgende wijze zien: ik bracht op erwtenbladeren druppels sporensuspensie en zette deze bladeren vervolgens in een goed sluitende glazen doos 2×24 uur in een thermostaat bij $\pm 23^{\circ}$ C. Hierna werden de preparaten in alcohol gefixeerd, waardoor tevens de groene kleurstof uit de bladeren getrokken werd. Werden nu de hyphen nog met katoenblauw gekleurd dan was het indringen van de hyphen in het bladweefsel duidelijk te zien.



Figuur 1.

Kiemende conidiën van *A. pisi*. op een blad van *Pisum sativum*.
Het ongekleurde uiteinde van de kiembuis is reeds door de cuticula heengedrongen.

Vergrooting $550 \times$

De kiembuis behoeft dus niet door een huidmondje naar binnen te komen, doch is in staat de cuticula te doorboren.

L u d w i g (36) maakte doorsneden van bladeren waarop *Ascochyta*-conidiën ontkiemd waren en zag nimmer dat de hyphen door een huidmondje het bladweefsel binnendrongen. Hij geeft aan dat de hyphen eerst tusschen cuticula en epidermis loopen totdat zij op een celwand stooten. Dan volgen zij deze dieper in het bladweefsel, doordat zij de middenlamel oplossen en daardoor de cellen isoleeren en vernielen.

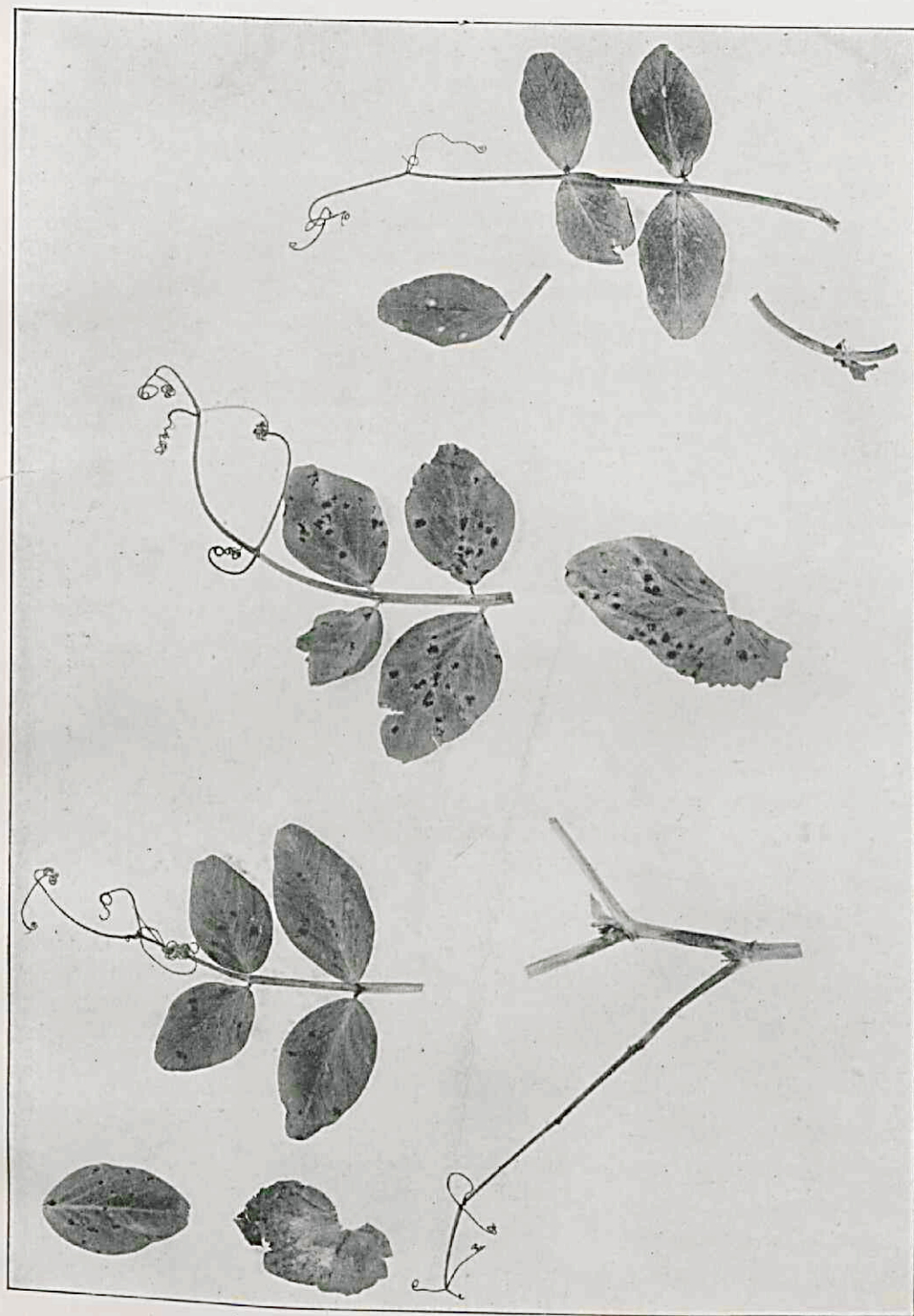
Wanneer de weersomstandigheden gunstig zijn voor de uitbreiding van de ziekte, dus tijdens langdurige regenperioden, kunnen kleine afzonderlijke vlekjes uitgroeien tot grootere complexen, zoodat geheele bladeren afsterven. Toch is de schade die aan het gewas veroorzaakt wordt meestal gering. Wanneer echter de peul aangetast wordt, kan de parasiet door de vruchtwand naar binnen dringen en het zaad infecteeren. Wordt zulk besmet zaad uitgelegd, dan heeft er bij het kiemen een sterke infectie van het kiemplantje plaats. Dergelijke plantjes sterven gewoonlijk spoedig af.

K r ü g e r (31) beschrijft twee gevallen waarin een erwtenaanplant geheel mislukte door een aantasting van *Ascochyta pisi* tengevolge van het gebruik van geïnfecteerd zaad. De planten stierven reeds lang voor de bloeitijd af doordat de wortels sterk aangetast waren. Het geheele verschijnsel deed volgens K r ü g e r sterk aan wortelbrand denken.

Juist dit laatste en de vermelding dat de wortels sterk waren aangetast doen de vraag rijzen of K r ü g e r misschien met *Myco-sphaerella* te doen heeft gehad. *Ascochyta pisi* tast n.l. nimmer de wortels van de voedsterplant aan.

Het verdient dus aanbeveling om het zaadgoed terdege te selecteeren en geïnfecteerde erwten te verwijderen. Het desinfecteeren van het zaad heeft weinig nut, aangezien de fungus gewoonlijk te diep in de cotylen gedrongen is om bij een korte behandeling gedood te worden, terwijl een langdurige behandeling met het een of andere desinfectans de kiemkracht van de erwt ernstig kan schaden.

L. K. J o n e s vermeldt dat een behandeling van het zaad met droge beits min of meer de aantasting van het hypocotyl, door *M. pinodes* en *A. pinodella*, het zoogenaamd „footrot”, kon tegengaan. De desinfectie had echter geen invloed op de aantasting van de bovengrondsche deelen door *A. pisi*.



Ziektebeeld op *Pisum sativum*.

Van links naar rechts: *Mycosphaerella pinodes*, *Ascochyta pinodella*, *Ascochyta pisi*.

Een mislukking van het gewas kan ook plaats hebben wanneer men het stroo eener aangetaste erwtenaanplant op het land zou laten liggen en daar het volgend jaar wederom erwten zou verbouwen. Uit de waarnemingen van Stone (54), L. K. Jones (25) en Linford & Sprague (34) is namelijk gebleken dat de peritheciën van *M. pinodes*, welke in het najaar ontstaan, evenals de pycniden van *A. pisi* en *A. pinodella*, op de erwtenstengels kunnen blijven leven.

Van *A. pisi* en *A. pinodella* is de hoogere vruchtvorm niet bekend. Dit leidde tot de veronderstelling van Stone (54 en 55), Vaughan (57) en F. R. Jones & Linford (23) dat *Mycosphaerella pinodes* het ascus-stadium van *Ascochyta pisi* zou zijn.

L. K. Jones (26) toonde aan dat deze veronderstelling onjuist moet worden geacht en dat *M. pinodes* en *A. pisi* twee verschillende soorten zijn, aangezien zij wat de habitus betreft, zoowel in reincultuur als in ziektebeeld, sterk verschillen. Uit ascosporen van *M. pinodes* groeiden bij hem steeds gewone *Mycosphaerella* cultures.

Mijn waarnemingen bevestigen de opvatting van Jones. Er bestaat een duidelijk verschil tusschen de reincultures van de twee bovengenoemde schimmels, terwijl ook het infectiebeeld van *A. pisi* geheel anders is dan dat van *M. pinodes*.

Ascochyta pisi Lib. vormt op de bladeren van *Pisum sativum* lichtbruine, regelmatige, ronde of ovale vlekken ter grootte van 2—8 m.m. in diameter, door een duidelijke donkerbruine rand van het gezonde bladweefsel afgescheiden. In het midden van de vlek is de kleur geelbruin tot witachtig; het doode bladweefsel is op die plaats eenigszins doorschijnend. Op de stengels en bladstelen is de vorm van de bladvlekken langgerekt, op de peulen rond. De vlekken zijn op deze deelen duidelijk ingezonken en voorzien van een verhoogde, donkerbruine rand. De pycniden treft men in groote getale in het midden van de vlek aan. Aantastingen van het hypocotyl en de wortels komen niet voor.

Mycosphaerella pinodes (Berk. & Blox.) Stone daarentegen vormt op de bladeren onregelmatig gevormde, donkerbruine tot zwarte vlekjes, welke meestal veel kleiner zijn dan de vlekken veroorzaakt door *Ascochyta pisi*. Op de peulen en stengels veroorzaakt *M. pinodes* kleine, donkere streepjes, welke tot groote, onregel-

matig gevormde, donkerpaars tot zwarte vlekken kunnen uitgroeien. Op de stengels kunnen deze vlekken soms een groote oppervlakte innemen zoodat geheele internodiën een donkerpaarse tot zwarte tint krijgen, terwijl, in afwijking van *A. pisi*, de pycniden niet talrijk zijn en meestal in de nabijheid van de rand verspreid liggen.

M. pinodes tast de voedsterplant in veel sterkere mate aan dan *A. pisi*; in de zomer van 1931 kreeg ik materiaal van een door *M. pinodes* aangetaste erwtenaanplant uit de Kreekerakpolder. De planten waren bedekt met vlekken, zoodat stengels, bladeren en peulen geheel zwart gekleurd waren. Een dergelijke zware aantasting door *A. pisi* is mij niet bekend. Ook Jones vermeldt dat in Amerika *M. pinodes* een belangrijker parasiet is dan *A. pisi*.

M. pinodes tast ook het hypocotyl aan (foot rot); de aantasting gaat hier vaak zoo diep, dat de stengel op die plaats doorbreekt, waardoor het jonge plantje te gronde gaat.

Ascochyta pinodella Jones. De vlekken die door de aantasting van deze schimmel veroorzaakt worden lijken zeer veel op die van *M. pinodes*. Het verschil is dat de vlekken door *A. pinodella* veroorzaakt grooter zijn, een tamelijk regelmatig ronde vorm hebben en meestal uit eenige concentrische zones van verschillende kleur bestaan.

A. pinodella tast nog sterker dan *M. pinodes* het hypocotyl en de wortels van de voedsterplant aan.

Bij jonge plantjes die uit van tevoren geïnfecteerd zaad gegroeid zijn is dit verschil in wortelaantasting duidelijk te zien (plaat II) zooals mij uit de volgende proef is gebleken. De erwten werden zorgvuldig geselecteerd en alle exemplaren welke een verkleurd vlekje vertoonden verwijderd. De overgebleven erwten werden nu 24 uur geweekt en vervolgens gedompeld in een sporensuspensie van de schimmel waarmede de infectie beoogd werd. Na eenige uren, wanneer verwacht mocht worden, dat de sporen op de bodem gezonken waren, werd het water zooveel mogelijk afgegoten, waarna de zoo behandelde erwten nog een nacht bleven staan zoodat de sporen goed op de zaadhuid gekleefd werden. De volgende dag werden deze erwten in gesteriliseerde tuinaarde uitgelegd. Op de kiemkracht der erwten had deze kunstmatige infectie niet de minste invloed; alle erwten kwamen in de verschillende potten regelmatig op.



Verschil in wortelaantasting door de drie fungi.

Van links naar rechts: *Ascochyta pinodella*, *Ascochyta pisi*, *Mycosphaerella pinodes*.

Korte tijd later kon men in de potten met erwten, welke met *A. pinodella* geïnfecteerd waren, exemplaren aantreffen die niet verder groeiden en langzamerhand verwelkten. Bij deze plantjes bleek het worteltje geheel te zijn aangetast. Van de 100 kiemplanten gingen er ten gevolge van wortelaantasting door *A. pinodella* 58 te gronde. *M. pinodes* tast in mindere mate de wortels aan, hoewel ook hier verschillende exemplaren in groei achter bleven doordat een gedeelte van de wortels aangetast was, terwijl 42% afstierf.

De erwten welke met *A. pisi* geïnfecteerd waren leverden alle planten op met gezonde wortels. Hier waren alleen bladeren en stengels aangetast.

Het gebruik van geïnfecteerd zaad kan dus zeer nadeelige gevolgen voor de erwtenaanplant met zich brengen.

§ 2. Beschrijving van de schimmels in reïncultuur.

Uit het Centraal Bureau voor schimmelcultures te Baarn werden de volgende cultures verkregen:

1. *Ascochyta pisi*, stam Coelingh, geïsoleerd in Baarn.
2. " " stam Jones, " in Amerika.
3. " " stam Mohendra, " in Br. Indië.
4. *Mycosphaerella pinodes*, stam Jones, geïsoleerd in Amerika.
5. " " stam Sibia, " in Italië.
6. *Ascochyta pinodella*, stam Jones, " in Amerika.

Door eigen isolaties werden nog de volgende cultures verkregen:

7. *Ascochyta pisi*.
8. *Ascochyta pinodella*.
9. *Mycosphaerella pinodes*.

Over het algemeen fructificeerden de versch geïsoleerde stammen beter dan de oudere cultures; vooral de No's 4 en 5 waren moeilijk tot het vormen van pycniden te brengen. De in de volgende hoofdstukken beschreven proeven werden daarom voornamelijk met eigen isolaties genomen, hoewel ter vergelijking een enkele maal een isolatie van Jones werd gebruikt.

De No's 1 en 7, die beide uit inheemsch materiaal geïsoleerd waren, bleken indientiek te zijn, evenals de No's 6 en 8. De No's 4 en 5 verschilden weinig wat hun groei in reïncultuur betreft; ook de afmetingen van de pycnosporen waren ten naastebij gelijk.

No. 3, die uit Britsch Indië afkomstig was, geïsoleerd van *Cicer*, verschildte wat het beeld op agarbodem betreft, zeer sterk van de andere *A. pisi* stammen. Verschillen in sporengrootte waren echter gering. Vermelding verdient nog het feit dat deze stam pycnosporen vormde waarvan het tusschenschot zonder meer niet te zien was, zoodat men vermoedde niet met *A. pisi* te doen te hebben. Wanneer de sporen echter met katoenblauw gekleurd werden bleek het tusschenschot bij alle sporen aanwezig te zijn. Infecties met deze stam uitgevoerd gelukten niet zoo gemakkelijk als met de andere *A. pisi* stammen; het infectiebeeld was echter geheel gelijk aan dat der overige stammen.

No. 2, een door Jones in Amerika geïsoleerde *A. pisi*-stam, kwam wat sporengrootte en infectiebeeld betreft geheel overeen met No. 7. In reïncultuur op agarbodem was er echter een verschil te zien en wel dit, dat stam Jones zeer vele, dicht bij elkaar liggende pycniden vormt waar geringe sporenmassa's uitvloeien; No. 7 daarentegen heeft veel grootere pycniden die verder uit elkaar liggen en groote hoeveelheden sporen uitstooten.

Uit fig. 2 en plaat III zijn de verschillen tusschen *A. pisi* (7), *M. pinodes* (8) en *A. pinodella* (9) te zien.

De volgende beschrijvingen hebben alle betrekking op eigen isolaties. Over het algemeen vormden deze jonge stammen, die bovendien geregeld werden overgeënt, weinig luchtmycelium. Bij oudere stammen ziet men gewoonlijk veel meer luchtmycelium, terwijl er minder pycniden gevormd worden.

De conidiën zitten in de pycniden niet op conidiëndragers maar direct op de cellen die de wand van de pycnide vormen. Weliswaar zijn sommige van deze cellen iets grooter en min of meer kegelvormig, maar duidelijke conidiëndragers worden niet gevormd.

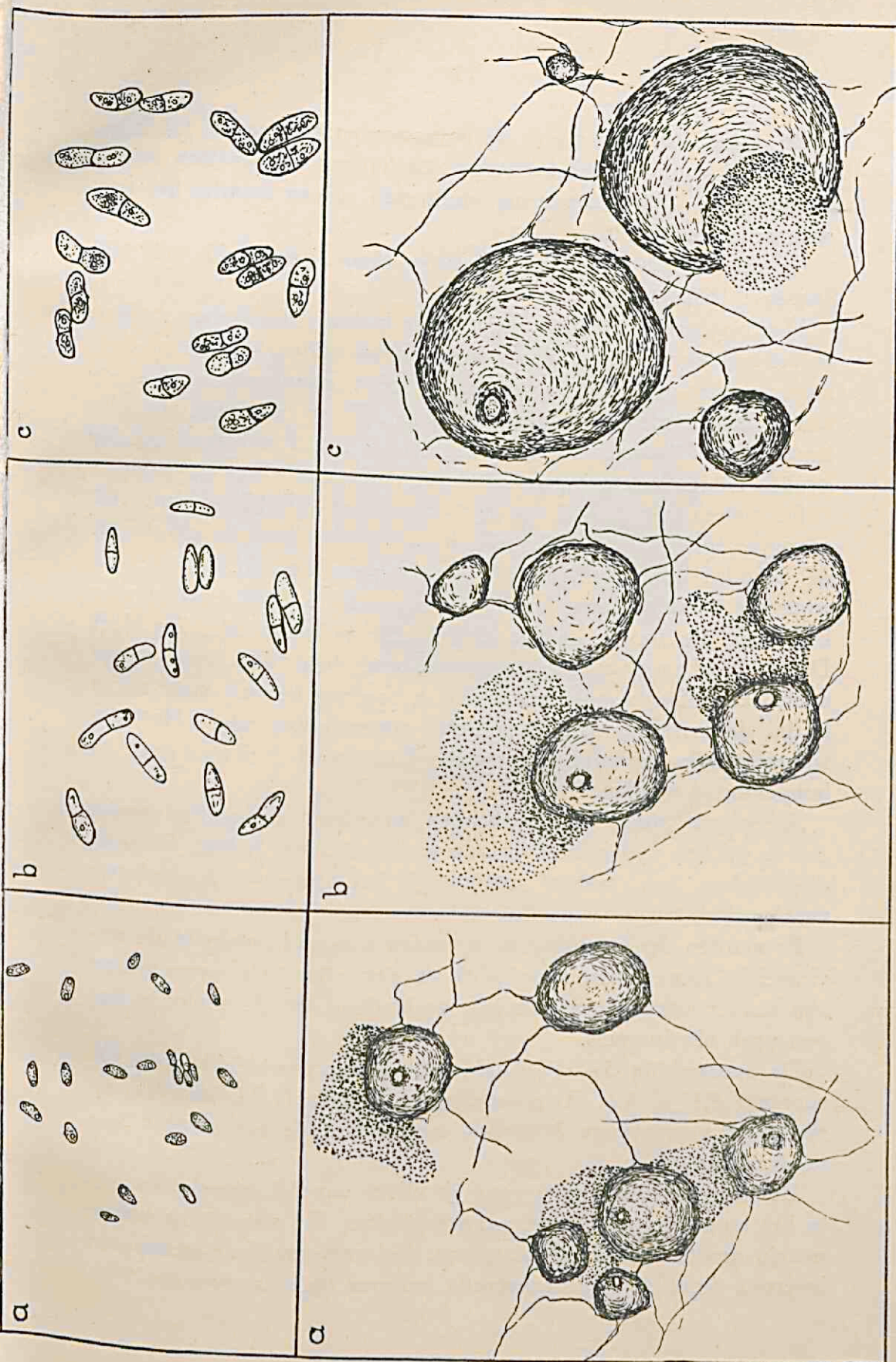
Ascochyta pisi vormt weinig luchtmycelium, dat aan den rand van de voedingsbodem wit en wollig is. De verdere oppervlakte wordt bedekt door lichtgekleurde pycniden, waar lichtoranje sporen-massa's uitvloeien, die soms de geheele voedingsbodem kunnen bedekken.

PLAAT III



Reincultures van de drie fungi op haverhoutagar.

Van l. n. r.: *Ascochyta pisi*, *Mycosphaerella pinodes*, *Ascochyta pinodella*.



Figuur 2.

Pycniden en pycnosporen van de drie fungi. De pycniden zijn 100 $\times$ vergroot, de pycnosporen 680 $\times$.
 a. *Ascochyta pinodella*. b. *Ascochyta pinodella*. c. *Mycosphaerella pinodes*.

Bij oudere cultures wordt de havermoutagar stroogeel tot licht-oranje gekleurd. De pycnosporen zijn hyalien en bevatten enkele oliedruppels. Bij uitzondering vindt men sporen waarbij het tusschenschot ontbreekt.

De sporen zijn $12-22 \times 4-5\frac{1}{2}\mu$ groot, gemiddeld (uit 100 sporen): $15,8 \times 4,9$.

Mycosphaerella pinodes vormt meer luchtmycelium dan *A. pisi*. In het midden wordt een zwart stroma gevormd waarop slechts weinige, donker-gekleurde pycniden worden aangetroffen, waaruit kleine, lichtoranje sporenmassa's vloeien. De pycnosporen zijn alle twee-cellig. Zij verschillen duidelijk van *A. pisi* doordat zij minder hyalien zijn en vele grootere en kleinere oliedruppeltjes bevatten.

De sporen zijn $12-23 \times 5\frac{1}{2}-8\mu$ groot, gemiddeld (uit 100 sporen): $16,1 \times 6,7$. Havermoutagar wordt door de groei van *M. pinodes* niet verkleurd. Op moutagar vormt *M. pinodes* na ongeveer 3 weken even onder de oppervlakte fijne, veervormige kristallen, die aan de onderkant duidelijk zichtbaar zijn. De Heer Dr. A. J. Haagen Smit was zoo vriendelijk deze voor mij te analyseeren. De juiste samenstelling is nog niet bekend, maar zeker is dat de kristallen van organische samenstelling zijn. Het zijn waarschijnlijk de kristallen welke Linford & Sprague in hun cultures vonden.

Ascochyta pinodella vormt bijna uitsluitend een zwart stroma dat de geheele oppervlakte van de voedingsbodem bedekt. De voedingsbodem van oudere cultures is lichtbruin tot donkerbruin verkleurd.

Er worden donkergekleurde pycniden gevormd, waarvan de uitvloeiende sporenmassa's duidelijk te zien zijn. De pycnosporen zijn zonder uitzondering eencellig en hyalien; aan de uiteinden liggen vaak oliedruppels.

De sporen zijn $5-11 \times 2\frac{1}{2}-5\mu$ groot, gemiddeld (uit 100 sporen): $8,1 \times 4,1$. *A. pinodella* vormt evenals *M. pinodes* op moutagar veervormige kristallen even onder de oppervlakte van de voedingsbodem.

De hoogere vruchtvorm vond ik alleen van *M. pinodes* en wel in het najaar op afgestorven erwtenplanten. De ascosporen waren weinig grooter dan de pycnosporen. Cultures van deze ascosporen leverden weer de *Mycosphaerella* cultures op met pycniden.

PLAAT IV



Door *Mycosphaerella pinodes* in de voedingsbodem gevormde kristallen.

In mijn reïncultures heb ik nooit peritheciën aangetroffen, hoewel dit naar de mededeelingen van sommige onderzoekers mogelijk moet zijn. In navolging van deze auteurs entte ik *Mycosphaerella* zoowel op gesteriliseerde erwtenstengels als op verschillende agarbodems en stelde de cultures afwisselend aan koude en warmte bloot, echter zonder resultaat.

HOOFDSTUK II

VOEDINGSPHYSIOLOGIE VAN DE SCHIMMELS IN REINCULTUUR

§ 1. Literatuuroverzicht.

Over de voedingsphysiologie van *Ascochyta pisi* is in de literatuur slechts weinig te vinden. Het eenige onderzoek over dit onderwerp is in 1928 van de hand van Oskar Ludwig (36) verschenen. Hij werkte met vloeibare voedingsbodems, welke hij met een sporensuspensie van de te onderzoeken schimmel entte.

Hij geeft echter veelal geen drooggewichten van de mycelium-opbrengst op, maar bepaalt zich er toe te vermelden of de schimmel goed of slecht groeit.

Hij onderzocht een groot aantal stikstof- en koolstofbronnen op hun voedingswaarde voor de schimmel en vergeleek de uitkomsten over de invloed op *Ascochyta pisi* met die van *Aspergillus niger*.

Wat de koolstofbron betreft vindt Ludwig dat *Ascochyta pisi* weinig kieskeurig is. Hij onderzocht de groei van de schimmel op allerlei koolstofbronnen als: saccharose, dextrose, levulose, galactose, lactose, dextrine, cellulose, verschillende glucosiden en eenige alcoholen. Lactose bleek een zeer goede koolstofbron voor *Ascochyta pisi* te zijn. Cellulose in de vorm van filtreerpapier kon niet worden aangetast. Over de invloed van de stikstofbron vermeldt Ludwig het volgende: nitraat-stikstof maakt de beste groei mogelijk. De ammoniumzouten van anorganische zuren zijn ongeschikt, daar de vrijkomende mineraalzuren de groei al spoedig

onmogelijk maken. Op nitriet konden zijn cultures niet groeien, wat hij echter niet aan een giftige werking wijt, maar aan het feit, dat *Ascochyta pisi* niet in staat zou zijn om uit nitriet zijn stikstofbehoefte te dekken.

Nadat de nitrietcultures weken lang gestaan hadden, kon hij er nitraat in aantoonen. Er werd blijkbaar nitriet geoxydeerd tot nitraat, zoodat, wanneer hij de oplossingen ten tweede male met een sporensuspensie entte, groei mogelijk was.

L u d w i g werkte echter steeds met zure oplossingen (pH 4,4—4,6) zoodat, naar mijn meening, hieraan het onvermogen van *Ascochyta pisi* om op nitriet te groeien kan worden toegeschreven.

Andere onderzoekers geven namelijk aan dat verschillende schimmels in alcalisch milieu wel degelijk op nitriet als stikstofbron kunnen groeien.

W e n t (61) vond bij *Monilia sitophila* een even goede groei op nitraat als op nitriet.

H o c h a p p e l (19) zag verschillende *Fusarium*-soorten zich normaal ontwikkelen op een alkalische nitrietbodem.

B r e n n e r (4), die met *Aspergillus niger* experimenteerde, toonde aan dat nitriet in zure oplossing zelfs giftig werkt. Voegde hij bij die oplossing ammoniumoxalaat, dat een uitstekende stikstofbron is, dan kon *Aspergillus* er nog niet in groeien. Het vrije salpeterigzuur, resp. de gasvormige afbraakproducten van het anhydride (NO en NO_2) zijn n.l. zeer giftig te noemen.

Dat de giftige werking zich niet alleen tot het kiemstadium bepaalde, bewees B r e n n e r door een jonge cultuur uit NH_4 -oxalaat op een nitriet-voedingsbodem over te brengen, waardoor de groei direct ophield.

Wat de invloed van mineralen op den groei van *A. pisi* betreft, is door het onderzoek van L u d w i g alleen bekend dat ijzer, zink en koper de groei bevorderen. Over de invloed van mineralen als magnesium, fosfor, zwavel, calcium, kalium en natrium op de groei van *A. pisi* is dus niets bekend. Wel vindt men hierover in de literatuur opgaven betreffende andere schimmels.

R e e d s R a u l i n (45) kweekte *Aspergillus niger* op een synthetische vloeibare voedingsbodem en ging de invloed na van verschillende voedingszouten op het gewicht van de droge mycelium-opbrengst. Hij kwam tot de conclusie dat *Aspergillus niger* voor

een goede groei behalve stikstof en koolstof nodig heeft: fosfor, kalium, magnesium, zwavel en in geringe hoeveelheid: ijzer, zink en calcium.

Van der Veen (59) vond dat cultures van *Fusarium* en *Verticillium* zich slecht ontwikkelden wanneer zij gebrek aan fosfor leden. De hyphen waren dun en bevatten regelmatig verspreide oliedruppels. Ook bij zwavelgebrek ontstonden er oliedruppels, doch deze waren niet zoo regelmatig verspreid. Op het drooggewicht van de schimmels was zwavel niet van invloed. Er werden echter in cultures die aan zwavel gebrek leden weinig conidiën gevormd.

Het bleek van der Veen dat speciaal toevoegen van ijzer overbodig was, aangezien dit element als verontreiniging van de overige voedingszouten reeds in voldoende hoeveelheid in de oplossing aanwezig was.

Ook Young & Bennett (62) vermelden dat ijzer en zink in kleine hoeveelheden uit de glaswand diffundeeren, dus niet speciaal aan de oplossing behoeven toegevoegd te worden.

Volgens de oude opvatting zou calcium voor de groei van schimmels onnoodig zijn. In de meeste synthetische voedingsoplossingen wordt dan ook geen calcium toegevoegd.

In de nieuwere literatuur wordt echter meermalen melding gemaakt van een duidelijke invloed van calciumzouten op de groei van schimmels.

Zoo geeft Hori (20) aan dat *Sclerotinia libertinia*, *Fusarium roseum*, *Entomophthora* sp. en *Ramularia citri* slecht groeien zonder kalk. *Aspergillus niger* en *Aspergillus flavus* groeien echter evengoed met als zonder kalk.

Young & Bennett vonden dat calcium een stimuleerende werking op de groei van eenige schimmels uitoefent. Wanneer zij in de voedingsoplossing het KNO_3 vervingen door $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, bleek de opbrengst aan droge schimmelsubstantie belangrijk groter te zijn.

Coupin (6) heeft eveneens een invloed van Ca op de groei van schimmels waargenomen en wel bij *Penicillium glaucum*, waarbij bleek dat op voedingsbodems zonder Ca slechts steriel mycelium werd gevormd; zoodra er een calciumzout werd toegevoegd, werden rijkelijk conidiën gevormd.

Aan de hand van de hierna beschreven proeven heb ik getracht de physiologie van *Ascochyta pisi* vast te stellen.

EIGEN ONDERZOEK.

§ 2. Methodiek.

Bij mijn onderzoek zijn de schimmels steeds op vloeibare voedingsbodem gekweekt in erlenmeyers van 100 ccm inhoud, behalve in één geval, waar erlenmeyers van 300 ccm inhoud gebruikt werden. Als voedingsbodem diende Richard's-oplossing, die als volgt was samengesteld:

50 g Saccharose, 10 g KNO_3 , 5 g KH_2PO_4 , 2,5 g MgSO_4 en 20 mg FeCl_2 per l. gedestilleerd water.

Door nu in deze oplossing de verschillende stoffen één voor één weg te laten of te vervangen door andere, was het mogelijk de invloed van verschillende koolstof- en stikstofbronnen en van enkele mineralen op de groei van *A. pisi* en *M. pinodes* na te gaan.

In deze oplossing werd het fosfaat niet direct toegevoegd, daar dan de pH tijdens het steriliseeren te veel zou veranderen. Het fosfaat en de rest van de oplossing werden dus afzonderlijk gesteriliseerd en naderhand met een steriele pipet bij elkaar gevoegd. Voorts gebruikte ik niet alleen het primaire kaliumfosfaat, maar ook K_3PO_4 , K_2HPO_4 en H_3PO_4 . Van deze stoffen werden 2 N-oplossingen gemaakt. Deze werden 1 uur bij $\frac{3}{4}$ atmosfeer overdruk gesteriliseerd.

Door nu de fosfaten in verschillende verhouding bij de voedingsbodem te voegen, kon ik oplossingen van verschillende pH verkrijgen. De zuurgraad werd colorimetrisch bepaald volgens W. Mansfield Clark. Wanneer verschillende koolstof- of stikstofbronnen met elkaar werden vergeleken werd er steeds voor gezorgd dat de zuurgraad van de oplossing in de verschillende reeksen gelijk was, zoodat het resultaat steeds op de bepaalde stoffen betrekking had en niet beïnvloed was door de zuurgraad.

Van deze oplossing werden, met een steriele pipet, de erlenmeyers elk van 25 ccm voorzien, waarop de voedingsbodem met conidiën van de te onderzoeken schimmel werd geënt.

Als proefobject gebruikte ik voornamelijk de zelf geïsoleerde

stammen, daar deze veel meer conidiën vormden dan de andere stammen. Een enkele maal werd ter vergelijking een isolatie van Jones gebruikt.

Het enten van de voedingsbodem met de te onderzoeken schimmel gebeurde door in elk kolfje 1 ccm van een sporensuspensie te brengen.

Deze sporensuspensie maakte ik aanvankelijk door bij een buis met een 14 dagen oude cultuur op haverhoutagar, 10 ccm steriel water te brengen en de sporen met een entnaald los te maken.

Van deze sporensuspensie werd nu in ieder kolfje 1 ccm gebracht. Deze kolfjes werden bij gebrek aan ruimte niet in een thermostaat gezet, maar bleven in de kamer staan bij een temperatuur tusschen 20° en 23° C.

Na 10 dagen was meestal de hoeveelheid schimmelsubstantie groot genoeg om op van te voren gewogen filtreerpapierjes te worden afgefiltreerd en in een autoclaaf bij 45° C. te worden gedroogd. Na 2 × 24 uur in de autoclaaf te hebben gelegen werden deze filters gewogen en de hoeveelheid schimmelsubstantie berekend.

Daar ik bij een zelfde reeks zeer sterk varierende uitkomsten kreeg kon verondersteld worden dat dit aan de entmethode moest worden toegeschreven. Het was natuurlijk mogelijk dat het eene kolfje meer sporen kreeg dan een ander doordat:

1. de cultures waarvan de sporensuspensie werd gemaakt nooit precies gelijk waren;
2. de hoeveelheid van 1 ccm der sporensuspensie, die met behulp van een gec calibreerde pipet in de kolfjes gebracht werd, niet zoo nauwkeurig kon worden afgemeten daar dit, om infecties te voorkomen, vrij snel moest gebeuren.

Ik heb daarom bij al mijn proeven de volgende methode toegepast, die het mogelijk maakte om alle kolfjes met een meer vergelijkbare hoeveelheid sporen te enten.

Ik nam daartoe een 14 dagen oude buiscultuur op haverhoutagar en voegde hierbij 10 ccm steriel water. Met een entnaald werden de sporen even losgewoeld en deze sporensuspensie in een steriele kolf gegoten. Hierbij werd 20 ccm steriel water gevoegd en van deze verdunde sporensuspensie werd 20 ccm in een groote

kolf met $\frac{1}{2}$ liter voedingsoplossing gebracht. Uit deze laatste kolf werden nu de kleine erlenmeyers ieder van 25 ccm vloeistof voorzien.

Wanneer men de groote kolf met voedingsoplossing tijdens het overpipeteeren in de kleine erlenmeyers nu en dan even schudt, zoodat de sporen niet bezinken, is men er zeker van dat alle kolfjes op dezelfde wijze worden geënt.

Op deze wijze heb ik steeds vrijwel gelijke uitkomsten gekregen in dezelfde reeks, zooals uit onderstaande proef moge blijken.

Deze proef werd opgezet om uit te maken in welke oplossing *Ascochyta pisi* nog goed groeide, terwijl toch de pH niet te sterk veranderde.

Als voedingsbodem diende bij de eerste reeks de oplossing van Richards die als volgt was samengesteld:

water	1000 g
saccharose	50 g
KNO ₃	10 g
MgSO ₄	2 $\frac{1}{2}$ g
KH ₂ PO ₄	5 g
FeCl ₂	20 mg

Na 10 dagen was de pH van 6,5 veranderd tot 6,8. Het drooggewicht der schimmelmasa bedroeg:

91, 92, 92, 92 en 93 mg gemidd. 92 mg

Gaf ik 1%, inplaats van 5% saccharose, dan veranderde de pH eveneens van 6,5 tot 6,8. Het drooggewicht van de schimmelmasa der 5 kolfjes was:

51, 53, 53, 52, 51 mg gemidd. 52 mg

Wanneer ik 1% saccharose gaf, maar meer fosfaat in de oplossing bracht, dan veranderde de pH slechts van 6,5 tot 6,6.

De drooggewichten waren dan:

bij de oplossing met 1 $\frac{1}{2}$ % fosfaat:

71, 73, 69, 68 en 69 mg gemidd. 70 mg

bij de oplossing met 2 $\frac{1}{2}$ % fosfaat:

83, 81, 86, 83 en 84 mg gemidd. 83,4 mg

De drooggewichten zijn dus bij kolfjes van dezelfde reeks nage-

noeg gelijk. De bovenbeschreven methode van enten, die zeer bruikbaar bleek te zijn, werd daarom in het vervolg steeds toegepast. Verschillen in pH tusschen kolfjes van dezelfde reeks heb ik nimmer waargenomen.

Uit de gemiddelde waarden van de proef is te zien dat *Ascochyta pisi* zeer goed kan groeien op een geringere hoeveelheid saccharose dan Richards aangeeft en dat bij toevoeging van minstens $1\frac{1}{2}$ % fosfaat een goede buffering wordt verkregen.

Ik heb in het vervolg de voedingsoplossingen steeds samengesteld met 2% saccharose en 2% fosfaat. Bovendien heb ik in plaats van 1% KNO_3 in het vervolg 0,5% KNO_3 gebruikt (of aequivalente hoeveelheden van andere N-zouten), om ook hierdoor te voorkomen dat de zuurgraad te sterk veranderde.

Wanneer het FeCl_2 uit de oplossing werd weggelaten was de opbrengst aan droge schimmelsubstantie even hoog als bij cultures die wel FeCl_2 toegevoegd hadden gekregen. Daar er blijkbaar als verontreiniging van de overige voedingszouten voldoende ijzer in de oplossing komt heb ik dit element in het vervolg weggelaten.

De samenstelling van de door mij gebruikte voedingsoplossing is dus:

saccharose	2%
KNO_3	0,5%
MgSO_4	0,25%
fosfaten	2%

§ 3. Invloed van de koolstofbron.

Om uit te maken bij welke koolstofbron *Ascochyta pisi* het beste groeit, entte ik de schimmel op voedingsoplossingen met verschillende C-bronnen ter sterkte van 2%. Hiervoor werden gebruikt:

1. dextrine
2. amyllum solubile
3. glucose
4. saccharose
5. galactose
6. lactose
7. gummi arabicum

Voor iedere C-bron werd een reeks van 10 kolfjes aangezet. De pH van alle oplossingen was 7,0. Na 12 dagen werd de pH weer bepaald en de schimmelsubstantie afgefiltreerd, gedroogd en gewogen.

Het resultaat was als volgt:

TABEL I

Groei van *Ascochyta pisi* op verschillende koolstofbron.

koolstofbron	begin pH	eind pH	drooggew. in m.g.
dextrine	7,0	7,2	96,4
amylum solubile	7,0	7,2	94,0
glucose	7,0	7,2	73,5
saccharose	7,0	7,2	71,0
galactose	7,0	7,0	50,0
lactose	7,0	7,0	31,7
gummi arabicum	7,0	7,0	23,4

Ascochyta pisi groeit dus het best met dextrine of amyllum solubile als koolstofbron, minder goed op glucose en saccharose en slecht op galactose, lactose en gummi arabicum.

Cellulose in de vorm van filtreerpapier wordt niet aangetast. Werde als voedingsbodem gelatine waaraan fijn verdeeld filtreerpapier was toegevoegd gebruikt, dan vertoonde *Ascochyta pisi* hierop dezelfde slechte groei als op een bodem die uitsluitend uit gelatine bestond. Er werd een spaarzaam luchtmycelium gevormd; verkleuring trad niet op, terwijl er geen pycniden gevormd werden.

Ludwig geeft aan dat lactose voor *Ascochyta pisi* een goede koolstofbron is, maar uit mijn proef blijkt dat lactose een van de slechtste C-bronnen is.

Het bevreemdt ook dat Ludwig zegt dat *Ascochyta pisi* zeer langzaam groeit en daardoor slechts in geringe mate reageert op verschillen in concentratie van de diverse voedingszouten.

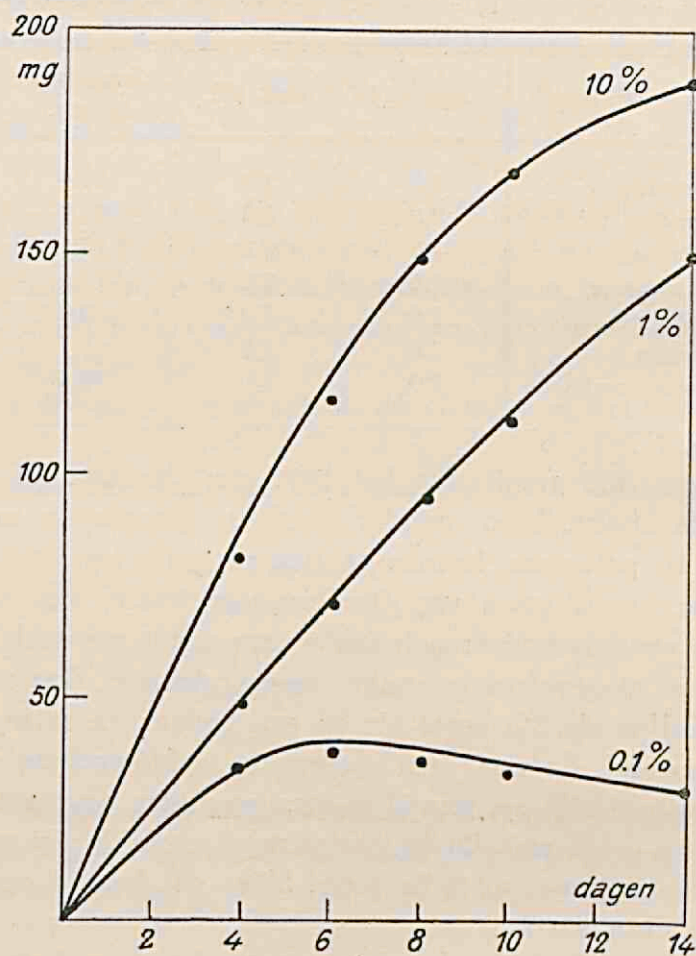
In de volgende proef, zoowel als in de proeven met verschillende concentraties van de stikstofbron reageerde *Ascochyta pisi* heel duidelijk.

Ik liet namelijk *Ascochyta pisi* groeien op voedingsoplossingen

met verschillende concentraties van de koolstofbron. Daartoe gebruikte ik glucose in de volgende concentraties: 10%, 1% en 0,1%.

De stikstof werd in deze reeks als NH_4Cl toegediend. Elke reeks bestond uit 20 kolfjes, waarvan er elke 2 dagen 4 werden afgenomen om het drooggewicht te bepalen.

Het resultaat van deze proef is in de onderstaande kromme weergegeven.



Figuur 3.
Groei van *Ascochyta pisi* op verschillende concentraties glucose.

Het hoogste drooggewicht werd bereikt bij 10% glucose; dat de kromme, die deze gewichtstoename weergeeft, niet rechtlijnig verloopt, moet worden toegeschreven aan het feit, dat de zuur-

graad van de voedingsoplossing tijdens de proef zoo sterk daalde, dat de groei belemmerd werd. De pH daalde bij deze reeks n.l. van 6,5 tot 3,4, terwijl in de reeksen met 1% en 0,1% glucose de zuurgraad resp. van pH 6,5 op 6,0 en 6,4 terugliep.

De kromme, die de gewichtstoename bij een voedingsoplossing met 0,1% glucose aangeeft heeft een eigenaardig verloop. Na 5 of 6 dagen is het maximum bereikt, waarna het gewicht heel langzaam gaat dalen. Hier is dus blijkbaar de koolstofbron na 5 of 6 dagen uitgeput, waarna autolyse plaats vindt.

§ 4. Invloed van de stikstofbron.

Daar uit de literatuur bekend is dat de groei van een schimmel meestal sterk afhankelijk is van de vorm waarin de stikstof wordt toegediend, heb ik, om het gedrag van eenige *Ascochyta*-stammen ten opzichte hiervan te onderzoeken, de onderstaande proeven genomen.

Als stikstofbron dienden aequivalente hoeveelheden van de volgende zouten: KNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl en ureum.

De voedingsoplossingen waren als volgt samengesteld:

saccharose	2%
MgSO_4	0,25%
fosfaat	2%

stikstof als een van de volgende zouten:

KNO_3	0,5%
NH_4Cl	0,284%
NH_4NO_3	0,216%
ureum	0,144%

Iedere reeks bestond uit 20 kolfjes, waarvan er na 5, 7, 9 en 12 dagen telkens 5 werden afgenomen om het gewicht aan schimmel-substantie te bepalen.

Het resultaat is in de volgende kromme weergegeven.

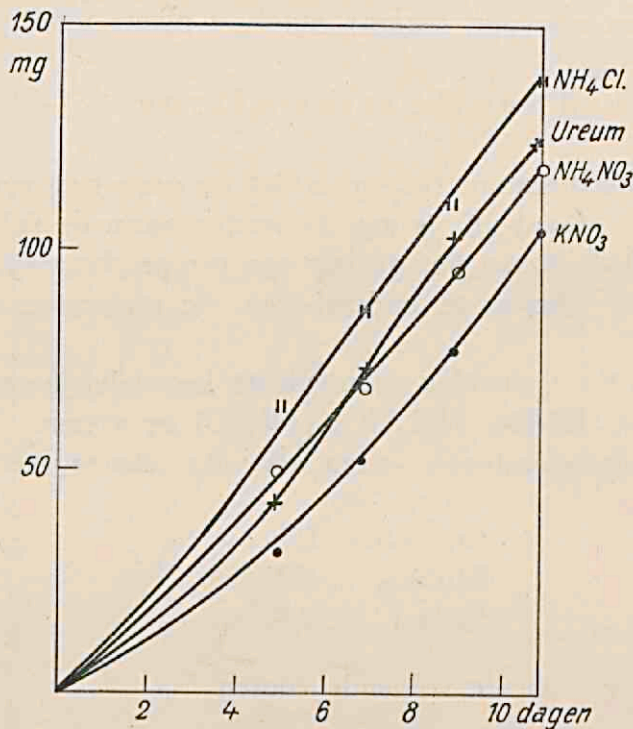
Zooals uit de figuur blijkt is de groei van *Ascochyta pisi* sterk afhankelijk van de vorm waarin de stikstof geboden wordt.

Ammoniumchloride, ammoniumnitraat en ureum zijn betere stik-

stofbronnen dan kaliumnitraat. Het hoogste drooggewicht werd bereikt met NH_4Cl als stikstofbron.

Ludwig vond dat nitraten voor *Ascochyta pisi* een betere stikstofbron leverden dan ammoniumzouten. Uit al mijn proeven blijkt echter dat bijv. ammoniumchloride een veel betere N-bron is dan kaliumnitraat.

Nu geeft Ludwig aan dat de ammoniumzouten van anorga-



Figuur 4.

Groei van *Ascochyta pisi* op verschillende stikstofbron.

nische zuren, wanneer deze als N-bron worden gebruikt, door het vrijkomen van de mineraalzuren, de oplossing spoedig ongeschikt voor *Ascochyta pisi* maken.

Daar Ludwig slechts 0,2% fosfaat in zijn voedingsoplossingen gebruikte, zullen deze niet sterk gebufferd zijn. Daar ik echter in mijn oplossing 2% fosfaat gebruikte, had ik nimmer last van te sterke verzuring van de voedingsbodem.

Wat betreft het gedrag van *Ascochyta pisi* stam Jones en

Ascochyta pinodella zijn de resultaten in onderstaande tabel weer-
gegeven. Voor een beter overzicht heb ik hierbij tevens de waar-
den van *Ascochyta pisi* stam Wehlburg gevoegd. Ik moet er
echter op wijzen dat de in de tabellen aangegeven waarden voor
de verschillende schimmels niet met elkaar vergeleken mogen wor-
den, daar ze op de verschillende tijdstippen bepaald zijn; wel draagt
de invloed van de stikstofbron in alle drie groepen hetzelfde
karakter.

TABEL II

Drooggewichten van *Ascochyta pisi* en *Ascochyta pinodella* op
verschillende stikstofbron.

stikstofbron	A. pisi st. Wehlb.	A. pisi st. Jones	A. pinodella
KNO ₃	103	63	149
NH ₄ NO ₃	117	128	162
NH ₄ Cl	136	141	204
Ureum	124	98,5	181

Ammoniumzouten worden blijkbaar gemakkelijker opgenomen
dan nitraten. Toch maakt het nog verschil in welke vorm het
ammoniumzout wordt geboden.

In de volgende proeven bestond elke reeks uit 10 kolfjes, waar-
van na afloop van de proef het gemiddelde gewicht aan droge
schimmelsubstantie werd bepaald. Werd *Ascochyta pisi* geënt op
een voedingsoplossing met (NH₄)₂SO₄ als stikstofbron, dan werd
er in 10 dagen gemiddeld 84,3 mg aan drooggewicht gevormd,
terwijl er bij de contrôle-reeks, waar NH₄Cl als stikstofbron werd
gegeven in dezelfde tijd gemiddeld 130,2 mg droge stof werd ge-
vormd. Daar het sulfaat bij 1% K₂SO₄ oplossing niet schadelijk
werkt (zie blz. 37) kan men uit deze proef, waarin het (NH₄)₂SO₄
slechts in geringe hoeveelheid gegeven werd, (3,55 g per l) hoog-
stens besluiten dat de verbinding waarin het zout geboden wordt
voor *Ascochyta pisi* verschil maakt.

Wanneer ik *Ascochyta pisi* verschillende nitraten als stikstof-
bron gaf, dan bleek het dat er geen verschil in groei was bij KNO₃
en NaNO₃. Bij Ca(NO₃)₂ werd echter veel meer droge stof ge-

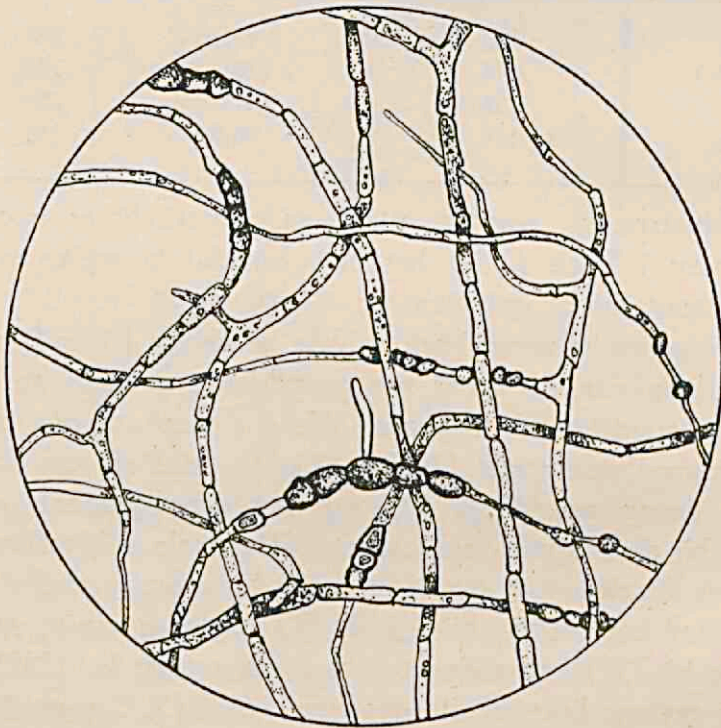
vormd. Blijkbaar oefent hier het Ca-ion een stimuleerende werking uit, zooals ook Young & Bennett vonden.

TABEL III

Groei van *Ascochyta pisi* op voedingsoplossingen met aequivalente hoeveelheden van verschillende nitraten.

stikstofbron	drooggew.
KNO ₃	52,1
NaNO ₃	51,0
Ca(NO ₃) ₂	92,2

Wanneer in het geheel geen stikstof gegeven wordt dan ont-



Figuur 5.

Ascochyta pisi op een voedingsoplossing met 0,01%
 NH₄NO₃; pH 6,5. Vergr. 550 ×.

kiemen de sporen wel, maar er wordt verder geen mycelium ge-

vormd. De groei wordt sterker naarmate meer stikstof wordt toegevoegd; bij zeer groote hoeveelheden is een schadelijke invloed te bemerken die tot uiting komt in het geringere drooggewicht.

In de onderstaande tabel zijn de resultaten weergegeven van de groei van *Ascochyta pisi* op voedingsoplossingen met verschillende concentraties KNO_3 en NH_4NO_3 .

TABEL IV

Groei van *Ascochyta pisi* op verschillende concentraties van de stikstofbron.

KNO_3	drooggew.	NH_4NO_3	drooggew.
0,04 %	52,4	0,01 %	69,5
0,25 %	68,7	0,1 %	162
1 %	96,6	1 %	201
5 %	71,9	5 %	123,5

Wordt nitriet als stikstofbron geboden dan groeien *Ascochyta pisi* en *Mycosphaerella pinodes* op deze voedingsoplossing goed, mits de oplossing niet zuur reageert. Dit komt ook overeen met hetgeen *Brenner* en *Hochapfel* vonden. Zij geven n.l. aan, dat schimmels wel op nitriet kunnen groeien wanneer er loog is toegevoegd, dat het schadelijke HNO_2 bindt.

Volgens *Ludwig* echter kan *Ascochyta pisi* ook dan niet op nitriet groeien, daar deze schimmel niet in staat zou zijn om uit nitriet zijn stikstofbehoefte te dekken.

Ik liet de schimmels groeien in oplossingen waarbij 4,2 g KNO_2 per liter was gevoegd en bracht de oplossingen op verschillende zuurgraad.

Na 14 dagen bleek, dat zoowel *Ascochyta pisi* als *Mycosphaerella pinodes* op nitriet goed groeiden bij pH 7,7, maar dat er totaal geen groei was waar te nemen bij pH 5,4.

Ludwig merkt op dat er in een voedingsoplossing met nitriet na eenige tijd wat nitraat aanwezig is. Blijkbaar wordt dus langzamerhand het nitriet tot nitraat geoxydeerd. Terwijl de schimmel op de voedingsoplossing eerst niet kon groeien, bleek dit na een tweede keer enten toch mogelijk.

Hoewel ik de oplossingen van pH 5,4, waarin na 4 weken nog geen groei was waar te nemen, nog eens heb geënt, was er 2 weken daarna nog steeds geen groei te bespeuren.

Ik meen dus te mogen aannemen, dat de mogelijkheid om op nitriet te groeien hier afhankelijk is van de aanwezigheid van loog.

TABEL V

Groei van *Ascochyta pisi* en *Mycosphaerella pinodes* op nitriet als stikstofbron.

	zuurgraad	drooggew.
A. pisi	pH 5,4	0
"	" 7,7	101,4
M. pinodes	" 5,4	0
" "	" 7,7	70,9

Ik liet *Ascochyta pisi* ook op voedingsbodems met pepton en asparagine als stikstofbron groeien. Als contrôle diende een reeks met NH_4Cl als stikstofbron. De oplossingen bevatten resp. per l. 2,84 g NH_4Cl , 3,6 g asparagine en 5 g pepton.

Ascochyta pisi groeit op pepton even goed als op NH_4Cl , terwijl asparagine een minder goede stikstofbron blijkt te zijn.

TABEL VI

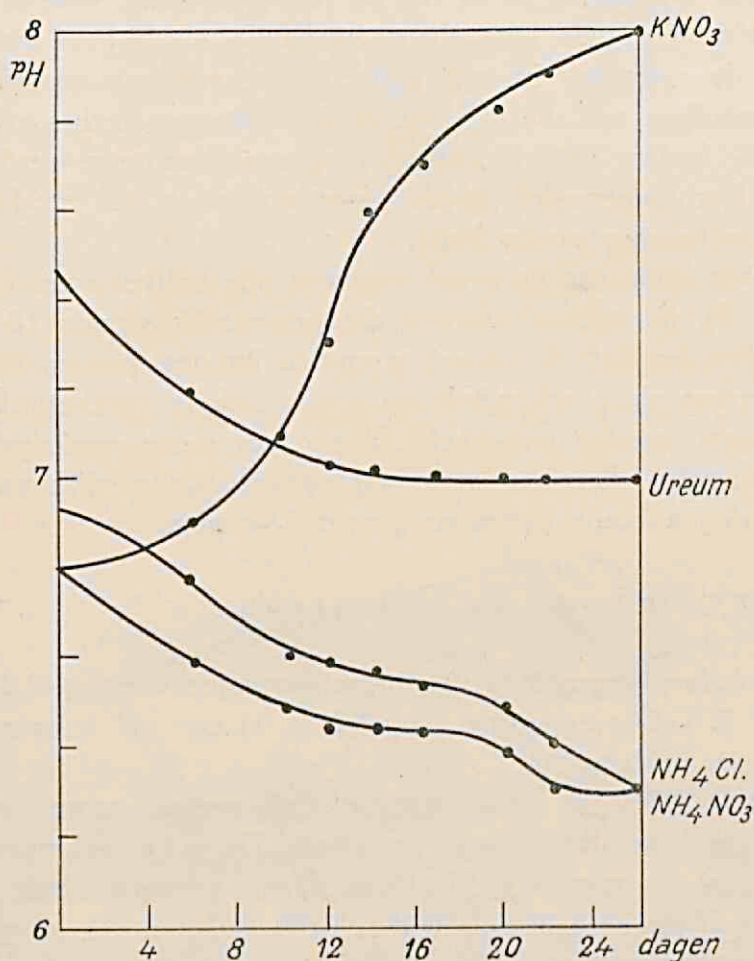
Groei van *Ascochyta pisi* op voedingsbodem met organische stikstofbron.

stikstofbron	drooggew.
NH_4Cl	153,6
pepton	148,4
asparagine	121,2

De zuurgraadverschuiving staat sterk onder invloed van de stikstofbron welke men gebruikt.

Om een duidelijke zuurgraadverschuiving te kunnen zien was het noodzakelijk dat de cultures minstens 3 weken bleven groeien zoodat ook een grootere hoeveelheid voedingsoplossing moest gegeven worden.

Voor de volgende proef zijn daarom erlenmeyers van 300 ccm



Figuur 6.

Zuurgraadverschuiving onder invloed van verschillende stikstofbron.

inhoud gebruikt waarbij iedere kolf voorzien werd van 50 ccm voedingsoplossing.

De reeksen bestonden elk uit 10 kolven, waarvan er om de vier dagen 5 op de zuurgraad werden onderzocht.

Men ziet dat, wanneer KNO_3 als stikstofbron gebezigd wordt,

de zuurgraad naar de basische kant verschuift, terwijl een verzuring van de oplossing plaats vindt wanneer NH_4NO_3 , NH_4Cl en ureum geboden worden.

Wanneer ammoniumnitraat gebezigd wordt tast de schimmel grootendeels de NH_4 -groep aan om zijn stikstof uit te betrekken.

Dit blijkt uit het verzuren van de voedingsbodem, daar er HNO_3 in de oplossing komt. Dit gebeurt bij KNO_3 als N-bron niet, waar immers de oplossing basisch wordt. Deze voedingsoplossing was in tegenstelling met die van alle andere proeven slechts gebufferd met $\frac{1}{2}\%$ fosfaat (bij de andere voedingsoplossingen werd steeds 2% fosfaat toegevoegd, zodat daar ook nooit een sterke zuurgraadverschuiving plaats had).

Aan het einde van de proef waren in alle kolfjes pycniden aanwezig. Bij de andere proeven die gewoonlijk slechts 10 tot 14 dagen duurden heb ik nimmer pycniden kunnen vinden. Blijkbaar fructificeeren deze schimmels op een vloeibare synthetische voedingsbodem minder gemakkelijk dan op de vaste voedingsbodems als haverhout-, kers- of moutagar, waarop gewoonlijk na ongeveer 7 dagen reeds pycniden gevormd werden.

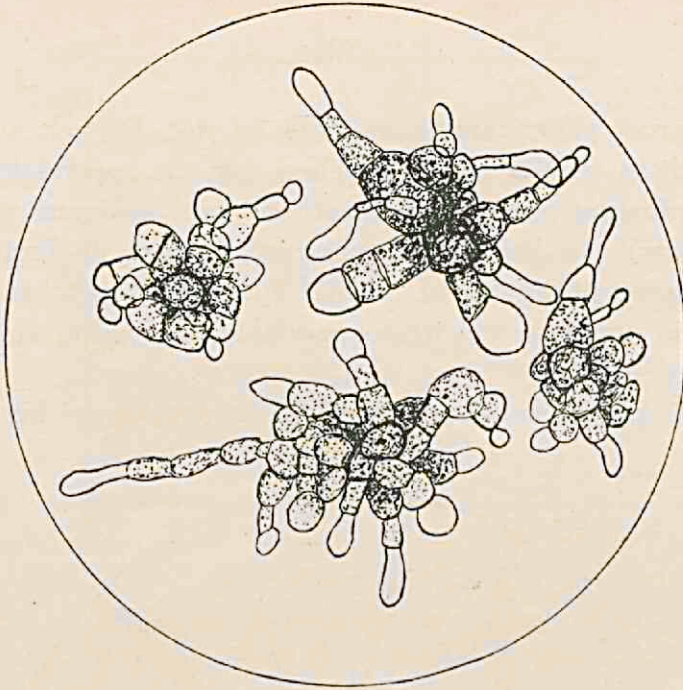
§ 5. Invloed van de zuurgraad.

Ascochyta pisi groeit in voedingsoplossingen van pH 3,2 tot en met pH 9. Of er nog groei mogelijk is bij een pH hoger dan 9 heb ik niet onderzocht.

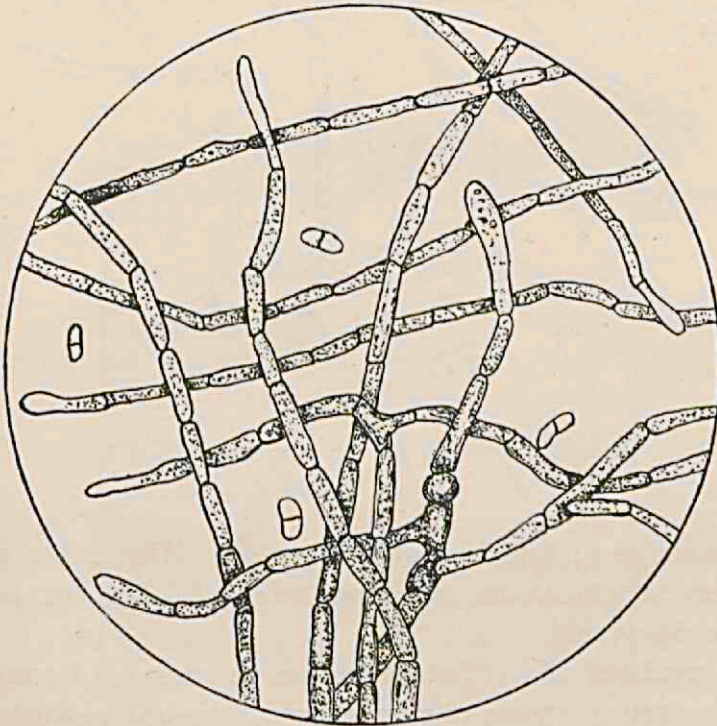
Bij pH 3,2 is de groei meestal zeer gering, vooral wanneer KNO_3 als stikstofbron gegeven wordt. De schimmel vormt niet anders dan een zeer dun, kleurloos, slijmerig laagje op de bodem van de kolfjes; deze hoeveelheid schimmelsubstantie was gewoonlijk te gering om te worden gewogen.

Geeft men NH_4Cl als stikstofbron, dan wordt er meer schimmelsubstantie gevormd, daar *Ascochyta pisi* ammoniakstikstof beter benut dan nitraatstikstof; de pH van de voedingsoplossing verschuift in dit geval echter spoedig tot een punt waarbij geen groei meer mogelijk is. De schimmel vormt bij pH 3,2 geen gesloten dek, maar aan de oppervlakte ontwikkelen zich groene klompjes mycelium (fig. 7) en op de bodem een kleurloos, slijmerig laagje.

In een voedingsoplossing met KNO_3 en saccharose heeft de



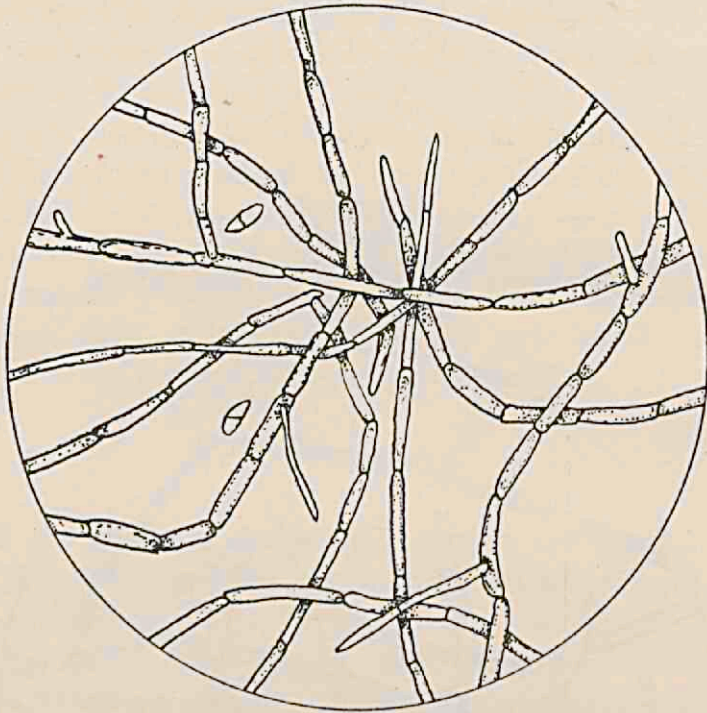
Figuur 7.
Ascochyta pisi bij pH 3.2. Vergr. 550 $\times$.



Figuur 8.
Ascochyta pisi bij pH 6,5, met 1% NH_4NO_3 .
 Vergr. 550 $\times$.

optimale groei plaats tusschen pH 4 en 4,9. De schimmel vormt een zeer dicht, wollig gesloten geheel aan de oppervlakte van de voedingsoplossing, welke langzamerhand geel gekleurd wordt. Het mycelium zelf is lichtoranje gekleurd. Naar de basische kant neemt de groei geleidelijk af. Bij pH 7, 8 en 9 groeit het mycelium bijna geheel onder de vloeistofoppervlakte. Oplossing en mycelium blijven ongekleurd.

In voedingsoplossingen met NH_4Cl en saccharose ligt het punt



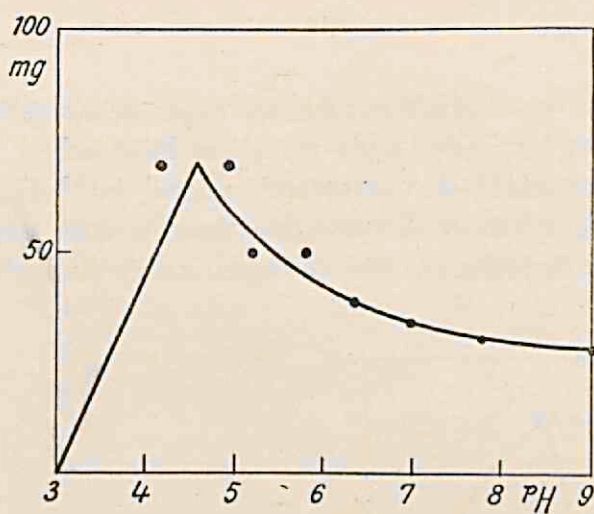
Figuur 9.

Ascochyta pisi bij pH 8,2 met 1% NH_4NO_3 .

Vergr. 550 $\times$.

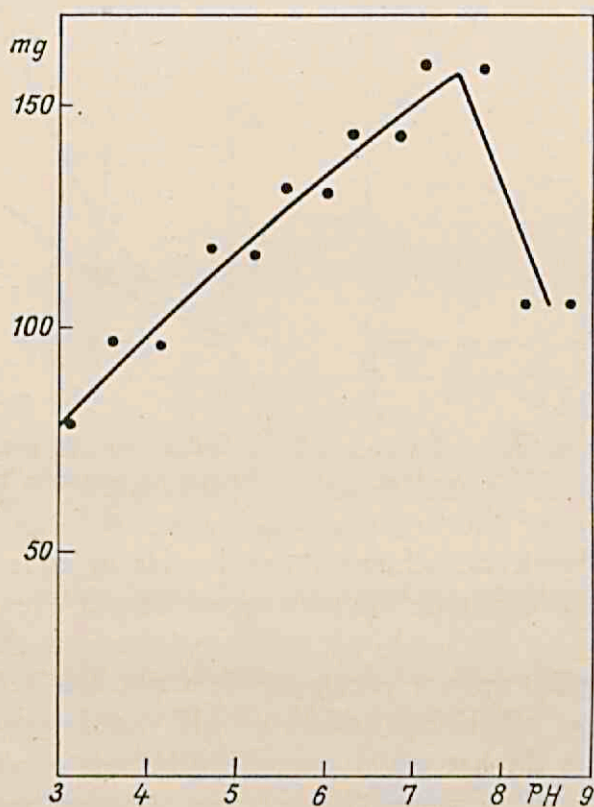
van optimale groei tusschen pH 7,1 en 7,8. Hier is het mycelium zoowel boven als onder de vloeistofoppervlakte tot een taaie massa ineengegroeid.

In dit geval neemt met het dalen van de zuurgraad ook de groei af. Ook wordt er steeds minder oranje kleurstof gevormd, totdat de cultures bij pH 5 geheel kleurloos zijn. Merkwaardig is het dat bij pH $\pm 3,2$ plotseling een groene kleur van de aan de opper-



Figuur 10.

Invloed van de zuurgraad op de groei van *Ascochyta pisi* bij saccharose- KNO_3 voeding.

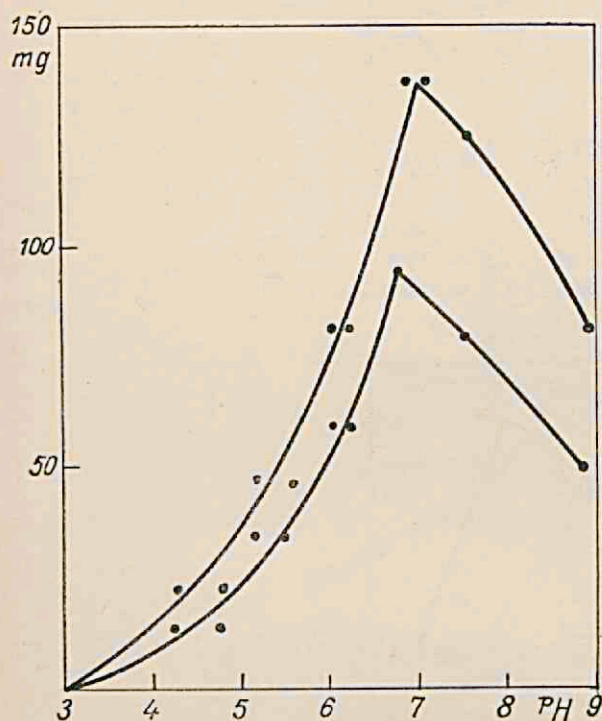


Figuur 11.

Invloed van de zuurgraad op de groei van *Ascochyta pisi* bij saccharose- NH_4Cl -voeding.

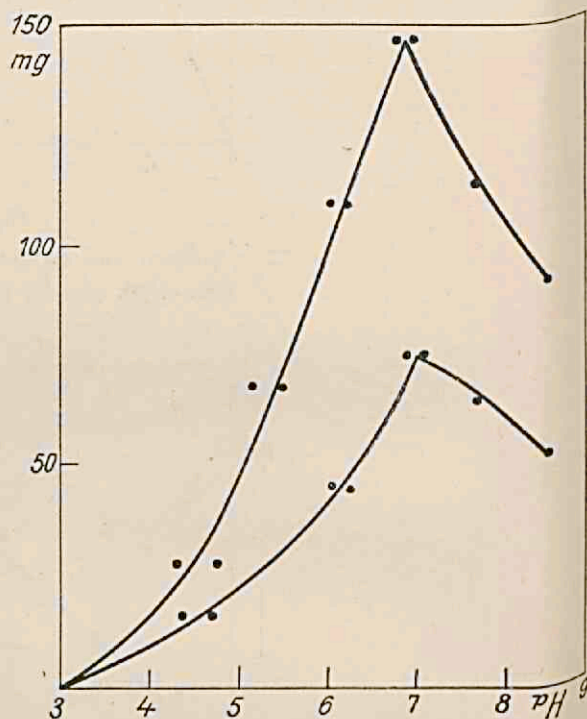
vlakte drijvende myceliumklompjes optreedt; de oplossing, evenals het op de bodem liggende laagje mycelium blijft echter ongekleurd.

Daar in deze proef de zuurgraad, vooral bij NH_4Cl voeding sterk veranderde, heb ik de kromme door punten getrokken die liggen tusschen de punten welke de begin- en de eind pH aangeven.



Figuur 12.

Invloed van de zuurgraad op de groei van *Ascochyta pisi* bij dextrine- KNO_3 voeding.



Figuur 13.

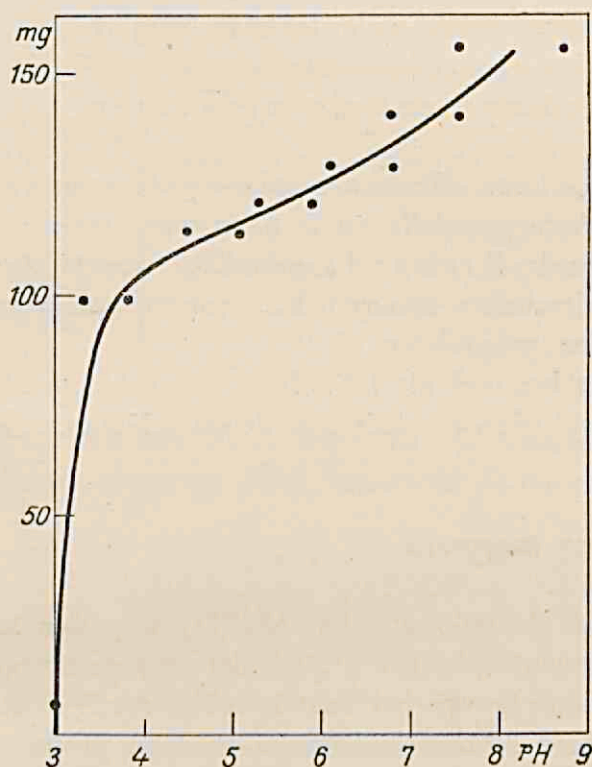
Invloed van de zuurgraad op de groei van *Ascochyta pinodella* bij dextrine- KNO_3 voeding.

Op nitraat groeit de schimmel dus harder in zuur milieu; op ammoniakstikstof wordt de optimale groei bereikt even boven het neutrale punt.

Zien we hier dat op een voedingsbodem met een bepaalde stikstofbron de groei afhankelijk is van de pH van de voedingsoplossing, evenzeer is dit het geval voor de groei op voedingsbodems waarin de koolstof in verschillende vorm geboden wordt.

Boven zagen wij dat op een voedingsbodem met saccharose en KNO_3 het optimum ongeveer bij pH 4,5 ligt. Om na te gaan of dit optimum voor andere koolstofbronnen op dezelfde plaats ligt,

werd de saccharose door dextrine vervangen. Deze proef duurde 14 dagen; iedere reeks bestond uit 10 kolfjes van dezelfde zuurgraad. Na 7 dagen werd van de helft der kolfjes uit iedere reeks de opbrengst aan schimmelsubstantie bepaald en na 14 dagen gebeurde hetzelfde met de overige kolfjes. Zooals uit fig. 12 blijkt



Figuur 14.

Invloed van de zuurgraad op de groei van *Ascochyta pisi* bij dextrine- NH_4Cl voeding.

ligt het punt van optimale groei na 7 dagen evenals na 14 dagen bij pH 6,9.

Een dergelijke proef werd eveneens genomen met *Ascochyta pinodella*. Het resultaat dat weergegeven is in fig. 13 komt met dat der vorige proef overeen.

Uit de literatuur is bekend, dat nitraatstikstof het gemakkelijkst wordt opgenomen in zuur milieu, hetgeen ook het geval was bij saccharose- KNO_3 voeding. Tot mijn verwondering zag ik echter dat dit niet meer opging wanneer dextrine als koolstofbron ge-

boden werd. Blijkbaar hangt dus de opname van nitraten sterk af van de vorm waarin de koolstof aanwezig is.

Dit is ook het geval met de opname van ammoniakstikstof.

Zagen wij in een vorige proef dat bij een voeding met saccharose en NH_4Cl het pH-optimum bij 7,5 ligt, zoo blijkt dit naar de basische kant te verschuiven wanneer de saccharose in de oplossing vervangen wordt door dextrine. (fig. 14).

§ 6. Invloed van enkele mineralen.

Om de invloed van enkele mineralen op de groei van *Ascochyta pisi* en *Ascochyta pinodella* na te gaan werd weer uitgegaan van de gemodificeerde Richards-oplossing, waarin de hoeveelheid van het te onderzoeken mineraal kon worden gewijzigd of waaruit het kon worden weggelaten.

Iedere reeks bestond uit 10 kolfjes, waarvan na afloop van de proef het gemiddelde gewicht aan droge schimmelsubstantie werd bepaald.

a. Invloed van magnesium.

Laten we uit de oplossing het MgSO_4 weg dan is de ontwikkeling bij *Ascochyta pisi* zóó gering, dat er geen drooggewicht van te bepalen is; 0,01% van het zout is echter reeds in staat een normale hoeveelheid schimmelsubstantie te doen produceeren, terwijl 1% MgSO_4 schadelijk werkt, daar deze cultures veel minder schimmelsubstantie opbrengen.

Ascochyta pinodella reageerde op dezelfde wijze als *Ascochyta pisi* op de verschillende concentraties MgSO_4 ; de resultaten zijn in de onderstaande tabel weergegeven.

b. Invloed van zwavel.

Om na te gaan hoe *Ascochyta pisi* bij verschillende concentraties sulfaat zou groeien werd in de voedingsoplossing het MgSO_4 vervangen door een aequivalente hoeveelheid MgCl_2 , terwijl de oplossingen resp. 0 g, 1 g, 4 g en 10 g K_2SO_4 p. l. kregen.

Bij de cultures zonder sulfaat werd een drooggewicht bereikt

dat belangrijk onder het normale lag. Blijkbaar is dus eenig sulfaat noodzakelijk om een goede groei mogelijk te maken.

TABEL VII

Groei van *A. pisi* en *A. pinodella* op voedingsoplossingen met verschillende concentraties magnesiumsulfaat.

MgSO ₄	gemidd. drooggew. na 13 dagen.	
	<i>Ascochyta pisi</i>	<i>Ascochyta pinodella</i>
0 ‰	0 m g	4,5 m g
0,01 ‰	108,6 m g	129,6 m g
0,2 ‰	109,3 m g	121,6 m g
1 ‰	81,9 m g	100,3 m g

Bij de oplossingen met 0,1%, 0,4% en 1% kaliumsulfaat waren de drooggewichten ongeveer gelijk, zooals uit de onderstaande tabel blijkt.

TABEL VIII

Groei van *Ascochyta pisi* op voedingsoplossingen met verschillende concentraties kaliumsulfaat.

K ₂ SO ₄	drooggew.
0 ‰	50,2 m g
0,1 ‰	77,8 m g
0,4 ‰	78,0 m g
1 ‰	79,8 m g

c. Invloed van fosfor.

Geheel zonder fosfaat ontwikkelen de cultures zich slecht; de hyphen zijn dun en bevatten onregelmatig verspreide oliedruppels.

Op een voedingsbodem met 0,2% fosfaat is reeds een tamelijk goede groei waar te nemen, welke steeds beter wordt naarmate

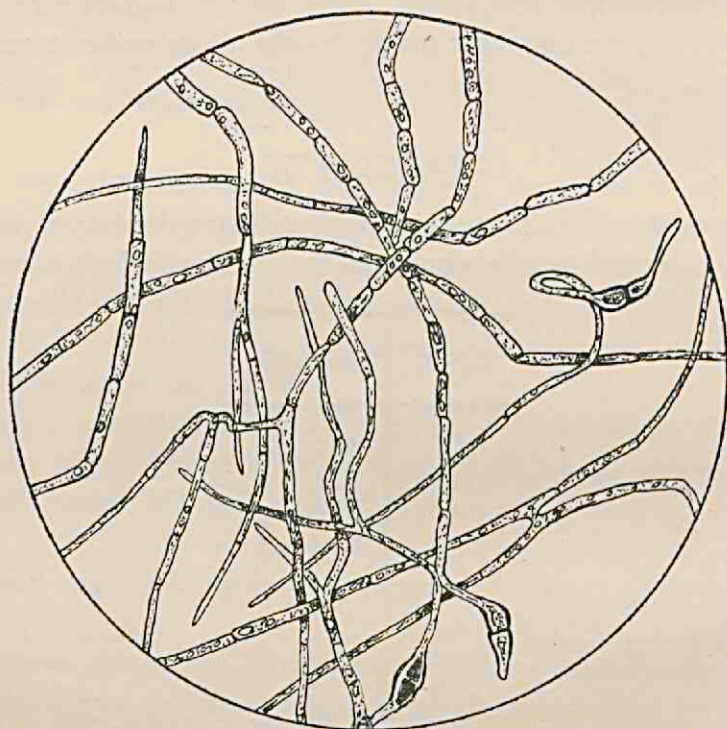
meer fosfaat voorhanden is. *Ascochyta pisi* kan zeer hoge fosfaatconcentraties verdragen, hoewel hierbij de groei niet sterk meer is.

Zelfs op een voedingsoplossing die 10% fosfaat bevatte, was

TABEL IX

Groei van *Ascochyta pisi* stam Wehlburg en *Ascochyta pisi* stam Jones op voedingsoplossingen met verschillende concentraties fosfaat.

Fosfaat	gemidd. drooggewicht na 11 dagen.	
	stam Wehlburg	stam Jones
0 ‰	15,0	15,0
0,2 ‰	53,5	55,0
2 ‰	98,6	109,4



Figuur 15.

Ascochyta pisi bij fosforgebrek.

Vergr. 550 ×.

nog groei mogelijk, doch deze was op het tijdstip dat het drooggewicht van de andere reeksen werd bepaald te gering, om te meten.

Na vier weken had zich in deze cultures echter een flinke hoeveelheid mycelium gevormd. De groei beperkte zich tot de rand van het vloeistofoppervlak, waar een onregelmatige, dikke ring van mycelium gevormd werd, die bij *Ascochyta pisi* stam Jones karmijnrood gekleurd was, bij de eigen isolatie lichtoranje.

d. *Invloed van kalium en calcium.*

Een geringe hoeveelheid kalium schijnt reeds voldoende voor de groei te zijn. Wanneer alle kalium in de voedingsoplossing vervangen werd door natrium was de opbrengst aan droge schimmel-substantie even groot. Blijkbaar is dus het kalium dat uit de glaswand in de oplossing diffundeert, voldoende. Geeft men in plaats van KNO_3 als stikstofbron een aequivalente hoeveelheid $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ dan wordt er in dezelfde tijd een veel grotere hoeveelheid droge stof gevormd. Blijkbaar oefent hier het Ca-ion een stimuleerende werking uit zooals ook Young & Bennett vonden.

De stikstof werd in deze reeks als een van de volgende zouten toegediend:

KNO_3	0,5%
NaNO_3	0,42%
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,41%

TABEL X

Groei van *Ascochyta pisi* op voedingsoplossingen met verschillende nitraten als stikstofbron.

stikstofbron	drooggew. in mg
KNO_3	52,1
NaNO_3	51,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	92,2

Om nu nog eens op een andere wijze de invloed van het calcium na te gaan, werden in de gewoonlijk gebruikte voedingsoplossing de volgende hoeveelheden CaCl_2 gebracht: 0,1%, 0,5% en 2%. Deze proef bestond uit 2 series; de zuurgraad verschilde in de reeksen onderling zeer weinig, zoodat het resultaat van de proef daardoor niet beïnvloed kan zijn.

Ascochyta pisi levert bij toevoeging van 0,1% CaCl_2 minder schimmelsubstantie op dan bij de contrôle. Is er echter meer CaCl_2 voorhanden, dan neemt de groei weer toe. Het is niet onmogelijk dat dit aan een invloed van ionenantagonisme is toe te schrijven.

In de oplossing met 2% CaCl_2 is de groei weer geringer. Waar-

TABEL XI

Groei van *Ascochyta pisi* op voedingsoplossingen met verschillende concentraties CaCl_2 .

CaCl_2	1 ^e serie drooggew. in mg	2 ^e serie drooggew. in mg
0 % (contrôle)	92,5	101,3
0,1 %	63,4	73,3
0,5 %	145,3	94,5
2 %	111,2	77,8

schijnlijk werkt hier de groote hoeveelheid CaCl_2 schadelijk; bovendien vormt het calcium in de voedingsoplossing met het opgeloste kaliumfosfaat het slecht oplosbare calciumfosfaat dat op de bodem neerslaat en zodoende het fosfaat buiten bereik van de schimmel brengt.

§ 7. Conclusies.

Uit de voorgaande proeven is gebleken dat *Ascochyta pisi* een duidelijke voorkeur voor enkele koolstofbronnen heeft. Van de onderzochte koolhydraten zijn dextrine en amyllum solubile het

best, dan volgen glucose en saccharose, terwijl lactose en gummi arabicum als koolstofbron voor *Ascochyta pisi* minder geschikt zijn.

Wat betreft de stikstofbron worden ammoniumzouten beter benut dan nitraten. Ook op ureum wordt een goede groei bereikt. Nitriet kan als stikstofbron gebruikt worden mits de voedingsoplossing basisch reageert. Zoowel *A. pisi* als *M. pinodes* blijken op nitriet bij pH 7,7 goed te groeien; bij pH 5,4 was er echter in het geheel geen groei waar te nemen.

Op pepton groeit *A. pisi* ongeveer even goed als op NH_4Cl ; op asparagine werd echter belangrijk minder droge schimmelsubstantie gevormd.

De zuurgraadverschuiving is afhankelijk van de stikstofbron welke gebezigd wordt. Met KNO_3 als stikstofbron wordt de voedingsoplossing basisch, terwijl een verzuring plaats heeft wanneer ureum, NH_4Cl of NH_4NO_3 gebruikt worden.

De groei van *A. pisi* werd onderzocht bij verschillende zuurgraad van pH 3 tot pH 9. Bij een pH lager dan 3,2 is geen groei mogelijk. Bij pH $\pm$ 3,2 vormt de schimmel geen normale hyphen, maar kleine groengekleurde klompjes, welke uit afgeronde, opgezwollen cellen bestaan. Er wordt hier ook geen gesloten dek van hyphen gevormd. Bij een zuurgraad hooger dan pH 3,2 is de groei goed. Er wordt aan de oppervlakte van de voedingsoplossing een gesloten dek van hyphen gevormd; de oplossing wordt langzamerhand lichtoranje gekleurd. Daar de proeven gewoonlijk slechts 10 tot 14 dagen duurden, werden er geen pycniden gevormd. In een geval waarbij de proef 24 dagen duurde waren in alle kolfjes pycniden te vinden (zie blz. 30).

Bij pH $\pm$ 9 is een goede groei waar te nemen, hoewel de hyphen hier meestal dun zijn en het mycelium voor een groot deel onder de oppervlakte groeit.

Het pH optimum is afhankelijk zoowel van de koolstofbron als van de stikstofbron. Bij saccharose- KNO_3 -voeding ligt het punt van optimale groei tusschen pH 4 en 4,9; bij saccharose- NH_4Cl -voeding ligt het optimum tusschen pH 7,1 en 7,8.

Werd in de voedingsoplossing de saccharose vervangen door dextrine, dan bleek het optimum naar de zure kant te zijn verschoven. Voor KNO_3 -dextrine ligt het optimum bij pH 6,9 en voor NH_4Cl -dextrine bij pH 8.

Men mag dus niet van het pH-optimum zonder meer spreken, daar dit afhankelijk is van de voedingsbodem.

Van de mineralen werden onderzocht: magnesium, zwavel, fosfor en calcium.

Zonder Mg ontwikkelden de cultures zich in het geheel niet.

Wanneer men bij de voedingsoplossing 0,01% MgSO_4 voegt wordt er reeds een normale hoeveelheid schimmelsubstantie gevormd.

Ook zwavel en fosfor zijn voor een goede groei noodzakelijk, hoewel in cultures die aan een van deze twee stoffen gebrek leden nog wel groei was waar te nemen.

De gewoonlijk gebruikte voedingsoplossing van Richards bevat geen calcium. *Ascochyta pisi* groeit op deze oplossing zeer goed, zoodat men zou vermoeden dat Ca voor de groei onnoodig was. Toch oefent Ca een duidelijke invloed op de groei van *A. pisi* uit, wat uit de volgende feiten blijkt:

- a. werd in de voedingsoplossing alle KNO_3 vervangen door een aequivalente hoeveelheid $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ dan werd er belangrijk meer drooggewicht gevormd;
- b. werden bij de gewone Richards-oplossing verschillende hoeveelheden CaCl_2 gevoegd, dan bleek het dat *A. pisi* bij geringe concentraties CaCl_2 minder drooggewicht vormde dan bij de contrôle-oplossing; bij grootere concentraties CaCl_2 werd er echter meer droge stof gevormd dan bij de contrôle-oplossing, terwijl nòg grootere hoeveelheden CaCl_2 de groei belemmerden.

HOOFDSTUK III

INVLOED VAN DE BEMESTING OP DE INFECTIE

§ 1. Literatuuroverzicht.

De gevoeligheid van de plant voor de aantasting door parasitische fungi staat sterk onder de invloed van de uitwendige omstandigheden. Tot deze uitwendige omstandigheden behoren behalve de voeding van de gastheer ook de klimatologische factoren als vochtigheid, temperatuur en belichting, welke laatste omstandigheden ook indirect kunnen werken doordat zij de opname van voedingsstoffen door de gastheer kunnen beïnvloeden.

Zoo vermeldt Gaszner (11), die de invloed van belichting en CO_2 -gehalte van de lucht op de roestinfectie van granen onderzocht, dat sterke belichting de incubatietijd kon verkorten. Eveneens werd de incubatietijd verkort wanneer er bij constante belichting meer CO_2 voorhanden was. Gaszner besluit uit zijn proeven dat de gevoeligheid van het graan voor roestinfectie verhoogd wordt door een sterkere assimilatie van de gastheer, of deze assimilatie nu te danken is aan een sterkere belichting dan wel aan een grooter CO_2 -gehalte van de lucht.

Schaffnit & Volk (49) onderzochten de invloed van de bemesting op de infectie bij een groot aantal cultuurplanten in potcultures en kwamen tot de overtuiging, dat er een zeer duidelijke invloed van de bemesting op de gevoeligheid voor parasieten merkbaar was. Zij stelden echter als voorwaarde voor het slagen van hun proeven dat men materiaal van middelmatige gevoeligheid gebruikte, dus geen overgevoelige, respectievelijk resistente soor-

ten, daar in dat geval de bemesting geen verandering in resistentie zou teweegbrengen. Onder meer gingen zij de invloed van de bemesting van *Pisum sativum* op de gevoeligheid voor aantasting door *Ascochyta pisi* na en vonden dat planten, die gebrek leden aan stikstof en fosfor zeer resistent waren, terwijl planten die overvloedig stikstof kregen, evenals die, welke aan kalium gebrek leden, sterk aangetast werden.

Ook bij de andere, door hen onderzochte cultuurplanten vonden zij deze invloed van stikstof en fosfor. Zij formuleeren hun bevindingen als volgt: „jede Nährstoffkombination, bei der Stickstoff oder Phosphorsäure deutlich ins Minimum gerät, hemmt das Pflanzwachstum. Umgekehrt finden die untersuchten Parasiten die günstigsten Lebensbedingungen auf den Pflanzen, die in keiner Weise an diesen beiden Nährstoffen Mangel leiden.”

Rippel & Ludwig (46) die in potcultures de invloed van de bemesting van gerstplanten op de aantasting door *Pleospora trichostoma* onderzochten, vonden dat planten, die overvloedig N en P kregen, resistenter waren dan de planten die hieraan gebrek leden. Hun resultaten zijn dus juist tegenovergesteld aan die van Schaffnit & Volk.

Dit schrijven Rippel & Ludwig toe aan het feit dat Schaffnit & Volk een ander type parasiet gebruikten.

De eersten namelijk gebruikten een parasiet die de voedsterplant in het jeugd stadium aantast en dan met de plant meegroeit en waaraan zij de naam syngene parasiet gaven.

Schaffnit & Volk infecteerden hun planten wanneer deze volgroeid waren; de parasiet groeit dan niet mee maar blijft plaatselijk (metagene parasiet).

Uit het feit dat het voor een syngene parasiet van belang zou zijn dat de gastheer niet te krachtig groeit, wat bij gebrek aan N en P het geval is, zouden de uitkomsten van Rippel & Ludwig, volgens hen zodoende te verklaren zijn.

Gaszner & Hassebrauk (12) onderzochten de invloed van de bemesting van graanplantjes op de roest-infectie. Zij vonden, evenals Schaffnit & Volk, dat soorten van middelmatige resistentie de duidelijkste resultaten opleverden.

Zij gingen de invloed van één bepaalde voedingsstof na, terwijl zij de overige voedingszouten daarbij al of niet varieerden.

Hierbij bleek dat een stof in het eene geval de gevoeligheid van de plant voor parasieten kon verhoogen, in het andere geval de resistentie kon doen toenemen.

Fosfor bijvoorbeeld kan de resistentie van de plant verhoogen indien het in verhouding tot K en N in overvloed in de bodem aanwezig is, terwijl de gevoeligheid vergroot kan worden wanneer K en N tegenover P in de meerderheid zijn.

Mijns inziens mag men in dit geval niet spreken van een afzonderlijke invloed van de fosforbemesting, daar kalium en stikstof eveneens meewerken om de gevoeligheid van de plant te veranderen.

Verder vonden G a s z n e r & H a s s e b r a u k dat bij planten die volstrekt geen kali tot hun beschikking hadden de aantasting niet maximaal was. Volgens hen moet dit worden toegeschreven aan het feit dat de parasiet zich bij totale afwezigheid van kalium slechts matig kan ontwikkelen. De sterkste aantasting heeft eerst plaats wanneer de planten een zeer geringe hoeveelheid kalium krijgen, daar dan de parasiet zich ten volle kan ontwikkelen.

Wat betreft de invloed van enkele mineralen op de infectie van de plant voor parasieten, treft men dus in de literatuur vele tegenstrijdige meeningen aan.

Z i m m e r m a n n (63 en 64) geeft in twee referaten alle resultaten die op dit gebied sedert 1925 zijn verkregen. Hieruit blijkt, dat een zeer groot aantal van de door hem beschreven infectieproeven in het veld genomen zijn, hetgeen de gedeeltelijk tegenstrijdige opgaven verklaren kan. Immers, bij veldproeven kan men de voedingszouten niet zoo regelmatig en gelijkelijk toedienen als bij potproeven. Hieraan en aan het feit dat V a v i l o v (58) bij zijn veldproeven over de invloed van de bemesting van graanplanten op de roestinfectie, zeer resistente graansoorten gebruikte, kunnen waarschijnlijk zijn negatieve resultaten worden toegeschreven. Hij besluit uit een van zijn proeven, waar hij 288 k.g. NaNO_3 per ha gaf en geen verandering in resistentie zag: „Immune Sorten blieben unter allen Umständen immun.”

Boven zagen wij dus dat de uitwendige omstandigheden de aantasting van planten door parasieten kunnen beïnvloeden, maar dat dit niet het geval is wanneer men immune soorten gebruikt.

Men onderscheidt een mechanische of passieve immuniteit, waarbij bijzondere eigenschappen van bouw of groei van de plant het

binnendringen van parasieten zouden verhinderen en een physiologische of actieve immuniteit. Deze laatste immuniteit berust niet op anatomische verschillen, maar op een inwendige reactie tusschen gastheer en parasiet.

De mechanische immuniteit kan onder invloed van het milieu wel veranderen, de physiologische niet of nauwelijks.

Gaszner (10) komt op grond van zijn onderzoekingen tot de overtuiging, dat de gevoeligheid van een plant voor een bepaalde parasiet het product is van uitwendige omstandigheden en de overgeërfde wijze van reageeren van het organisme.

Hij besluit dus dat niet de dispositie als zoodanig het erfelijke kenmerk is, maar de eigenschap van het organisme om op de bepaalde uitwendige omstandigheden juist met deze dispositie te reageeren.

Ook E. Baur (2) uit zich in deze zin als volgt: „Vererbt wird immer nur eine bestimmte spezifische Art der Reaktion auf die Auszenbedingung, und was wir als äusere Eigenschaften mit unseren Sinnen wahrnehmen, ist nur das Resultat dieser Reaktion auf die zufällige Konstellation von Auszenbedingungen, unter denen das untersuchte Individuum sich gerade entwickelt hat.”

Het doel van het volgende onderzoek was nu na te gaan in hoeverre de uitwendige omstandigheden, en wel speciaal de bemesting, van invloed waren op de gevoeligheid van *Pisum sativum* voor aantasting door *Ascochyta pisi* en *Mycosphaerella pinodes*.

EIGEN ONDERZOEK.

§ 2. Methodiek.

De volgende proeven zijn alle genomen met *Pisum sativum* (var. Wonder van Amerika) op zandcultures.

Het experimenteren met planten op watercultures bracht het bezwaar met zich mee dat nu en dan een geheele cultuur zoodanig door *Pythium* werd aangetast, dat alle planten ten gevolge van wortelrot afstierven. Op zandcultures heb ik van een infectie door *Pythium* nooit last gehad. Bovendien is het werken met zandcultures minder tijdroovend, omdat het geregelde ververschen van de oplossing zooals bij watercultures noodzakelijk is, niet noodig

is, daar iedere pot direct de volle hoeveelheid voedingsstoffen krijgt. Weliswaar vervalt hierbij het voordeel der watercultures, dat men na 2—3 weken de voedingsoplossing op de oorspronkelijke samenstelling kan terugbrengen. Daar echter de watercapaciteit van de met zand gevulde potten ongeveer 4 maal het volume van een voor watercultuur gebruikt jampotje bedraagt, de proefduur daarentegen hoogstens 2 maal zoo lang is, namelijk 4—6 weken, wordt dit bezwaar practisch opgeheven.

Daar de methode, door Schaffnit & Volk toegepast (49), deugdelijk gebleken was, heb ik mij in hoofdzaak hieraan gehouden.

Ik kweekte mijn proefmateriaal in Mitscherlich-potten op een mengsel van glaszand en turfmolm. De inhoud van deze Mitscherlich-potten is $5\frac{1}{2}$ l. Onder in de bodem is een langwerpig gat, waardoor de oplossing in een daaronder staande bak kan lopen. De cultuurbodem werd geregeld nat gehouden met de in de bak opgevangen oplossing, of met water. Het glaszand, dat betrokken werd van de glasfabriek „Leerdam” werd voor het gebruik 3 maal met water goed uitgewasschen en vervolgens met 10% turf (gewichtsprocenten) vermengd om de watercapaciteit te verhoogen en om de bodem lossier te maken. Het onvermengde glaszand vormde namelijk in vochtige toestand een compacte massa, zoodat de wortels der proefplanten er slecht konden indringen.

Bij dit glaszand-turf-mengsel in de Mitscherlich-potten werden de verschillende voedingsoplossingen gebracht.

Deze oplossingen werden samengesteld volgens het onderstaande schema.

Stikstof werd toegediend als NH_4NO_3 , fosfor als $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO})_2$ en kalium als K_2SO_4 .

Bij het vaststellen van de standaardbemesting hebben Schaffnit & Volk de geringste hoeveelheid voedingsstoffen genomen, welke volgens de literatuur en eigen proeven nog een normale ontwikkeling der planten mogelijk maakte.

Neemt men de standaardhoeveelheid van een stof namelijk te hoog, dan bestaat het gevaar dat de plant spoedig die toestand bereikt heeft, waarbij niets meer van deze stof opgenomen kan worden.

De toevoeging van nog meer van dit voedingszout zou dan niet

het gewenschte doel doen bereiken, namelijk een éézijdige overbemesting, maar de plant zou beschadigd worden.

De verhouding waarin zij een bepaalde stof toevoegden was aanvankelijk 0:0,4:1:2,4, waarbij 1 de standaardhoeveelheid voorstelt. Later, toen het Schaffnit & Volk bleek dat de

Pot-nummer	Kalium	Fosfor	Stikstof	Calcium
1	standaard hoev.	stand. hoev.	stand. hoev.	stand. hoev.
2	"	"	geen	"
3	"	"	geringe hoev.	"
4	"	"	overvloedig	"
5	"	geen	stand. hoev.	"
6	"	geringe hoev.	"	"
7	"	overvloedig	"	"
8	geen	stand. hoev.	"	"
9	geringe hoev.	"	"	"
10	overvloedig	"	"	"
11	—	"	"	"
12	—	"	"	geen
13	—	"	"	geringe hoev.
14	—	"	"	stand. hoev.
				overvloedig

plant op de verschillende stoffen ook verschillend reageert, werd voor ieder van de te onderzoeken voedingszouten een aparte verhouding opgesteld.

Bij het samenstellen van de door mij gebruikte voedingsoplossingen heb ik rekening gehouden met de verhouding die zij voor de verschillende voedingszouten gebruikten.

In het bovenstaande schema diende pot no. 1 als standaardcultuur voor de proeven met stikstof, fosfor en kalium.

Bij de proeven over de invloed van calcium gebruikte ik een oplossing van eenigszins andere samenstelling, zoodat bij deze reeksen steeds een aparte standaardcultuur noodig was.

Bij de Ca-reeks werd namelijk het fosfaat niet, zooals bij de andere proeven, als calciumfosfaat toegevoegd, maar als het secundaire kaliumfosfaat. Verder was in deze proeven geen speciale toevoeging van kali-zouten noodig, aangezien dit element in het fosfaat reeds in voldoende hoeveelheid aanwezig was.

De voedingsoplossingen waren als volgt samengesteld. De getallen geven de hoeveelheid van de verschillende zouten per pot in grammen aan.

	NH_4NO_3	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	K_2SO_4
1 standaardcultuur	0,75	1,6	1,6
2 stikstof gebrek	—	1,6	1,6
3 „ gering	0,2	1,6	1,6
4 „ overvloedig	6 g. in 3 giften	1,6	1,6
5 fosfor gebrek	0,75	—	1,6
6 „ gering	0,75	0,25	1,6
7 „ overvloedig	0,75	6,3 g. in 3 giften	1,6
8 kalium gebrek	0,75	1,6	—
9 „ gering	0,75	1,6	0,2
10 „ overvloedig	0,75	1,6	4 g. in 3 giften

Verder werd bij iedere pot nog 0,5 g. MgSO_4 , 0,3 g. FeCl_3 en 5 g. CaSO_4 gevoegd. De pH van de bodem bedroeg bij alle proeven 4,9 — 5,2.

Deze pH is tamelijk laag. Dit is toe te schrijven aan het toevoegen van turf aan de bodem. s' Jacob (21) geeft aan dat de optimale groei van *Pisum sativum* bij pH 5—6 ligt. Ik heb de zuurgraad onveranderd gelaten, omdat er nieuwe stoffen in de bodem gebracht zouden zijn, indien ik een pH 5—6 had willen bereiken.

Bijstellen van de zuurgraad tijdens de proef was onnoodig, daar de pH niet meer dan $\frac{2}{10}$ eenheid veranderde.

Voor de Ca-reeks werd de oplossing als volgt samengesteld.

De getallen geven de hoeveelheid van de verschillende zouten per pot in grammen aan.

	NH_4NO_3	K_2HPO_4	CaSO_4
1 calcium gebrek	0,75	2	0
2 calcium gering	0,75	2	0,4
3 standaardcultuur	0,75	2	2
4 calcium overvloed	0,75	2	10 g. in 3 giften

Verder werd bij iedere pot nog 0,5 g. MgSO_4 en 0,3 g. FeCl_3 gevoegd. De pH van de bodem bedroeg bij deze proeven 5 — 5,2. In het glaszand-turf-mengsel, waarbij de voedingsoplossing gebracht was, werden, de gedurende een week op scherp zand gegroeide kiemplantjes, gepoot.

Het zaad werd van te voren zorgvuldig op een eventuele aantasting onderzocht en alle kiemplantjes met de geringste aanwijzing eener infectie afgekeurd.

Het bewerken van het zaad met Uspulun, sublimaat of formaline liet ik achterwege, aangezien men het op deze wijze volstrekt niet vrij maakt van *Ascochyta* of *Mycosphaerella*, daar mij bleek dat de fungus gewoonlijk te diep in het weefsel doorgedrongen was om bij een korte behandeling met het een of ander desinfectans gedood te worden terwijl een langdurige behandeling de kiemkracht van de erwt ernstig schaadt.

Wanneer de plantjes ongeveer 10 cm groot waren en 5 of meer bladeren hadden, werden ze geïnfecteerd.

Dit infecteeren kan op verschillende manieren gebeuren:

1. met een sporen suspensie, die men op de plant kan brengen
 - a. met een verstuiver
 - b. door druppels sporensuspensie met een entnaald op de bladeren te brengen.
2. door de parasiet van een reincultuur op vaste voedingsbodem in kleine stukjes op de plant over te brengen.

Brengt men de suspensie met behulp van een verstuiver op de plant, waardoor deze geheel met conidiën bedekt wordt, dan zal er bij een gevoelig exemplaar een zeer groot aantal infecties optreden.

Het bezwaar van deze methode is echter dat de druppels sporensuspensie op de bladeren en stengels van de plant te snel opdrogen, zoodat er dan in het geheel geen infectie plaats heeft. Brengt men echter met een entnaald, waaraan men een oogje gemaakt heeft, dikke druppels van een sporensuspensie op de bladeren, dan drogen deze druppels niet zoo gauw op als in het eerste geval, maar toch altijd nog te snel om zeker te zijn van een goede infectie.

Schaffnit & Volk die op deze wijze infecteerden, beschikten over een speciale apparatuur om de lucht vochtig te houden en zodoende het opdrogen van de sporensuspensie te voorkomen.

Daar ik niet over een dergelijke inrichting kon beschikken, bracht ik uit een reincultuur de parasiet in kleine stukjes op de bladeren en stengels van de voedsterplant.

Op deze wijze gelukten de infecties op gevoelige exemplaren altijd. Weliswaar krijgt men zodoende geen sterke aantasting, maar het doel, namelijk het verkrijgen van verschil in aantasting bij planten die verschillend besmet zijn, wordt zeer goed bereikt.

De Mitscherlich-potten bevatten elk 5—7 erwtenplantjes.

Op elk plantje bracht ik 5 stukjes van een aan blokjes gesneden, gelijkmatig ontwikkelde reincultuur van de parasiet.

Deze stukjes kleefde ik op de bladeren, op de stengels en tusschen de blaadjes van de eindknop.

De planten werden nat gehouden door ze geregeld met een verstuiver te besproeien.

Na 5—7 dagen bleek dan of de infecties gelukt waren; ik liet echter de planten nog eenige tijd doorgroeien om de parasiet in de gelegenheid te stellen zich door secundaire infectie nog verder uit te breiden. Deze secundaire infectie was alleen mogelijk doordat de planten rijkelijk besproeid werden, zoodat de sporen met druppels water op andere bladeren konden spatten.

Na verloop van tijd werden de vlekken, zoowel op de stengels als op de bladeren geteld en het gemiddelde aantal blad- en stengelvlekken per plant berekend. Hiertoe ben ik wel gerechtigd aangezien het aantal bladeren en stengels der planten uit de verschillende potten ten naastebij gelijk was, zoodat de infectiekans voor alle planten gelijk was.

§ 3. Invloed van de N-bemesting.

Uit de onderstaande tabellen blijkt de groote invloed van stikstofbemesting op de mogelijkheid van infectie door *Ascochyta pisi* en *Mycosphaerella pinodes*. De proeven b en c werden in de kas genomen, terwijl bij proef a de potten onder een glazen afdak in de buitenlucht stonden. In beide gevallen werd een goede infectie verkregen.

Mycosphaerella bleek over het algemeen een krachtiger parasiet te zijn dan *Ascochyta*, daar de eerste soms zelfs aan N-gebrek

a. parasiet: *Ascochyta pisi*.
geïnfecteerd 2 Juni.
proefduur 14 dagen.

N-gebrek	aantal planten		N-gering	aantal planten		stand. cultuur	aantal planten		N-overvl.	aantal planten	
		gemiddeld			gemiddeld			gemiddeld			gemiddeld
bladvl. 6	5	1,2	bl.vl. 9	5	1,8	bl.vl. 29	5	5,8	bl.vl. 44	5	8,8
stengelvl. 0	5	0	st.vl. 2	5	0,4	st.vl. 7	5	1,4	st.vl. 13	5	2,6

b. parasiet: *Ascochyta pisi*.
geïnfecteerd 20 October.
proefduur 20 dagen.

N-gebrek	aantal planten		N-gering	aantal planten		stand. cultuur	aantal planten		N-overvl.	aantal planten	
		gemiddeld			gemiddeld			gemiddeld			gemiddeld
bladvl. 5	5	1	bl.vl. 7	5	1,4	bl.vl. 26	5	5,2	bl.vl. 45	5	9
stengelvl. 0	5	0	st.vl. 0	5	0	st.vl. 4	5	0,8	st.vl. 11	5	2,2

c. parasiet: *Mycosphaerella pinodes*.
geïnfecteerd 27 October.
proefduur 13 dagen.

N-gebrek	aantal planten		N-gering	aantal planten		stand. cultuur	aantal planten		N-overvl.	aantal planten	
		gemiddeld			gemiddeld			gemiddeld			gemiddeld
bladvl. 8	5	1,6	bl.vl. 10	5	2	bl.vl. 24	5	4,8	bl.vl. 44	5	8,2
stengelvl. 0	5	0	st.vl. 1	5	0,2	st.vl. 5	5	1	st.vl. 16	5	3,2

lijdende planten nog vrij sterk kon aantasten. Ook is de incubatietijd voor *Mycosphaerella pinodes* korter dan voor *Ascochyta pisi*. Bij het infecteeren met de eerste zag ik vaak na 3 dagen al verkleuringen optreden ten teken dat de infectie gelukt was, terwijl er bij infecties met *Ascochyta pisi* minstens 5 dagen verliepen eer er een vlekje verscheen.

§ 4. Invloed van de K-bemesting.

a. parasiet: *Ascochyta pisi*.
geïnfecteerd 2 Juni.
proefduur 14 dagen.

K-gebrek	aantal planten		gemiddeld	K-gering		gemiddeld	stand. cultuur	aantal planten		gemiddeld	K-overvl.	aantal planten		gemiddeld
bladvl. 46	5	9,2		bladvl. 42	5	8,4	bladvl. 29	5	5,8		bladvl. 9	5	1,8	
stengelvl. 16	5	3,2		st.vl. 14	5	2,8	st.vl. 7	5	1,4		st.vl. 2	5	0,4	

b. parasiet: *Ascochyta pisi*.
geïnfecteerd 20 October.
proefduur 20 dagen.

K-gebrek	aantal planten		gemiddeld	K-gering		gemiddeld	stand. cultuur	aantal planten		gemiddeld	K-overvl.	aantal planten		gemiddeld
bladvl. 43	5	8,6		bladvl. 33	5	6,6	bladvl. 26	5	5,2		bladvl. 8	5	1,6	
stengelvl. 10	5	2		st.vl. 9	5	1,8	st.vl. 4	5	0,8		st.vl. 1	5	0,2	

Daar het gedurende de volgende proeven, die in de buitenlucht onder een glazen afdak genomen werden, dagelijks regende, zoodat de atmosfeer zeer vochtig was, waren de omstandigheden voor de uitbreiding van de parasiet zeer gunstig. De proefplanten waren dan ook op 20 Augustus zoo sterk aangetast dat het tellen van de afzonderlijke vlekken onmogelijk was. Ik heb daarom de aantasting uitgedrukt in:

1. het aantal afgestorven blaadjes.
2. „ „ sterk aangetaste blaadjes (meer dan 10 vlekken).
3. „ „ zwak aangetaste blaadjes (minder dan 10 vlekken).
4. „ „ stengelvlekken.
5. „ „ geheel aangetaste internodiën.

c. parasiet: *Mycosphaerella pinodes*.
geïnfecteerd 5 Augustus.
proefduur 15 dagen.

aard der aantasting	K-gebrek	aantal planten	gemiddeld	K-gering	aantal planten	gemiddeld	stand cultuur	aantal planten	gemiddeld	K-overvl.	aantal planten	gemiddeld
1	28	5	5,8	14	7	2	4	5	0,8	4	6	0,6
2	59	5	11,8	60	7	8,6	26	5	5,2	15	6	2,5
3	28	5	5,6	36	7	5,1	15	5	3	11	6	1,8
4	7	5	1,4	11	7	1,3	4	5	0,8	3	6	0,5
5	25	5	5	21	7	3	10	5	2	8	6	1,3

In tegenstelling met de invloed van stikstof blijkt dus kalibemesting de gevoeligheid van de erwt voor aantasting door *Ascochyta* en *Mycosphaerella* te verminderen.

Het verschil in aantasting tusschen planten zonder kalium en die met een geringe kalibemesting is betrekkelijk gering. De planten uit de standaardcultuur vertoonen al een belangrijk mindere

d. parasiet: *Ascochyta pinodella*.
geïnfecteerd 5 Augustus.
proefduur 15 dagen.

aard der aantasting	K-gebrek	aantal planten	gemiddeld	K-gering	aantal planten	gemiddeld	K-overvl.	aantal planten	gemiddeld
1	31	7	4,4	18	6	3	0	4	0
2	80	7	11,4	68	6	11,3	21	4	5,2
3	23	7	3,3	18	6	3	9	4	2,2
4	11	7	1,6	7	6	1,2	3	4	0,7
5	12	7	1,7	6	6	1	2	4	0,5

aantasting, terwijl de infectie van de planten met overvloedige K-bemesting, vergeleken met de andere, gering te noemen is.

§ 5. Invloed van de P-bemesting.

a. parasiet: *Ascochyta pisi*.
geïnfecteerd 2 Juni.
proefduur 14 dagen.

P-gebrek	aantal planten	gemiddeld	P-gering	aantal planten	gemiddeld	stand. cultuur	aantal planten	gemiddeld	P-overvl.	aantal planten	gemiddeld
bladvl. 10	5	2	bl.vl. 15	5	3	bl.vl. 29	5	5,8	bl.vl. 49	5	9,8
stengelvl. 2	5	0,4	st.vl. 3	5	0,6	st.vl. 7	5	1,4	st.vl. 16	5	3,2

b. parasiet: *Ascochyta pisi*.
geïnfecteerd 20 October.
proefduur 19 dagen.

P-gebrek	aantal planten		P-gering	aantal planten		stand. cultuur	aantal planten		P-overvl.	aantal planten	
		gemiddeld			gemiddeld			gemiddeld			gemiddeld
bladvl. 8	5	1,6	bl.vl 11	5	2,2	bl.vl. 26	5	5,2	bl.vl. 45	5	9
stengelvl. 0	5	0	st.vl. 2	5	0,4	st.vl. 4	5	0,8	st.vl. 13	5	2,6

c. parasiet: *Mycosphaerella pinodes*.
geïnfecteerd 5 Augustus.
proefduur 14 dagen.

Evenals bij proef 4 c., welke in dezelfde tijd genomen werd, heb ik de mate van aantasting niet uitgedrukt in het aantal blad- en stengelvlekken maar in:

1. het aantal afgestorven bladeren.
2. " " sterk aangetaste bladeren (meer dan 10 vlekken).
3. " " zwak " " (minder dan 10 vlekken).
4. " " afzonderlijke stengelvlekken.
5. " " geheel aangetaste internodiën.

Het resultaat van proef 5 c is in de onderstaande tabel weer-gegeven.

aard der aantasting	P-gebrek		P-gering	aantal planten		stand. cultuur	aantal planten		P-overvl.	aantal planten	
		gemiddeld			gemiddeld			gemiddeld			gemiddeld
1	2	7 0,3	3	7	0,4	8	7	1,1	15	6	2,5
2	42	7 6	43	7	6,3	64	7	9,1	65	6	11
3	23	7 3,3	26	7	3,9	29	7	4,1	29	6	5
4	4	7 0,6	6	7	0,8	8	7	1,1	11	6	2
5	7	7 1	9	7	1,3	14	7	2	26	6	4,3

De invloed van de fosforbemesting blijkt duidelijk uit bovenstaande tabellen. Schaffnit & Volk vonden eveneens een dergelijke invloed door fosforbemesting. Evenwel kregen zij bij planten, welke overvloedig met fosfor waren bemest, weer een eenigszins verhoogde resistentie, hetgeen zij toeschreven aan het feit, dat bij de, in verhouding tot de hoeveelheid N, overvloedige K- en P-voeding, gemakkelijk stikstofgebrek optreedt.

Ik heb deze resistentie-verhogende invloed niet kunnen waarnemen, hoewel ik vergeleken met de proeven van Schaffnit & Volk, in verhouding dezelfde hoeveelheid fosfor gebruikte.

De gevoeligheid van planten met overvloedige P-bemesting is weliswaar niet veel grooter dan van de planten uit de standaardcultuur, in ieder geval zijn zij gevoeliger en is er geen sprake van een verhoging van de resistentie.

§ 6. Invloed van de Ca-bemesting.

Uit de volgende proeven ziet men dat calcium, indien het in groote hoeveelheid in de bodem aanwezig is, de gevoeligheid van de erwten voor een aantasting door *Ascochyta* en *Mycosphaerella* verhoogt.

Dit behoeft echter niet een directe invloed van het calcium te zijn. Uit de proeven van N e m e c & G r a c a n i n (43) bleek n.l. dat wanneer aan een kalkarme bodem CaCO_3 werd toegevoegd, de resorptie van P en K door de plant werd verhoogd.

Bovendien kan volgens G a s z n e r & H a s s e b r a u k fosforzuur de gevoeligheid van de plant voor parasieten verhogen en wel des te sterker, naarmate meer kalium aanwezig is.

Het is dus zeer goed mogelijk dat in de volgende proeven door de toevoeging van CaSO_4 een verhoogde resorptie van P en K optrad, waaraan dan de, door G a s z n e r & H a s s e b r a u k geconstateerde, grootere gevoeligheid van de planten voor een aantasting door parasieten kan worden toegeschreven.

a. parasiet: *Ascochyta pisi*.
geïnfecteerd 2 Juni.
proefduur 14 dagen.

Ca-gebrek	aantal planten		gemiddeld	Ca-gering		gemiddeld	stand. cultuur	aantal planten		gemiddeld	Ca-overvl.	aantal planten		gemiddeld
bladvl. 15	5	3		bl.vl. 13	4	3,2	bl.vl. 27	5	5,4		bl.vl. 39	5	7,8	
stengelvl. 5	5	1		st.vl. 5	4	1,2	st.vl. 11	5	2,2		st.vl. 14	5	2,8	

b. parasiet: *Ascochyta pisi*.
geïnfecteerd 25 September.
proefduur 13 dagen.

Ca-gebrek	aantal planten		gemiddeld	Ca-gering		gemiddeld	stand. cultuur	aantal planten		gemiddeld	Ca-overvl.	aantal planten		gemiddeld
bladvl. 10	4	2,5		bl.vl. 13	5	2,6	bl.vl. 25	5	5		bl.vl. 38	5	7,6	
stengelvl. 3	4	0,7		st.vl. 4	5	0,8	st.vl. 7	5	1,4		st.vl. 14	5	2,8	

c. parasiet: *Mycosphaerella pinodes*.
geïnfecteerd 28 October.
proefduur 27 dagen.

Ca-gebrek	aantal planten		gemiddeld	Ca-gering		gemiddeld	stand. cultuur	aantal planten		gemiddeld	Ca-overvl.	aantal planten		gemiddeld
bladvl. 11	5	2,2		bl.vl. 16	5	3,2	bl.vl. 29	5	5,8		bl.vl. 39	5	7,8	
stengelvl. 0	5	0		st.vl. 0	5	0	st.vl. 5	5	1		st.vl. 10	5	2	

§ 7. Conclusies.

Uit de voorgaande proeven mogen wij besluiten dat de voeding van *Pisum sativum* van duidelijke invloed is op de infectie door *Ascochyta pisi*, *Ascochyta pinodella*, en *Mycosphaerella pinodes*.

Het duidelijkst is de invloed van stikstof- en kalibemesting. Stikstof vermeerderd de infectiekans naarmate zij in grootere hoeveelheid in de bodem aanwezig is. Kalium vertoont een tegenovergestelde werking; hoe meer kali er in de bodem aanwezig is, des te geringer is de aantasting van de voedsterplant. De bevinding van Gaszner & Hassebrauk dat planten zonder kali resister waren dan planten met weinig kali (zie pag. 45), gaat blijkbaar niet op voor *Pisum sativum*; steeds werden de planten, die een totaal gebrek aan kalium hadden, sterker aangetast dan die welke een geringe hoeveelheid kali tot hun beschikking hadden. Calcium en fosfor verhoogden beide de gevoeligheid van de erwt voor aantasting door *Ascochyta pisi* en *Mycosphaerella pinodes*. De bemesting van de voedsterplant heeft bij al deze proeven weinig invloed op het fructificeeren van de parasiet. Slechts bij algeheele afwezigheid van stikstof werden uitsluitend steriele bladplekken gevormd. Nimmer waren op bladplekken uit deze reeks pycniden te vinden. In alle andere gevallen waren steeds na ongeveer 14 dagen op de bladplekken pycniden te zien.

HOOFDSTUK IV

SAMENVATTING

De vlekziekten van de erwt worden veroorzaakt door een drietal fungi n.l. *Ascochyta pisi* Lib., *Ascochyta pinodella* Jones en *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & Blox.) Stone, die ieder een verschillend ziektebeeld geven.

Een beschrijving van ieder van deze fungi afzonderlijk is gegeven, benevens het daarbij behorende ziektebeeld.

Wat de physiologie van de fungi in reincultuur betreft werd het volgende gevonden: ammoniumzouten zijn een betere stikstofbron dan nitraten; ook vormt *A. pisi* met NH_4Cl als N-bron meer drooggewicht dan op asparagine of pepton. Nitriet blijkt een goede stikstofbron te zijn, mits de voedingsoplossing basisch reageert.

Worden ammoniumzouten van sterke zuren als stikstofbron gebezigd, dan daalt de zuurgraad van de voedingsoplossing tot $\text{pH} \pm 3,2$; bij een lagere zuurgraad is geen groei mogelijk. Wordt KNO_3 als stikstofbron gebruikt dan stijgt de pH van de voedingsoplossing tot ± 8 .

De groei van *A. pisi* werd nagegaan bij een zuurgraad van pH 3 tot pH 9.

Bij $\text{pH} \pm 3,2$ vormt *A. pisi* geen normale hyphen, maar onregelmatige, groengekleurde klompjes, bestaande uit dikke, afgeronde cellen, welke aan de oppervlakte van de voedingsoplossing drijven.

Bij hogere pH is de groei goed; er worden normale hyphen gevormd, die aan de oppervlakte van de voedingsoplossing een gesloten dek vormen.

Als koolstofbron komen voor *A. pisi* in aanmerking: dextrine,

amylum solubile, glucose en saccharose; de schimmel groeit minder goed op galactose, lactose en gummi arabicum. Cellulose in de vorm van fijn verdeeld filtreerpapier wordt niet aangetast.

Magnesium is noodzakelijk voor de groei van *A. pisi*. Laat men Mg uit de voedingsoplossing weg dan is er nagenoeg geen groei te bespeuren, terwijl een hoeveelheid MgSO_4 van 0,1 g per liter reeds voldoende is om een normale hoeveelheid schimmelsubstantie te doen produceeren.

Zonder fosfor of zonder zwavel ontwikkelen de cultures zich slecht. Er worden dunne hyphen gevormd, die vele oliedruppels bevatten.

A. pisi kan zeer hoge fosfaatconcentraties verdragen; in een voedingsoplossing die 10% fosfaat bevatte was nog groei mogelijk.

Calcium blijkt een stimuleerende werking op de groei van *A. pisi* uit te oefenen. Geeft men inplaats van KNO_3 als stikstofbron een aequivalente hoeveelheid $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ dan wordt er belangrijk meer schimmelsubstantie gevormd.

Het pH optimum is niet alleen afhankelijk van de stikstofbron die gebezigd wordt, maar ook van de koolstofbron. Bij KNO_3 -saccharose ligt het optimum tusschen pH 4 en pH 4,9, terwijl bij NH_4Cl -saccharose het optimum tusschen pH 7,1 en pH 7,8 ligt.

Wordt nu de saccharose vervangen door dextrine dan verschuift het optimum naar de zure kant. Voor KNO_3 -dextrine ligt het optimum nu bij pH 6,9 en voor NH_4Cl -dextrine bij pH $\pm$ 8.

De invloed van de bemesting van *Pisum sativum* op de aantasting door *A. pisi*, *M. pinodes* en *A. pinodella* is onderzocht. Stikstof-, fosfor- en calciumbemesting verhoogden de gevoeligheid van de voedsterplant voor aantasting door de bovengenoemde parasieten terwijl kaliumbemesting een resistentieverhogende werking vertoont.

Op het fructificeeren van de parasieten heeft de bemesting van de gastheer weinig invloed. Slechts bij totale afwezigheid van stikstof in de bodem werden op de bladvlekken geen pycniden gevormd.

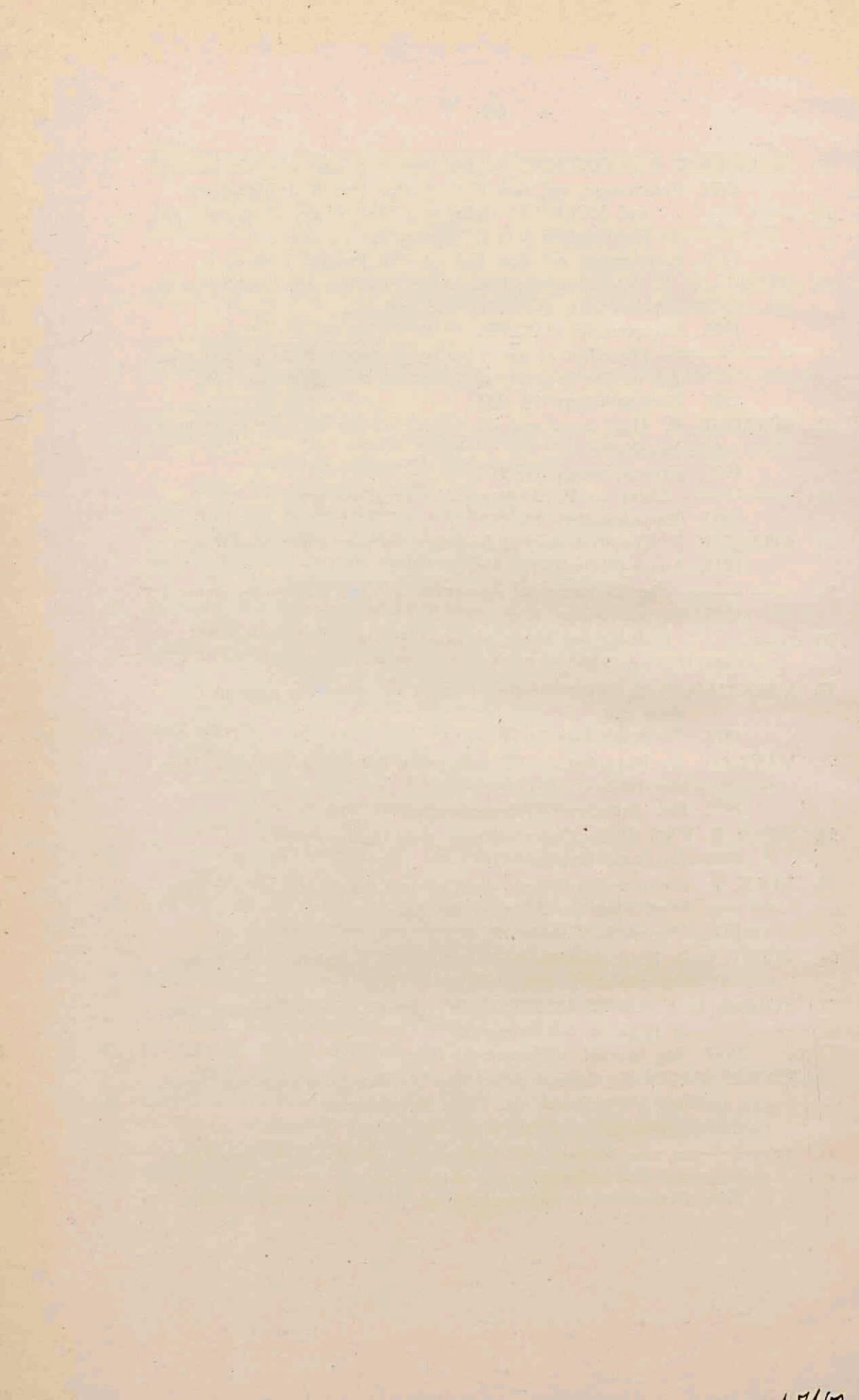
LITERATUURLIJST

1. ATKINSON, G. F. The perfect stage of the *Ascochyta* on the hairy vetch.
1912, Bot. Gazette 54, 537.
2. BAUR, E. Einführung in die experimentelle Vererbungslehre.
1922.
3. BOLTSCHAUER, H. Blattflecken der Bohne.
1891, Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. 1, 136.
4. BRENNER, W. Die Stickstoffernährung der Schimmelpilze.
1914, Centralblatt f. Bakteriologie. 40, 555.
5. BRUCH, P. Zur physiologischen Bedeutung des Calciums in der Pflanze.
1902, Landw. Jahrb. 30, 127.
6. COUPIN, H. Influence du calcium sur le *Penicillium glaucum*.
1927, Comptes rendus Acad. Sc. Paris. 184, 760.
7. DICKSON, J. G. Influence of the soil temperature and moisture on the development of the seedling blight of wheat and corn caused by *Gibberella*.
1923, Journ. Agric. Res. 23, 837.
8. DRECHSLER, CH. Root-rot of peas in the Middle-Atlantic States in 1924.
1925, Phytopathology 15, 100.
9. EISENMENGER, W. S. Toxicity, additive effects and antagonism of salt solutions as indicated by the growth of wheat roots.
1929, Bot. Centralblatt 14, 331.
10. GASZNER, G. Untersuchungen über die Sortenempfindlichkeit von Getreidepflanzen gegen Rostpilze.
1919, Centralblatt f. Bakteriologie 49, 185.
11. ——— Die Frage der Rostanfälligkeit als ernährungsphysiologisches Problem.
1927, Angewandte Botanik 9, 531.
12. ——— und HASSEBRAUK, K. Untersuchungen über die Beziehung zwischen Mineralsalzer ernährung und Verhalten der Getreidepflanzen gegen Rost.
1931, Phytopathol. Zeitschr. 3, 535.
13. GERHARDT, K. Ueber das Auftreten der Schlauchfrüchte von *Oidium Tückeri* am Weinstock.
1920, Berichte d.d. Bot. Ges. 38, 156.
14. GILCHRIST, G. G. The nature of resistance to footrot caused by *Ascochyta* sp. and some other fungi in the epicotyl of the pea.
1926, Phytopathology 16, 269.

15. HASSEBRAUK, K. Ueber die Abhängigkeit der Rostinfektion von der Mineralsalzernährung der Getreidepflanze.
1930, Angewandte Botanik 12, 23.
16. HEALD, F. D. Manual of plant diseases.
1926.
17. HILTNER, L. Ueber die durch *Ascochyta pisi* Lib. hervorgerufene Wurzelkrankheit der Erbsen.
1895, Centralblatt f. Bakteriologie 1, 881.
18. HOAGLAND, D. R. and DAVIS, A. R. The composition of the cell sap of the plant in relation to the absorption of ions.
1923, Journal of general physiology 5, 629.
19. HOCHAPFEL, H. H. Untersuchungen über die C- und N-Quellen einiger Fusarien.
1925, Centralblatt f. Bakteriologie 64, 174.
20. HORI, S. Haben die höheren Pilze Kalk nötig?
1910, Flora 101, 447.
21. S' JACOB, J. C. Anorganische beschadigingen bij *Pisum sativum* en *Phaseolus vulgaris*.
1927, dissertatie Utrecht.
- 21a. JARIUS, M. Untersuchungen über *Ascochyta pisi* bei parasitischer und saprophyter Ernährung.
1896, Bibl. Bot. Heft 34, 1.
22. JONES, F. R. *Pythium* as a causal factor in „pea blight”.
1920, Phytopathology 10, 67.
23. ————— and LINFORD, M. B. Pea disease survey in Wisconsin.
1925, Agr. Exp. Sta. of the Univ. of Wisc. Res. Bull. 64.
24. ————— and VAUGHAN, R. E. Anthracnose of the garden pea.
1921, Phytopathology 11, 500.
25. JONES, L. K. Studies of the nature and control of blight, leaf- and pot-spot and footrot of peas caused by species of *Ascochyta*.
1927, Geneva Agr. Exp. Sta. bull. 547.
26. ————— The relation of *Mycosphaerella pinodes* to *Ascochyta* blight of peas.
1927, Phytopathology 17, 44.
27. KERLING, L. C. P. De anatomische bouw van bladplekken.
1928, dissertatie Utrecht.
28. KLEBAHN, H. Untersuchungen über einige Fungi imperfecti und die zugehörigen Ascomyceten-formen.
1905.
29. KLOTZ, L. J. Some aspects of nitrogen metabolism in fungi.
1923, Annals Missouri Bot. Gardens, 10, 299.
30. KOTTE, W. Ueber den Einfluss der H-ionen-Konzentration auf das Wachstum einiger phytopathogener Bakterien.
1930, Phytopathol. Zeitschr. 2, 443.

31. KRÜGER, F. Ungewöhnliches Auftreten von *Ascochyta pisi* Lib. an Erbsenpflanzen.
1895, Centralblatt f. Bakteriologie 1, 620.
32. LAURITZEN, J. I. The relation of temperature and humidity to infection by certain fungi.
1919, Phytopathology 9, 7.
33. LEACH, J. G. The effect of grafting on resistance and susceptibility of beans to *Colletotrichum Lindemuthianum*.
1929, Phytopathology 19, 875.
34. LINFORD, M. B. and SPRAGUE, R. Species of *Ascochyta* parasitic on the pea.
1927, Phytopathology 17, 381.
35. LOEWING, W. F. Calcium, potassium and iron balance in certain crop plants in relation to their metabolism.
1930, Bot. Centralblatt 16, 268.
36. LUDWIG, O. Untersuchungen an *Ascochyta pisi* Lib.
1928, Beiträge zur Biol. der Pflanzen 16, 465.
37. MELHUS, I. E. *Septoria pisi* in relation to pea blight.
1913, Phytopathology 3, 51.
38. MES, M. G. Fysiologische Siektesymptomen van tabak.
1930, dissertatie Utrecht.
39. METZ, O. Ueber Wachstum und Farbstoffbildung einiger Pilze unter dem Einfluss von Eisen, Zink und Kupfer.
1930, Archiv für Mikrobiologie 1, 197.
40. MEVIUS, W. Kalziumion und Wurzelwachstum.
1927, Jahrb. Wiss. Bot. 66, 183.
41. ——— Die Wirkung der Ammoniumsalze in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. I.
1928, Planta 6, 379.
42. ——— und ENGEL, H. Die Wirkung der Ammoniumsalze etc. II.
1930, Planta, 9, 1.
43. NEMEC, N. und GRACANIN, M. Ueber den Einfluss des Kalkes auf die Resorption der Phosphorsäure und des Kali aus dem Boden.
1930, Zeitschr. f. Pflanzenernährung 17, 232.
44. RATSCHLAG, H. Zur Spezialisierung der auf *Vicia faba* parasitierende *Ascochyta*.
1930, Phytopathologische Zeitschr. 2, 493.
45. RAULIN, J. Etudes chimiques sur la vegetation.
1869, Annales Sc. Nat. Bot. Ser. V T. XI.
46. RIPPEL, A. und LUDWIG, O. Ueber den Einfluss des Ernährungszustandes der Gerste auf den Befall durch *Pleospora trichostoma*.
1927, Angewandte Botanik 9, 541.
47. RUBINSTEIN, D. L. Das Problem des physiologischen Ionenantagonismus.
1928, Planta 4, 259.

48. SCHAFFNIT, E. und BÖNING, K. Die Brennfleckenkrankheit der Bohnen.
1925, Forschungen auf dem Geb. d. Pfl. krankh. 1 Mitteilung.
49. ————— und VOLK, A. Ueber den Einfluss der Ernährung auf
die Empfänglichkeit der Pflanzen für Parasiten.
1927, Forschungen auf dem Geb. d. Pfl. krankh. Heft 3, 1.
50. SIDERIS, C. P. Studies on the behavior of *Fusarium cromeophthoron* in
carbohydrates, glucosides, proteins, etc.
1925, *Phytopathology* 15, 129.
51. ————— The effect of the H-ion concentration of the culture solu-
tion on the behavior of *Fusarium cromeophthoron*, etc.
1929, *Phytopathology* 19, 233.
52. SPRAGUE, R. Host range and life history studies of some leguminous
Ascochytae.
1929, *Phytopathology* 19, 917.
53. ————— Notes on *Phyllosticta rabiei* on Chick-pea.
1930, *Phytopathology* 20, 591.
54. STONE, R. E. The life history of *Ascochyta* on some leguminous plants 1.
1912, *Annales Mycol.* 10, 564.
55. ————— The life history of *Ascochyta* on some leguminous plants 2.
1915, *Phytopathology* 5, 4.
56. ————— Root-rot and blight of canning peas.
1924, *Phytopathology* 14, 348.
57. VAUGHAN, R. E. *Mycosphaerella pinodes* the ascigerous stage of *Asco-*
chyta pisi.
1913, *Phytopathology* 3, 71.
58. VAVILOV, N. Immunität der Pflanzen gegen Infektionskrankheiten. Mos-
kau 1919.
1922, *Ref. Zeitschr. f. Pflanzenkrankh.* 32, 115.
59. VEEN, R. VAN DER. Onderzoekingen over tracheomycosen.
1930, dissertatie Utrecht.
60. VOLK, A. Einflüsse des Bodens, der Luft und des Lichtes auf die Emp-
fänglichkeit der Pflanzen für Krankheiten.
1931, *Phytopath. Zeitschr.* 3, 1.
61. WENT, F. A. F. C. *Monilia sitophila* Sacc. ein technischer Pilz Javas.
1901, *Centralblatt f. Bakteriologie* 7, 591.
62. YOUNG, H. C. and BENNETT, C. W. Growth of some parasitic fungi
in synthetic culture media.
1922, *Am. Journal of Botany* 9, 459.
63. ZIMMERMANN, A. Sammelreferate über die Beziehung zwischen Parasit
und Wirtspflanze. no. 1. die Erysiphaceen.
1925, *Centralblatt f. Bakteriologie* 63, 106.
64. ————— Sammelreferate über die Beziehung zwischen Parasit
und Wirtspflanze. no. 2. die Uredineen.
1925, *Centralblatt f. Bakteriologie* 65, 311.



STELLINGEN

I.

Ten onrechte neemt Stone aan dat *Mycosphaerella pinodes* het ascus-stadium van *Ascochyta pisi* is.

Phytopathology 1915.

II.

Door de onderzoeken van Johnson en Ogden is voldoende aangetoond dat tabaksvirus in de bodem kan overwinteren.

Wisconsin. Res. Bull. 95, 1929.

III.

De opvatting dat calcium voor de groei van schimmels onnoodig is, is onjuist.

IV.

Het virus van de tomatenmozaïekziekte kan niet buiten de voedsierplant voortgekweekt worden.

Bot. Gazette 1926.

V.

Kostytschew's algemeene bezwaren tegen de assimilatieproeven, die tot nu toe genomen zijn, zijn ongegrond.

Planta 1931.

VI.

Uit de proeven van Brauner en Bünning mag niet geconcludeerd worden dat elektrische verschijnselen bij de geotropische perceptie een rol spelen.

Ber. d. Deutschen Bot. Ges. 1931.

VII.

Door Cuthbertson en Tompsett is bewezen dat pepsine op splitsingsproducten van eiwit een synthetiseerende werking kan uitoefenen.

Biochemical Journal 1931.

VIII.

De door het klimaat bepaalde boomgrens behoort ook het „Legföhrengbiet“ te omvatten.

Mitteilungen d. Deutschen Dendrolog. Ges. 1931.

