



Invloed van de voeding op de virulentie van schimmels

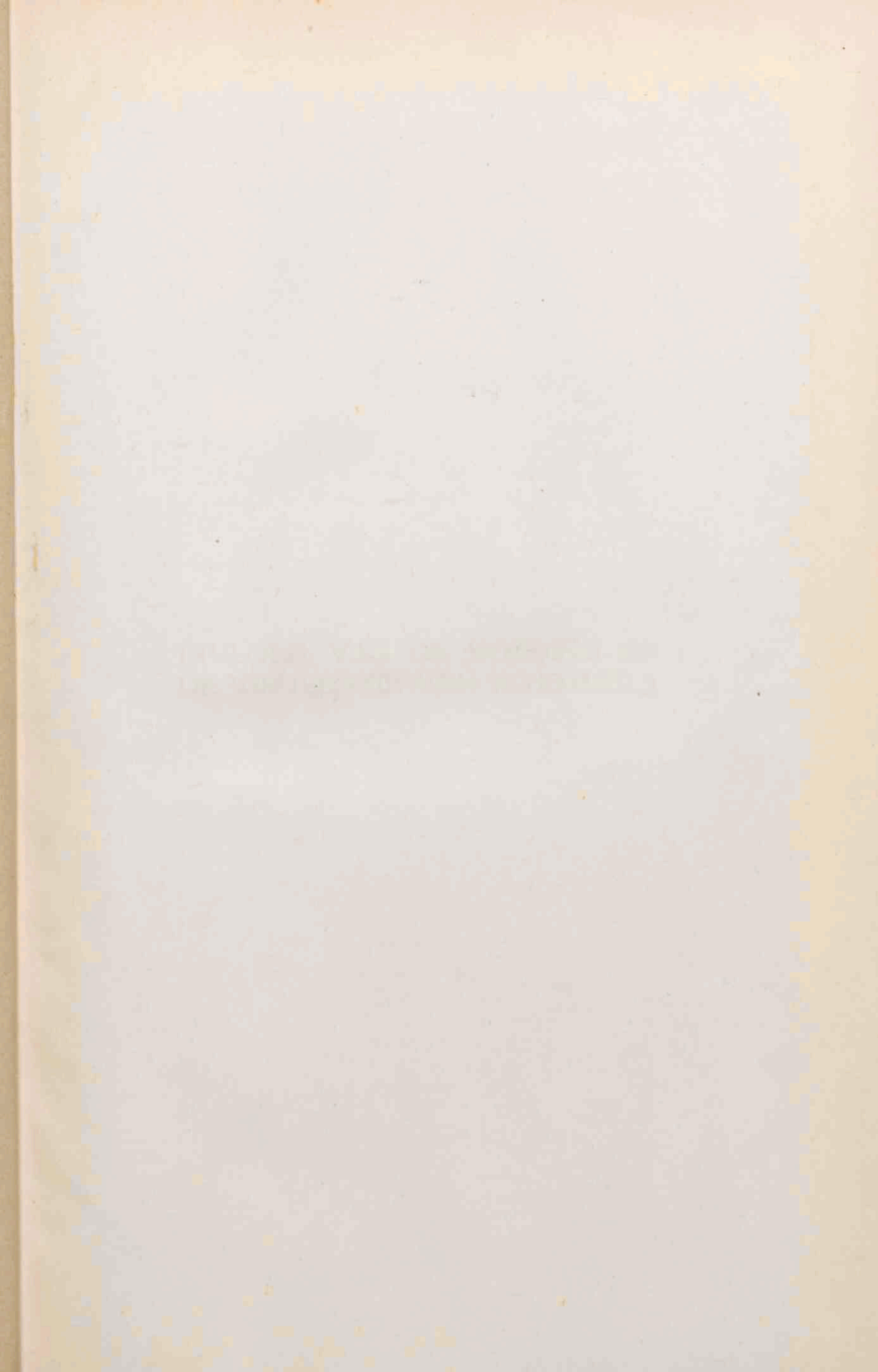
<https://hdl.handle.net/1874/313737>

A. que. 192. 1933

INVLOED VAN DE VOEDING OP
DE VIRULENTIE VAN SCHIMMELS

Diss.
Utrecht
1933.

G. E. BUNSCHOTEN



INVLOED VAN DE VOEDING OP DE VIRULENTIE VAN SCHIMMELS

PROEFSCHRIFT

INVLOED VAN DE VOEDING OP
DE VIRULENTIE VAN SCHIMMELS

INVLOED VAN DE VOEDING OP DE VIRULENTIE VAN SCHIMMELS

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. C. G. N. DE VOOYS, HOOGLEERAAR IN
DE FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJS-
BEGEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN
SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE
BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER
WIS- EN NATUURKUNDE, TE VERDEDIGEN
OP MAANDAG 3 JULI 1933 DES NAMIDDAGS
TE VIER UUR

DOOR

GERHARDA ENGBERTA
BUNSCHOTEN

GEBOREN TE UTRECHT

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN MIJN MOEDER

Bij het voltooien van mijn proefschrift, maak ik gaarne van de gewoonte gebruik, allen te bedanken, die tot mijn wetenschappelijke opleiding hebben bijgedragen.

Hooggeleerde *W e s t e r d i j k*, Hooggeachte Promotor, U vooral ben ik zeer veel dank verschuldigd. De wijze, waarop U ons in de Phytopathologie inwijdt, wekte mijn liefde voor Uw vak op en werd beslissend voor de richting in mijn verdere studie. Dat ik nog verder onder Uw leiding in Baarn kan blijven werken, stel ik zeer op prijs. De jaren, die ik in Baarn doorbracht, zullen steeds tot de aangenaamste herinneringen van mijn studietijd blijven behooren.

Hooggeleerde *W e n t*, het is mij een groot voorrecht onder Uw leiding de Plantenphysiologie te hebben mogen bestudeeren. Uw persoonlijke belangstelling voor de studenten heeft mij altijd bijzonder getroffen.

Hooggeleerde *J o r d a n*, voor Uw boeiende colleges en practica zeg ik U hartelijk dank.

Hooggeleerde *P u l l e* en *R u t t e n*, aan Uw colleges, practica en niet het minst aan de leerrijke excursies denk ik steeds met genoegen terug.

Hooggeleerde *N i e r s t r a s z* en de *B u s s y*, ook U dank ik voor Uw interessante colleges.

U, Zeergeachte *v a n L u i j k*, dank ik voor Uw groote hulpvaardigheid. De wijze waarop U mij steeds met raad en daad bijstond, zal ik niet licht vergeten.

Den Heer *J. G o o s s e n*, oud-hortulanus van het Cantonspark, dank ik voor zijn hulpvaardigheid.

Verder een woord van dank aan allen, die mij op eenige wijze behulpzaam waren bij het samenstellen van dit proefschrift.

Tenslotte rest mij nog een woord van dank aan het Bestuur van de Stichting „*Willie Commelin Scholten*” voor de gastvrijheid, welke ik in haar laboratorium mocht genieten.

INHOUD

	blz.
INLEIDING	1
LITERATUUROVERZICHT	3
Deel I. ONDERZOEKINGEN BIJ SCLEROTINIA SCLEROTIORUM (LIB.) MASSEE	9
Hoofdstuk I. Morphologie en Biologie van de schimmel.	9
Hoofdstuk II. Onderzoekingen over de in- vloed van de voeding van de schimmel op haar virulentie	15
1. Methode van onderzoek	15
2. Invloed van eenige natuurlijke en synthetische voe- dingsbodems	20
3. Invloed van de stikstofvoeding van de schimmel	26
a. literatuur	26
b. eigen proeven	28
c. verandering van de pH	36
4. Invloed van de koolstofvoeding van de schimmel	38
a. literatuur	38
b. eigen proeven	39
Deel II. ONDERZOEKINGEN BIJ RHIZOCTONIA SOLANI KÜHN	44
Hoofdstuk I. Morphologie en Biologie van de schimmel.	44
Hoofdstuk II. Invloed van de voeding van de schimmel op haar virulentie	48
1. Methode van onderzoek	48
2. Invloed van eenige natuurlijke en synthetische voe- dingsbodems	49
3. Invloed van de stikstofvoeding van de schimmel	51
4. Invloed van de koolstofvoeding van de schimmel	53
SAMENVATTING	57
LITERATUURLIJST	59

INLEIDING

Wanneer men voor infectieproeven gebruik maakt van rein-cultures van schimmels, dan heeft men in het algemeen te maken met schimmels, die reeds eenige tijd op een voedingsbodem gekweekt worden, vóórdat men er de planten mee infecteert. Nu zijn sommige onderzoekers de meening toegedaan, dat schimmels door de kunstmatige cultuur in virulentie achteruitgaan, of zelfs haar virulentie geheel verliezen. Onder virulentie wordt hier verstaan de graad van het infectievermogen van een schimmel voor een bepaalde plantensoort. *Virulentie* moet dus onderscheiden worden van *parasitair vermogen*, d.i. het vermogen om *verschillende* plantensoorten aan te tasten.

Ofschoon het hier een kwestie geldt, die voor de phytopathologie van zeer veel belang moet worden geacht, waren er tot nu toe nooit systematische proeven genomen om uit te maken, of een bepaalde schimmel inderdaad minder virulent wordt voor een bepaalde plant, wanneer zij gedurende eenige tijd op verschillende wijze in reïncultuur is gekweekt en dus saprophytisch is gevoed.

Ook de vraag, of een éénvormige voeding in dit opzicht verschilt van een meer gevarieerde, had men nog niet op exacte wijze trachten op te lossen.

Het doel van deze onderzoekingen was dan ook om na te gaan, in hoeverre er inderdaad sprake kan zijn van de invloed van saprophytische voeding op de virulentie van een schimmel.

Voor de proeven werden gebruikt *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Massee en *Rhizoctonia solani* Kühn. Beide schimmels zijn parasieten, die zich normaal en vlug ontwikkelen op zeer verschillende voedingsbodems.

De graad van het infectievermogen van deze schimmels ten opzichte van kiemplanten van resp. tomaten en raapstelen werd onderzocht. Het werken met kiemplanten heeft het groote voordeel,

dat de infectie over het algemeen snel verloopt en dat het ziektebeeld duidelijk is. Bovendien kan men makkelijk met een groot aantal kiemplanten werken.

Onder normale omstandigheden sterven na infectie met *Sclerotinia sclerotiorum* een groot percentage van de tomatenkiemplanten; na infectie met *Rhizoctonia solani* sterven zelfs 100% van de raapstelenkiemplanten. Door de schimmels op verschillende voedingsbodems te kweken, vóórdat zij voor de infectieproeven werden gebruikt, moest nu worden nagegaan, of het infectiepercentage aan verandering onderhevig was en men dus zou kunnen spreken van een invloed van de voeding op de virulentie.

LITERATUUROVERZICHT

Over het begrip virulentie van een schimmel en over de verandering van de virulentie vindt men in de literatuur uiteenlopende meeningen.

Fischer-Gäumann (1929) onderscheiden in hun handboek aggressiviteit en virulentie. Onder aggressiviteit verstaan zij het parasitaire vermogen van de schimmel in het algemeen; dit is een absolute waarde en deze kan niet gemeten worden. Virulentie daarentegen is de graad van de pathogene werkzaamheid van de schimmel t.o.v. een bepaalde gastheer. De virulentie kan gemeten worden naar de werking van de parasiet op een bepaalde plant; hoe grooter de werking, des te grooter is de virulentie. Meestal worden deze begrippen echter niet uit elkaar gehouden en wordt alles onder virulentie samengevat. Zoo zegt Marchal (1925) b.v.: „de virulentie is de eigenschap van parasitaire schimmels om levend weefsel aan te tasten. Bij obligate parasieten is deze virulentie een vast begrip, maar bij de facultatieve parasieten niet, waarbij dan ook drie gevallen zijn te onderscheiden en wel: verkrijgen van virulentie, verhoogde virulentie en verlies ervan. De virulentie van een schimmel kan zoodanig zijn, dat zij het vermogen heeft planten uit verschillende groepen aan te tasten. De polyphage schimmels zijn meestal facultatieve parasieten; bij de obligate parasieten ziet men echter, dat ze slechts leven kunnen op één soort, variëteit of ras of op een groep van planten, die nauw verwant zijn.” Hier worden dus de begrippen aggressiviteit en virulentie door elkaar gebruikt.

Over het veranderen van de virulentie van schimmels zijn in de literatuur verschillende gegevens te vinden, de meeningen echter lopen vaak uiteen. Zoo vinden sommige onderzoekers wel

achteruitgang van de schimmel, wanneer ze in cultuur gehouden wordt, anderen daarentegen merken dit niet op.

L a u r e n t (1899) wijst er op, dat men bij schimmels en bacteriën heel vaak het verschijnsel heeft, dat ze zoowel saprophytisch als parasitair kunnen leven. Hierbij kan men dus de ontwikkeling van de virulentie nagaan. Bij *Bacillus coli communis* ziet men het volgende: deze bacterie is onder normale omstandigheden niet parasitair voor levende planten, zij ontwikkelt zich b.v. niet op aardappels. Dompelt men nu de aardappels eenige tijd in een alkalische oplossing, dan gaat de resistentie van de aardappel achteruit en kan men de bacterie kweken op schijfjes van deze aardappel. Men krijgt zoo een *Bacillus coli communis*, die virulent is en ook normale aardappels aantast. Men kan deze virulentie weer doen verdwijnen door de bacterie op niet levend materiaal te kweken, b.v. op gedooide aardappels of op minerale voedingsoplossingen.

Men kan de resultaten van deze proeven echter niet zonder voorbehoud als juist aannemen. Ten eerste is het tegenwoordig bekend, dat *Bacillus coli communis* heel gemakkelijk mutaties vormt; bovendien werkte men in die tijd ook lang niet altijd met rein-cultures. Het veranderen van de virulentie, wat L a u r e n t zag, kan dus ook wel veroorzaakt zijn door het optreden van een mutatie. Daarbij weet men ook niet, wat er verandert, wanneer men aardappels in een alkalische oplossing dompelt, zoodat men, alles bij elkaar genomen, niet te veel waarde aan deze proeven mag hechten.

E d s o n en S h a p o v a l o v (1918) vonden, dat de virulentie van de verschillende stammen van *Rhizoctonia solani*, waarmee zij werkten, geen verband houdt met de tijd, gedurende welke ze kunstmatig in cultuur zijn gehouden. Ze zagen wel verschil in virulentie, indien zij infecteerden met cultures van verschillende voedingsbodems. Er had weinig of geen infectie plaats met een cultuur die gegroeid was op Melilotusstengel (dit is geen goed medium voor de schimmel) en een sterke aantasting met cultures van rijst of aardappel.

Evenals de vorige onderzoekers zag S i m o n T h o m a s (1925) geen achteruitgang van de virulentie. Bij een van zijn *Rhizoctonia solani*-stammen was de virulentie zelfs door een kunstmatige cultuur van 10 jaar niet te gronde gegaan.

Small (1927) vond achteruitgang van de virulentie van *Rhizoctonia solani* Kühn, wanneer deze schimmel eenige tijd in cultuur werd gehouden; dit ging samen met een verminderde productie van pseudosclerotiën.

Elmer (1932) werkte met verschillende stammen van *Rhizoctonia solani* en vond, dat deze stammen, wat hun virulentie betrof, groote verschillen vertoonden en dat ze deze eigenschappen behielden na een tijd in cultuur te zijn geweest. Daar deze publicatie slechts een korte mededeeling is, weet ik niet op welke wijze de schimmels in cultuur werden gehouden en hoe lang. Zoodoende kan ik niet bepalen, in hoeverre zijn resultaten met de mijne kloppen.

Bij *Sclerotinia sclerotiorum* vond Westerdijk (1911) geen achteruitgang van de virulentie na een langdurige saprophytische voeding. Een cultuur op pruim-agar, waarop de schimmel slecht groeide, was wel minder virulent geworden.

Evenzoo vond Wormald (1919), dat de virulentie van *Sclerotinia cinerea* f. *mali* niet veranderd was, wanneer deze schimmel 2 jaar lang saprophytisch op aardappel gekweekt was.

Bij *Fusarium* is o.a. het volgende gevonden: Appel en Wollenweber (1913) zagen in sommige gevallen een verandering in de morphologie en de biologie bij species van het geslacht *Fusarium*, welke lange tijd op kunstmatig medium gegroeid waren. Ze onderscheidden „An-, Norm- en Abkultur”. Toch komt deze „Abkultur” over het algemeen weinig voor en ziet men, dat de cultures op gekookt plantaardig medium hun virulentie niet verliezen, wanneer ze 2 jaar in cultuur zijn geweest.

Het is wel van belang op welke voedingsbodem de schimmel groeit. Zoo zag Wollenweber (1913), dat die voedingsbodems, welke de levensduur van *Fusarium niveum* Smith verminderten, de virulentie achteruit deden gaan. Zoo was b.v. deze schimmel, nadat zij een maand gegroeid was op filtreerpapier, gedoopt in 2% suikeroplossing, nog virulent, terwijl even oude cultures op gekookte aardappels het niet meer waren. In zoo'n geval is de relatieve ouderdom van een cultuur van invloed. De cultuur op de voedselrijke aardappels was al afgeleefd, terwijl de armenlijke cultuur op filtreerpapier de schimmel kunstmatig jong had gehouden. Een jonge cultuur op aardappel kan heel actief zijn.

Sherbakoff (1915) vindt, evenals Wollenweber, „Ab-

kulturen" bij *Fusarium*, maar hij geeft alleen verandering van kleur op en zegt niets over een virulentie-verandering.

Burkholder (1925) vond bij een *Fusarium*stam van boonen, dat deze na 6 jaar in cultuur te zijn geweest, minder virulent was geworden. De kleur van de cultuur was ook veranderd.

Door er boonenplanten mee te infecteeren en dan de schimmel terug te isoleeren, herkrijgt hij de oorspronkelijke virulente vorm. Na de eerste terugisolatie is de virulentie nog niet veel sterker, maar na 2 keer heeft ze weer haar oude virulentie.

Brown (1926) ziet bij zijn cultures van *Fusarium* dikwijls sectoriale mutanten optreden; deze zijn vaak minder sterk parasitair dan de moedercultuur. Er is dan wel beweerd, dat parasitaire schimmels in cultuur haar virulentie verliezen, maar dit is volgens Brown bij *Fusarium* niet het geval; er ontstaat echter een saprophytische mutant in de virulente stam. Indien er goed wordt gelet op de moedercultures, dan is er geen reden tot bezorgdheid, dat de virulentie achteruit zal gaan. Men kan in zooverre van een invloed van de bodem spreken, doordat op de eene voedingsbodem de mutatie vaker optreedt dan op de andere, b.v. vaak op Richards oplossing. Brown verklaart dit als volgt: de oudervorm heeft het vermogen tot mutatie; wanneer nu de groei van een cultuur gauw ophoudt, dan heeft er weinig mutatie plaats; raakt de cultuur niet gauw uitgeput, dan heeft er meer mutatie plaats. Gebruikt men dus weinig voedende bodems en ent men vaak over, dan krijgt men constante vormen.

La Rue (1925) heeft op dezelfde wijze trachten te verklaren, dat sommige onderzoekers vinden, dat schimmels in cultuur haar virulentie verliezen. Hij stelt zich deze verandering als volgt voor: wanneer een parasitaire schimmel saprophytisch gevoed wordt, ontstaan er mutaties, welke saprophytische stammen geven; deze groeien beter dan de parasitaire mutanten en overheerschen dus. Groeien ze vervolgens weer parasitair, dan krijgen de parasitaire vormen de overhand en de schimmel wordt weer virulent.

Het verlies van virulentie zal dus afhangen van het vermogen van de verschillende schimmels om te muteeren; hebben ze dit vermogen niet, dan zal er dus geen verlies van virulentie plaats hebben.

Ook zijn in de literatuur gegevens te vinden over het gedrag

van andere schimmels, wanneer ze kunstmatig in cultuur worden gehouden. Zoo vinden Foëx en Rosella (1928) bij hun proeven, waarbij zij gerst infecteeren met cultures van *Helminthosporium sativum*, dat de resultaten onregelmatig en vaak negatief waren, indien de schimmel gegroeid was op boon-gelatine. Zij weten echter niet, wat de oorzaak ervan is; verminderde virulentie kan een rol spelen, maar er kunnen ook minder sporen gevormd zijn.

Donandt (1932) vindt geen achteruitgang van de virulentie van *Verticillium alboatrum* door langdurige saprophytische voeding. Ook Wollenweber (1930) vond, dat de morphologie van *Verticillium* in cultuur vrij constant was en dat er geen achteruitgang van de virulentie plaats had.

Achteruitgang van de virulentie, maar niet door saprophytische voeding, kreeg Volk (1931). Hij deed n.l. voedingsproeven met tomaten, die hij infecteerde met sporen van *Cladosporium fulvum*. Hij vond nu, dat conidiën van de schimmel, die 2 tot 3 generaties op tomaten met phosphor-gebrek gegroeid waren minder sterk infecteerden dan die, welke op normaal gevoede planten ontstonden. Werden ze hierna gekweekt op gezonde planten, dan herkreëmen weer conidiën, die 100% infecteerden. Hij noemt dit een verandering van de agressiviteit; het percentage van de kieming van de sporen is nog wel normaal, maar de schimmel is blijkbaar minder goed in staat de voedingsstoffen uit de plant te halen; er heeft waarschijnlijk een verandering plaats gehad van de specifieke enzymatische werking van de parasiet. Hij vindt in die gevallen, waar de aantasting gelukte, dat de vlekken kleiner bleven dan na infectie met normale conidiën en zegt, dat dit komt, doordat ook de virulentie verminderd is. Naar mijn meening is echter, wat Volk een verandering van de aggressiviteit noemt, ook het gevolg van de verminderde virulentie.

Tenslotte heeft men nog die gevallen, waarbij men, in plaats van een achteruitgang van de virulentie, ziet, dat saprophytische schimmels parasitair worden. Butler (1918) bespreekt in zijn boek „Fungi and Disease in plants” dergelijke gevallen. Door Begoniabladeren met suikeroplossingen te injecteren, kan men *Trichothecium* parasitair doen worden. Ook heeft men wel, dat er op een plant kliertjes voorkomen, die suiker afscheiden; de schimmel kan zich hiermee eerst voeden en wordt tenslotte parasitair.

Volgens Young (1926) zijn er betrekkelijk weinig saprophytische schimmels; onder bepaalde omstandigheden kunnen de meeste schimmels levende planten binnendringen en één of meer cellen ziek maken. Facultatieve parasieten zijn heel belangrijk vooral met het oog op het eventueel virulenter worden van dergelijke schimmels. Het komt vaak voor, dat ziekten, die eerst weinig belangrijk zijn, plotseling ernstig worden en zich ook verbreiden.

Als we nagaan, hoe weinig er over virulentieverandering bekend is, lijkt het wel de moeite waard om te onderzoeken, welke invloed saprophytische voeding op de virulentie van parasitaire schimmels heeft, al zullen de verkregen resultaten nooit te generaliseeren zijn en alleen gelden voor de twee onderzochte schimmels.

DEEL I.

ONDERZOEKINGEN BIJ *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* (LIB.) MASSEE

HOOFDSTUK I.

MORPHOLOGIE EN BIOLOGIE VAN DE SCHIMMEL.

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) Massee en *Sclerotinia libertiana* Fuckel zijn synoniem; het blijkt echter, dat de eerste naam de voorkeur geniet. Wakefield (1924) geeft een literatuuroverzicht over deze nomenclatuurkwestie. De schimmel werd in 1837 beschreven door Madame Libert in het latijn als *Peziza sclerotiorum* in haar Pl. crypt. Ardennae Fasc. IV, N. 321, Fuckel brengt in zijn Symbolae mycologicae (1869) deze species over in het door hem genoemde geslacht *Sclerotinia* en verandert tegelijk de naam in *Sclerotinia libertiana*, blijkbaar alleen, omdat hij de combinatie *Sclerotinia sclerotiorum* niet mooi vond. Het is beslist dezelfde schimmel, want hij geeft als synoniem *Peziza sclerotiorum* Lib. en *Peziza sclerotii* Fuckel. Deze naamsverandering van Fuckel is tegen de internationale regel van nomenclatuur, waarbij bepaald is, dat, wanneer er een soort van een geslacht onder een ander geslacht wordt gebracht, de origineele soortnaam behouden blijft, tenzij de dan verkregen combinatie al bestaat. Bij *Sclerotinia sclerotiorum* was dit laatste echter niet het geval, daar Fuckel zelf het genus *Sclerotinia* voorstelde. De meeste Europeesche onderzoekers gebruikten de naam, die door Madame Libert gegeven was. Massee gebruikte de combinatie *Sclerotinia sclerotiorum*

het eerst in zijn *British Fungus Flora* vol. IV 1895; sedertdien is deze naam in de Engelsche literatuur gebleven. Tegenwoordig vindt de naam *Sclerotinia sclerotiorum* vrijwel algemeen ingang. Men vindt soms de auteursnaam „Saccardo et Trotter" vermeld; dit is echter niet juist; zij hebben pas in 1913 de combinatie *Sclerotinia sclerotiorum* gebruikt.

Sclerotinia sclerotiorum is reeds lang bekend als een parasiet van zeer veel verschillende planten, welke gemakkelijk van de eene plant op de andere overgaat; er worden dus geen physiologische rassen gevormd (Westerdijk, 1911).

Het klassieke onderzoek over *Sclerotinia sclerotiorum* is van De Bary (1868), hij geeft een heel duidelijk overzicht van de biologie en de physiologie van de schimmel.

Heel vaak werd beweerd, dat *Sclerotinia sclerotiorum* en *Botrytis cinerea* bij elkaar hooren, b.v. door Behrens (1891), Frank (1895) en Humphrey (1891). Dit komt, omdat *Botrytis* heel gemakkelijk op doode plantendeelen kan voorkomen. Maar na de onderzoekingen van De Bary (1886), Kissling (1889), Smith (1900), Appel en Bruck (1907) en Westerdijk (1911) is het wel zeker, dat het 2 afzonderlijke schimmels zijn. Zelf zag ik ook nooit in mijn cultures van *Sclerotinia Botrytis* optreden.

Sclerotinia sclerotiorum vormt een wit mycelium; de hyphen zijn sterk vertakt en bestaan uit cellen van verschillende lengte. Wanneer de hyphen tegen een vaste wand aankomen, vormen ze appressoriën. Op het mycelium ontstaan de sclerotiën, die soms in concentrische ringen gevormd worden, soms verspreid ontstaan; ook de grootte van de sclerotiën wisselt sterk (2—4 mM breed en 3—12 mM lang). Men kan bij de sclerotiën een donkere wand en een wit merg onderscheiden.

De sclerotiën zijn vaak bedekt met druppels; De Bary (1886) heeft aangetoond, dat dit vocht in water oplosbare zouten van oxaalzuur bevat. Vaak wordt aangenomen, dat sclerotiën ontstaan bij ongunstige omstandigheden, maar men moet toch niet aannemen, dat ze ontstaan bij slechte voeding (Killian, 1926).

De verdere ontwikkeling van de schimmel is deze: uit het sclerotium ontwikkelt zich het apothecium; volgens sommige onderzoekers

moeten de sclerotiën eerst een periode van rust doormaken (Kissling, 1889; Westerdijk, 1911), terwijl andere vinden, dat dit niet noodig is (Appel, 1907; Ramsey, 1926; Iwao Hino, 1930). Wanneer men de schimmel in reïncultuur heeft, ziet men nooit apotheciën ontstaan en krijgt men ook geen apotheciumvorming, wanneer men sclerotiën uit reïncultures brengt in vochtig zand, hoewel dit een methode is, waardoor volgens Ramsey, heel gemakkelijk uit de sclerotiën de apotheciën ontstaan. In het apothecium ontstaan de asci met de ascosporen; de kiemende ascosporen geven het witte mycelium. Ook de sclerotiën kunnen weer opnieuw mycelium vormen.

Verder worden er soms micro-conidiën gevormd. Volgens de meeste onderzoekers ontstaan ze bij voedselgebrek (De Bary, 1886; Appel, 1907; Ramsey, 1926) en dus vooral in oude cultures. Ramsey wijst er op, dat ze vrijwel nooit in jonge cultures ontstaan, maar pas na 20—30 dagen. Daarom zijn ze vaak over het hoofd gezien. Op de aangetaste planten vindt men ze bijna nooit; dit komt omdat ze pas ontstaan, als het weefsel van de voedsierplant bijna geheel verbruikt is en dan gooit men meestal de planten weg zonder ze verder na te zien.

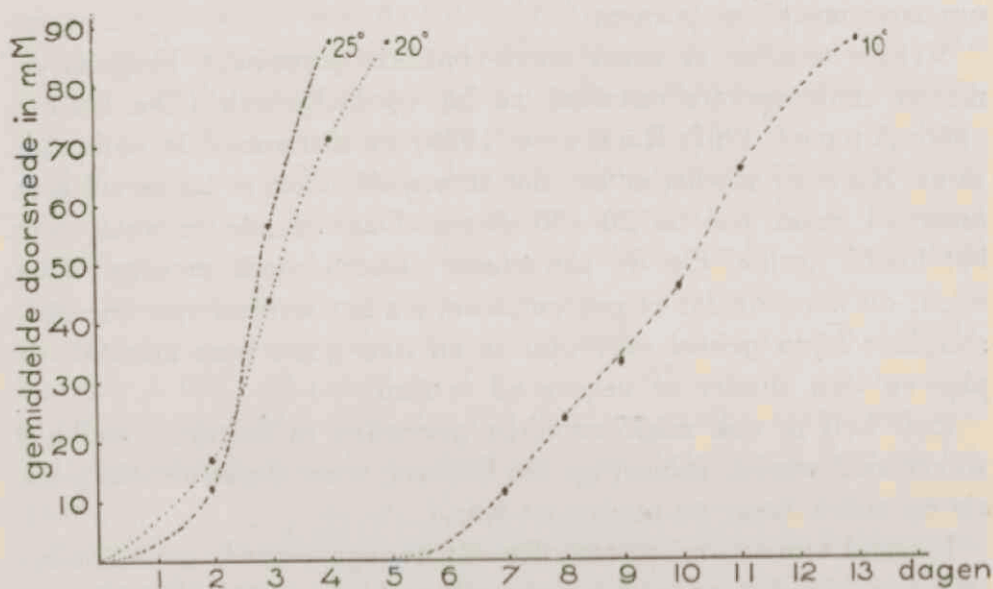
Zelf heb ik ook micro-conidiën gevonden in cultures, welke 3 weken oud waren: zoowel op die bodems, waar de virulentie klein, als op zulke, waar ze nog groot was.

Meestal worden micro-conidiën als gedegenereerde conidiën beschouwd, omdat ze niet kiemen (Brefeld, 1881; De Bary, 1886; Schellenberg, 1909). Ramsey (1926) zag nu en dan wel een kieming, maar meestal stierven de kiembuizen af. Humphrey (1893) vond kieming van micro-conidiën bij *Sclerotinia fructigena* in een voedingsoplossing. Eidam (1877) hield de micro-conidiën voor spermatiën; dit is echter niet juist.

Het blijkt, dat *Sclerotinia sclerotiorum* heel goed saprophytisch kan leven en op zeer veel verschillende kunstmatige voedingsbodems groeit. De temperatuur heeft een vrij groote invloed op de groei; bij 28° en 30° C geen groei; de groei bij 25° C is heel goed; minder bij 20° C en bij 10° C vrij langzaam; fig. 1 geeft dit weer. De groeisnelheid werd bepaald, door elke dag de doorsnede van de cultuur te meten; op de abscis is de tijd aangegeven en op de ordinaat de doorsnede van de cultuur resp. na 1, 2, 3 enz.

dagen. Het blijkt, dat bij 25° C de schaal na 4 dagen al volgegroeid is, bij 20° C na 5 dagen en bij 10° C pas na 13 dagen.

Over de wijze, waarop *Sclerotinia* en *Botrytis* de planten aantasten, zijn zeer veel verschillende onderzoeken; er blijkt een groote overeenkomst tusschen deze beide schimmels te bestaan, alleen doodt *Sclerotinia* het weefsel op eenige afstand voor de binnendringende hyphen (De Bary 1886, Boyle 1921), terwijl *Botrytis* dit volgens de meeste onderzoekers niet doet (Nordhausen 1899, Brown 1917), hoewel Vasudeva (1930) vindt, dat ook



Figuur 1.

Groei van *Sclerotinia sclerotiorum* bij verschillende temperaturen.

bij *Botrytis cinerea* het dooden van het weefsel verder gaat dan de schimmel gegroeid is.

Men moet bij het aantasten 2 processen onderscheiden: 1e. het dooden van de cellen en 2e. het oplossen van de celwand. Het eerste proces (dooden van de cel) wordt volgens sommige onderzoekers door een enzym veroorzaakt (Nordhausen, 1899; Brown, 1912), terwijl andere tot de conclusie komen, dat het geen enzym is, want door koken verliest het zijn werking niet; De Bary (1886), Behrens (1898) en Smith (1902) gelooven, dat oxaalzuur een rol speelt, terwijl Büsgen (1918), hoe-

wel hij meent te vinden, dat het geen enzymwerking is, er op wijst dat oxaalzuur een heel andere beschadiging veroorzaakt. Ook Nordhausen vindt, dat oxaalzuurbeschadiging heel andere verschijnselen te voorschijn roept.

Brown (1917) wijst er op, dat men bij deze proeven geen oude cultures en geen extracten van ziek weefsel mag gebruiken, zooals zoo vaak gebeurt. Hierin toch zitten allerlei stoffen, die men niet kent en die op zich zelf ook een werking kunnen uitoefenen.

Het 2e proces (het oplossen van de celwand) is een enzymatisch proces; hierover zijn de verschillende onderzoekers het eens (De Bary 1886, Behrens 1898, Smith 1902, Brown 1917). Sommigen beweren echter, dat alleen de middenlamel opgelost wordt (Schellenberg 1908), terwijl Otto (1918) soms wel, soms geen oplossing van cellulose vindt, maar gelooft, dat *Botrytis*, onder bepaalde omstandigheden, in staat is cellulose op te lossen. Behrens (1898) is van meening dat de schimmel zelf regelend het enzym, dat de cellulose oplost, vormt, wanneer er tenminste geen suiker tot zijn beschikking is. Iets dergelijks heeft Otto ook gevonden: wanneer de gunstige koolstofbron in lage concentratie aanwezig is, dan heeft er geen invloed op de enzymafscheiding plaats; zijn deze stoffen in hoogere concentratie aanwezig, dan blijft de secretie achterwege. Smith (1902) stelt zich voor, dat er verschillende cellulose-oplossende enzymen zijn, daar de samenstelling van de cellulose ook vaak verschillend is. Maar de middenlamel, welke uit hemicellulose en pectine bestaat, wordt altijd opgelost. Ward (1888) vond bij zijn *Botrytis* een eigenaardige opzwellling van de celwand door de enzymwerking; dit is echter een uitzonderingsgeval.

Verder blijkt de werking van de enzymen in een zuur milieu het grootst te zijn (Laurent, 1898; Vasudeva 1930).

Voordat de enzymen echter hun werking kunnen uitoefenen moet de schimmel eerst de cuticula doordringen; dit is een zuiver mechanisch proces (Brown en Harvey 1927). De Bary meende, dat de cuticula ook werd opgelost, wat echter niet het geval is; hierop wees Boyle (1921) ook al, terwijl Kissling (1889), Nordhausen (1899) en Brooks (1908) vinden, dat de sporen van *Botrytis* niet door gecutiniseerde deelen kunnen binnendringen, wanneer deze niet verwond zijn en geen huidmondjes

hebben. Ook werd wel beweerd, dat het een chemotropisch proces is; zoo vindt Miyoshi (1885) een positieve chemotropie, Fulton (1906) daarentegen negatieve chemotropie. De producten, die de schimmel zelf afscheidt, veroorzaken groei naar een omgeving, waar geen hyphen zijn. Graves (1916) vond zoowel negatieve als positieve chemotropie; de negatieve komt het meest voor. De onderzoekingen van Brown en Harvey (1927) maken het echter heel waarschijnlijk, dat het binnendringen zuiver een mechanische reactie is. Uit deze theorie volgt niet de conclusie, dat elke schimmel nu iedere plant kan binnendringen; het vermogen van de schimmel om te kunnen kiemen in de hoeveelheid voedsel, disponibel op de bepaalde plant, en het vermogen om de weerstand van de cuticula te overwinnen, zijn belangrijke factoren. Tegen de opvatting, dat het binnendringen geschiedt, doordat een enzym de cuticula oplost, spreekt ook het feit dat gecutiniseerd materiaal erg resistent is en moeilijk aan te tasten, zoodat zelfs onder de meest gunstige omstandigheden het proces heel langzaam verloopt; het binnendringen van de hyphen echter gaat vrij snel (in enkele uren). Bovendien is gebleken, dat bij het binnendringen de turgor van het weefsel ook een groote rol speelt.

Is de hyphe eenmaal binnen gedrongen, dan krijgt men de werking van de enzymen.

HOOFDSTUK II.

ONDERZOEKINGEN OVER DE INVLOED VAN DE VOEDING VAN DE SCHIMMEL OP HAAR VIRULENTIE.

1. *Methode van onderzoek.*

Om de invloed van de voeding van *Sclerotinia* op haar virulentie na te kunnen gaan, werden, als test, infectieproeven met deze schimmel genomen; hiertoe werden tomatenkiemplanten geïnfecteerd met *Sclerotinia sclerotiorum*, die op verschillende voedingsbodems gekweekt was. Op de volgende manier werd te werk gegaan:

De schimmel werd gekweekt in petrischalen met een middellijn van 9 cM, die ongeveer 25 cM³ van de bepaalde voedingsbodem bevatten. Een groot aantal verschillende voedingsbodems werd gebruikt, waarvan de recepten hieronder volgen zullen.

De schalen werden na enting in het donker geplaatst bij kamertemperatuur ($\pm 20^{\circ}$ C). De tijd, gedurende welke de schimmel op de verschillende voedingsbodems groeide, werd gevarieerd. Het bleek n.l. uit een aantal experimenten, dat de ouderdom van de cultuur een groote invloed op de virulentie heeft. Vergeleken werden cultures, welke resp. 8, ± 14 en ± 21 dagen oud waren.

Wanneer de schimmel de aangegeven tijd op de bepaalde bodem gestaan had, werd hiermee bladaarde, waarmee potten gevuld waren, geïnfecteerd. De potten hadden een diameter van 10 cM. De bladaarde werd niet gesteriliseerd, want zooals bekend is, is het gedrag van schimmels in gesteriliseerde aarde dikwijls anders; zoo zijn ze b.v. vaak veel sterker parasitisch. De ongesteryliseerde aarde

leverde geen bezwaar op, want slechts zelden traden infecties van andere schimmels op. Alleen in de koude maanden November en December was er soms een *Pythium*-aantasting waar te nemen. Hiervan was het ziektebeeld echter geheel anders en duidelijk te onderscheiden van een *Sclerotinia*-aantasting. Bovendien werd er voor controle ook wel ziek materiaal uitgelegd en kon men zoo heel makkelijk *Sclerotinia* of *Pythium* terugisoleeren.

Om de aarde te infecteeren werd de schimmel met een spateltje voorzichtig van de agar afgeschept, zoodat er zoo min mogelijk agar meekwam. Deze massa werd nu met het bovenste deel van de aarde vermengd; het was beter om het infectiemateriaal niet door de heele pot te mengen, want de aantasting heeft n.l. het sterkste plaats daar, waar het hypocotyl van het tomatenplantje boven de aarde komt. Dit is wel meer gevonden: zoo vond b.v. A t i e n z a (1927) bij *Sclerotium Rolfsii* dat 80% van de infecties slaagde, wanneer hij de sclerotiën 0,5 tot 1,5 cM diep in de bodem bracht. Bracht hij ze dieper dan 1,5 cM, dan had slechts 15% van de infecties een positief resultaat.

In elke pot werd de schimmelmassa van één petrischaal gebracht. Was de schimmel slecht gegroeid, dan zelfs 2 schalen per pot. Dit is vrij veel, maar er moest een overmaat van infectiemateriaal zijn, zoodat het niet-slagen van een proef niet kon komen, doordat de planten niet voldoende infectie-materiaal gehad hadden.

De geïnfecteerde potten bleven een dag staan en werden goed vochtig gehouden. Ze werden hiertoe in een verwarmde kas in een bak met turfmolm ingegraven. Het is van het grootste belang, dat de aarde goed vochtig blijft, want het mycelium is zeer gevoelig voor droogte. Ook de temperatuur speelt een groote rol, de gunstige temperatuur bleek wel $\pm 20^{\circ}$ C te zijn, trouwens dit zijn bekende feiten, die vaak in de literatuur vermeld worden (W e s t e r d i j k, R a m s e y, L e t o w). De temperatuur liep echter in de kas sterk uiteen, wat bij de proeven vaak moeilijkheden opleverde. Geheele series vielen uit.

Nadat de geïnfecteerde potten zoo een dag gestaan hadden, werden de tomatenkiemplanten hierin overgeplant en wel 3 per pot. De tomaten, die gebruikt werden, behoorden tot de variëteit „Deensche export”. Deze variëteit is zeer gevoelig voor de aantasting van *Sclerotinia sclerotiorum* (S a n d e r 1931). Het zaad werd 20 min.

in een 0,25% germisanoplossing gedesinfecteerd en hierna, gedurende één uur, goed gespoeld met leidingwater. Ze werden uitgezaaid in platte bakken; wanneer de kiemplanten de gewenschte grootte bereikt hadden, werden deze overgeplant in de potten met geïnfecteerde aarde.

De infectie verloopt vrij snel; reeds na een paar dagen ziet men een verwelking van de aangetaste plantjes optreden: het mycelium omgroeit het hypocotyl geheel, dringt er in; het plantje valt om. Deze zeer jonge tomatenplanten gaan of dood, of zij blijven volkomen gezond. Na 14 dagen is zoo'n proef afgelopen.

Om na te gaan, of de voedingsbodem, die men tegelijk met de schimmel in de aarde brengt, zelf ook een schadelijke invloed op de planten heeft, werden er ook proeven genomen, waarbij de aarde vermengd werd met een aantal verschillende bodems. De planten bleven hierin echter steeds volkomen gezond.

Van *Sclerotinia sclerotiorum* werden 2 stammen gebruikt en wel ten eerste de stam C. B. S.; dit is de oudste stam van *Sclerotinia sclerotiorum* uit het „Centraal Bureau voor Schimmelcultures"; hij werd in 1922 van sla geïsoleerd. Deze stam werd gekozen, daar hij van de 3 stammen, die begin 1930 in het „Centraal Bureau voor Schimmelcultures" aanwezig waren, verreweg de virulentste was; de beide andere stammen waren resp. in 1924 en 1926 geïsoleerd. *Sclerotinia's*, die ik zelf isoleerde van kool en van zonnebloemen, bleken zeker niet virulenter te zijn; hier zijn verder dan ook geen proeven meer mee genomen. Wel was dit het geval met een stam uit Amerika, die in 1931 van Limaboonen (*Phaseolus lunatus*) geïsoleerd was. Bij een bezoek van professor W h e t z e l aan het „Centraal Bureau voor Schimmelcultures" verklaarde hij, dat de daar aanwezige stammen van *Sclerotinia sclerotiorum* „run out" waren en daarom werd door hem een nieuwe stam gestuurd. Met deze stam werden ook proeven gedaan, maar er bleek weinig verschil te zijn met de stam C. B. S. Hoewel deze dus in virulentie vrijwel gelijk zijn, is er inderdaad macroscopisch een verschil te zien: de nieuwe Amerikaanse stam vormt veel sneller sclerotiën en in een grotere hoeveelheid. Hieruit blijkt dus tevens, dat uit de morfologie van een schimmel niet altijd de graad van virulentie kan worden afgeleid.

Hieronder volgen nu nog de recepten van de voedingsbodems, welke gebruikt werden.

aardappel-agar:

Aardappelen worden geschild, grondig afgewassen en fijn gemalen door een vleeschmolen. Hiervan wordt 100 gr. genomen op 300 cc. water. Deze massa laat men een nacht over staan op een koele plaats. Hierna zeven en steriliseeren.

extract	230 cc.
water	770 cc.
glucose	20 gr.
agar	20 gr.

witte boonen-agar:

gemalen boonen	100 gr.
water	1 L.
agar	15 gr.

De gemalen boonen eerst aan de kook brengen, hierna een uur laten trekken en filtreren, daarna eerst apart steriliseeren en vervolgens de agar toevoegen en nogmaals steriliseeren.

bouillon-agar:

bouillon	1 L.
glucose	80 gr.
saccharose	40 gr.
pepton (Chassaing)	10 gr.
NaCl	1 gr.
agar	15 gr.

voor alkalische bouillon-agar:

aan het bovenstaande toevoegen 32 cc. KOH 2N per L.

cellulose-agar:

filtreerpapier	10 gr.
NH ₄ NO ₃	1 gr.
KH ₂ PO ₄	1 gr.
MgSO ₄	0,5 gr.
water	1 L.
agar	20 gr.

Het papier afkoken, hetwelk daarna in balletjes bij de agar gevoegd kan worden.

maismeel-agar:

gemalen maismeelkorrels	60 gr.
water	1 L.
agar	10 gr.

De gemalen maismeelkorrels eerst aan de kook brengen, daarna een uur laten trekken en filtreren.

mout-agar:

moutextract ¹⁾	250 cc.
water	750 cc.
agar	20 gr.

moutsalep-agar:

moutextract	250 cc.
salep	2 gr.
water	750 cc.
agar	20 gr.

pepton-glucose-saccharose-agar:

pepton (Chassaing)	10 gr.
glucose	30 gr.
saccharose	20 gr.
MgSO ₄	0,5 gr.
K ₂ HPO ₄	1 gr.
water	1 L.
Ca(NO ₃) ₂	1 gr.
agar	15 gr.

1% pepton-agar:

pepton (Chassaing)	10 gr.
water	1 L.
agar	15 gr.

40% saccharose-agar:

saccharose	400 gr.
water	1 L.
agar	15 gr.

4% saccharose-agar:

saccharose	40 gr.
water	1 L.
agar	15 gr.

X-agar:

kers-agar	1 deel.
pepton-glucose-saccharose-agar	1 deel.
haverhout-agar	1 deel.

Voor kers-agar wordt genomen 300 cc. kersdecoct, 700 cc. water en 20 gr. agar, voor haverhout-agar 30 gr. haverhout, 1 L. water en 15 gr. agar.

¹⁾ Dit extract ontvingen we van een van de Nederlandsche bierbrouwerijen.

Voor de samenstelling van de synthetische voedingsbodems, zie blz. 28, 41.

2. *Invloed van eenige natuurlijke en synthetische voedingsbodems.*

Om na te gaan, of de voeding van een schimmel invloed heeft op haar virulentie, werd *Sclerotinia sclerotiorum* stam C. B. S. eerst gekweekt op allerlei verschillende voedingsbodems, die in het laboratorium aanwezig waren. Het bleek, dat de schimmel op de meeste van deze bodems uitstekend groeide. Zoo was de groei heel goed op moutsalep-, mout-, bouillon-, alkalische bouillon-, pepton-glucose-saccharose- en X-agar, er had een flinke mycelium-ontwikkeling en vorming van veel sclerotiën plaats. Iets minder goed was de groei op aardappel- en boon-agar, terwijl op maismeel- en op 1% pepton-agar de mycelium-ontwikkeling nog wel behoorlijk was, maar slechts zelden sclerotiën gevormd werden.

Op cellulose-agar was de groei slecht; er werd alleen een dun laagje substraat-mycelium gevormd en er had in het geheel geen sclerotiënvorming plaats.

Op 2% agar groeide de schimmel ternauwernood, zoodat deze cultures niet te gebruiken waren voor infectieproeven.

Nadat *Sclerotinia* nu 14 dagen op de verschillende genoemde bodems gegroeid had, werden er infectieproeven mee gedaan op de reeds beschreven wijze (blz. 15). Er bleek eenig verschil in virulentie te zijn; men kreeg met cultures van *Sclerotinia*, die op 1% pepton- en op cellulose-agar gegroeid hadden, slechts een geringe aantasting, terwijl de virulentie van de schimmel op pepton-glucose-saccharose-agar bijzonder groot was; in de overige gevallen kreeg men overal een vrijwel even groote aantasting. Tabel I geeft een overzicht van de verkregen resultaten.

De percentages geven in deze tabel niet altijd een geheel juist beeld weer, omdat in sommige gevallen het aantal planten klein was. Toch is het aantal doode planten in deze tabel in percentages uitgedrukt om het geheel overzichtelijker te maken.

De tabel is samengesteld uit verschillende series. Het aantal geslaagde infecties liep echter in de verschillende series van één-zelfde voedingsbodem nogal uiteen (alleen met pepton-glucose-saccharose-agar kreeg men steeds een sterke infectie), zoodat in

TABEL I

Bodem	Aantal geïnfecteerde planten	Aantal planten dood	% dood
Moutsalep . . .	54	34	62,9
mout	51	40	78,6
alk. bouillon . . .	24	21	87,5
bouillon	12	10	83,3
pept. gluc. sacch. .	132	119	90,1
X	27	19	70,3
boon	27	23	85,2
aardappel	12	9	76,6
maismeel	12	8	66,6
saccharose 4 % . .	18	8	42,2
saccharose 40 % .	18	16	88,8
cellulose	21	3	14,3
pepton 1 %	42	1	2,4

TABEL II

Bodem	Aantal geïnfect. planten	Aantal planten dood	Temp. in ° C.	
			minimum	maximum
Moutsalep-agar . . .	6	5	10	20—30
	12	10	11	20
	12	11	13	25
	12	5	10	20—30
	12	3	10	30—33
X-agar	6	5	10	20—30
	9	2	11	20
	12	12	13	25
	9	9	12	19—25
pept. gluc. sacch.-agar	12	10	13	25
	9	7	13	20—30
	9	9	12	22
	12	12	7	20
	12	12	15—18	24—27
	12	11	13—15	20—22
	30	29	6—10	20—32
	15	10	2—10	12—27
	12	10	10—12	17—28

tabel II voor enkele bodems de resultaten in de verschillende series apart worden opgegeven. In deze tabel wordt ook aangegeven, hoe de temperatuur de eerste dagen na de infectie was. Daar de temperatuur in de kas zeer sterk wisselde, werd de min. en max. temperatuur opgegeven (maar, zooals uit de tabel volgt, varieerde ook het gemiddelde hiervan nog sterk).

Invloed van de ouderdom van de cultuur.

Nu werd nagegaan, hoe de infectie verliep na een cultuur op 1% pepton-, cellulose-, moutsalep-, X-, en pepton-glucose-saccharose-agar, wanneer men infecteerde met een cultuur, die slechts 7—9 dagen oud was. Men kreeg in dit geval na een infectie met een cultuur op 1% pepton-agar wel een aantasting; ook met een cultuur van cellulose-agar kreeg men nu een grootere aantasting dan na een infectie met een cultuur van 14 dagen oud. In de overige gevallen was er weinig verschil, daar de aantasting groot bleef. Tabel III laat zien, hoe de infecties verliepen.

TABEL III

Infectieproeven met jonge cultures van *Sclerotinia sclerotiorum*

Bodem	Aantal geïnfect. planten	Aantal planten dood	Temp. in ° C.	
			minimum	maximum
1 % pepton-agar . . .	12	8	8	23
	24	0	11—15	35
	27	11	5—8	19—22
cellulose-agar	6	5	10	20—30
	18	5	10	23
moutsalep-agar	6	6	6—10	20—30
X-agar	9	9	6—10	20—30
pepton gluc. sacch.-agar	12	12	5—8	11—25

Zooals men uit de tabel kan zien, was in het geval, waar men bij

1% pepton geen infectie kreeg, de temperatuur abnormaal hoog.

Bij deze ongunstige omstandigheden krijgt men ook nu geen aantasting.

Dat men met een zeer jonge cultuur van *Sclerotinia* op 1% pepton wel een aantasting krijgt, maar niet met een cultuur van 14 dagen, wat toch ook nog een jonge cultuur is, geeft een aanwijzing, dat men hier wellicht met een schadelijke werking van stofwisselingsproducten heeft te doen. Nu heeft Butkewitsch (1903) bij *Aspergillus niger* gevonden, dat men daar, waar men pepton als eenige C- en N-bron gaf, een schadelijke ophooping van ammoniak kreeg. De groei hield in dergelijke cultures op. Het was hoogst waarschijnlijk, dat men hier bij *Sclerotinia* ook zoo'n opeenhooping kreeg. Inderdaad kon ik met Nessler's reagens aantoonen, dat er in cultures van *Sclerotinia* op 1% pepton na 14 dagen vrij veel ammoniak gevormd was: er ontstond een oranje neerslag. In cultures, die slechts één week oud waren, gaf Nessler's reagens een zwak oranje neerslag: er was dus minder ammoniak gevormd. Men kan zich voorstellen, dat het mycelium door deze ammoniakophooping niet meer in staat is te groeien. Er heeft dan ook geen enzymafscheiding meer plaats. Ent men van zoo'n cultuur over op een goede voedingsbodem, dan krijgt men, na een groei hierop van 14 dagen, weer een sterke aantasting.

De ouderdom van een cultuur kan dus blijkbaar een groote rol spelen, waarom met cultures van *Sclerotinia sclerotiorum* op pepton-glucose saccharose-agar van verschillende leeftijd geïnfecteerd werd. Het bleek, dat men met cultures welke ouder waren dan 18 dagen, geen aantasting meer kreeg. Ook dit is te verklaren door stofwisselingsverschijnselen. Zooals later zal blijken, kan men de schadelijke ammoniakophooping bij de omzetting van pepton doen verminderen door toevoeging van suiker, waardoor deze ammoniak verbruikt wordt (Butkewitsch 1903).

Bij oudere cultures echter is de hoeveelheid suiker niet voldoende en krijgt men toch een ophooping van ammoniak. Met Nessler's reagens krijgt men in een cultuur van pepton-glucose-saccharose-agar van 14 dagen geen oranje neerslag, wel echter in een cultuur van 3 weken. Later zal echter op deze invloed van de koolhydraten nader worden ingegaan (blz. 40).

Invloed van een eenvormige voeding.

In alle vorige gevallen stond de schimmel slechts een korte tijd op dezelfde voedingsbodem. Men zou zich echter voor kunnen stellen, dat slechts na een langdurige groei op een bepaalde voedingsbodem een invloed hiervan op de virulentie te bemerken is. Daartoe werd *Sclerotinia* eenige tijd op dezelfde bodem gehouden, waarop dus steeds weer op deze wijze overgeënt werd. Nadat de schimmel eenige maanden tot meer dan een jaar op verschillende bodems had gestaan, werden er infectie-proeven mee gedaan. Er werden zoowel cultures van 7—9 dagen als van 14 dagen gebruikt. Het bleek, dat alleen bij moutsalep en saccharose 4% en 40% een verandering optrad.

Na een langdurige groei op moutsalep-agar is de virulentie van de schimmel verdwenen. Macroscopisch ziet de cultuur er ook anders uit; het mycelium is vaak bruinachtig gekleurd en langs de rand heeft stromavorming plaats; er worden weinig sclerotiën gevormd, terwijl het substraatmycelium een taaie laag vormt.

Microscopisch is er echter weinig verschil; de inhoud van de cellen blijft onveranderd; alleen ziet men, dat de vaste laag gevormd wordt, doordat de hyphen zich samen vlechten.

Ent men van een dergelijke cultuur over op pepton-glucose-saccharose-agar, dan ziet de cultuur hierop er zeer abnormaal uit; het mycelium is n.l. bruin en grijs, dus afwijkend gekleurd, en vormt weer, evenals op moutsalep, een vaste laag. Ook heeft er stromavorming plaats, terwijl er geen sclerotiën ontstaan. Infectieproeven met dergelijke cultures geven een negatief resultaat.

Op foto I ziet men deze abnormale cultures op moutsalep en pepton-glucose-saccharose-agar naast de normale 14-daagsche cultures op deze bodems.

Op 4% en 40% saccharose-agar was de schimmel slechts eenige maanden te houden, want de groei hield tenslotte op. Zoolang er groei was kreeg men evenwel ook nog infectie.

Met cultures op 1% pepton kreeg men weer na 7 dagen wel een infectie, met cultures, die 14 dagen oud waren, daarentegen geen infectie.

Tabel IV geeft de resultaten weer van infectieproeven met 14-daagsche cultures, die eenvormig gevoed waren.

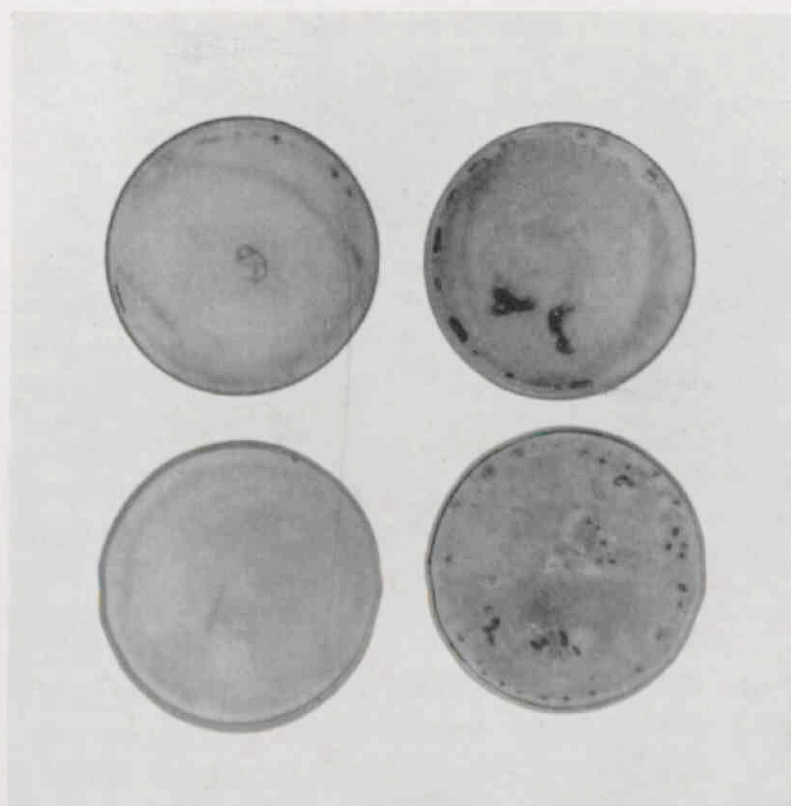


FOTO I.

14 daagsche reincultures van *Sclerotinia sclerotiorum*.

beneden links: Na eenvormige voeding op moutsalep;

rechts: Normale cultuur op moutsalep.

boven links: Overent v. d. abnormale cultuur op moutsalep
op pepton-glucose-sacch.-agar;

rechts: Normale cultuur op pepton-gluc.-sacch.-agar.

TABEL IV

Bodem	Aantal geïnfect. planten	Aantal planten dood
X-agar	72	62
pepton-gluc.-sacch.-agar	108	101
alk. bouillon-agar. . .	9	8
mout-agar	24	11
moutsalep-agar . . .	50	0
cellulose-agar	6	2
saccharose-agar 4 % .	18	11
saccharose-agar 40 % .	12	9

In de meeste gevallen zien we dus, dat bij *Sclerotinia sclerotiorum* een eenzijdige voeding geen schadelijke invloed op de virulentie heeft, waarbij de cultures op moutsalep een uitzondering maken.

Met de stam Whetzel II van *Sclerotinia sclerotiorum* werden slechts enkele proeven genomen. Met cultures, die gegroeid waren op aardappel-, boon- en mout-agar, kreeg men een flinke aantasting. Er was, wat de virulentie na een groei op deze voedingsbodems betreft, geen verschil te zien met de oude stam C. B. S.

Uit de voorgaande proeven is gebleken, dat, hoewel in enkele gevallen wel een invloed van de bodem op de virulentie te zien is, de virulentie, door het kunstmatig in cultuur houden van de schimmel, toch niet achteruit behoeft te gaan. Hierop wijst ook het feit, dat de 10 jaar in cultuur zijnde stam van *Sclerotinia sclerotiorum* nog zoo virulent is.

Verder blijkt, dat men uit het al of niet goed groeien van een schimmel op een bepaalde bodem niet met zekerheid conclusies kan trekken omtrent haar virulentie. De mate van groei is geen criterium. Op 1% pepton-agar groeit de schimmel vrij behoorlijk, waarbij echter geen infectie plaats heeft, terwijl op 4% en 40% saccharose-agar de groei slecht is en daarbij toch een groote virulentie bestaat.

Ook het al of niet vormen van sclerotiën is niet belangrijk in dit opzicht; bovendien wisselt deze sclerotiënvorming sterk, zelfs

bij één bepaalde bodem. Maar vergelijkt men de proeven, waarbij tomatenplanten geïnfecteerd werden met *Sclerotinia* uit schalen zonder sclerotiën, met die, waarbij geïnfecteerd werd met mycelium + sclerotiën, dan blijkt er geen verschil te zijn.

3. Invloed van de stikstofvoeding van de schimmel.

a. literatuur.

Al is er in de literatuur vrijwel niets bekend over de invloed van de stikstofvoeding op de virulentie, toch hebben verscheidene onderzoekers de groei van *Sclerotinia sclerotiorum* en verwante schimmels bij verschillende N-verbindingen onderzocht, terwijl ook de stofwisseling van *Aspergillus niger*, die evenals *Sclerotinia* veel oxaalzuur afscheidt, nauwkeurig onderzocht is.

Behrens (1893) zag bij *Sclerotinia libertiana* (= *Scl. sclerotiorum*) en *Sclerotinia fuckeliana* een goede groei op voedingsoplossingen met pepton, asparagine, KNO_3 of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als eenige N-bron, op de laatste 3 bijna even overvloedig.

Laurent (1888, 1889) onderscheidde schimmels, die met KNO_3 goed groeiden (*Cladosporium herbarum*, *Mucor racemosus*, *Aspergillus glaucus* en *Alternaria tenuis*) en andere, die beter met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ groeiden (*Aspergillus niger*, *Botrytis*). Toch zijn die uit de eerste groep niet als echte nitraatschimmels te beschouwen, want geeft men ze b.v. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, dan groeien ze hierop heel goed.

Nikitinsky (1904) heeft de invloed van de voeding op het vormen van stofwisselingsproducten uitgebreid onderzocht, speciaal bij *Aspergillus niger*. Het blijkt dat de N-voeding allerlei veranderingen in de stofwisseling teweeg kan brengen. Zoo krijgt men b.v. bij *Aspergillus niger* o.a. met NH_4NO_3 , pepton, ammoniumoxalaat, ammonium-phosfaat en KNO_3 vrij veel oxaalzuurvorming, echter niet (onder dezelfde omstandigheden) met NH_4Cl en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Wanneer de N in de vorm van een zout wordt gegeven, komt bij het verbruik van de stikstof het zuur vrij. Al naar het vermogen van de schimmel om dit zuur verder te verwerken of niet krijgt men wel of niet een ophooping van het zuur. De ophooping van dit zuur kan weer schadelijk zijn voor de ontwikkeling van de schimmel; de groei houdt op. Men ziet zoo bij gebruik van ammoniumzouten van organische zuren geen remming

in de groei optreden. Het blijkt dus, dat de remming, die optreedt, in heel veel gevallen niet door oxaalzuur veroorzaakt wordt, zooals meestal wordt aangenomen, maar door het zuur, dat vrij komt uit de N-bron. Toch kan de vorming van oxaalzuur ook wel optreden en schadelijk werken, b.v. wanneer men KNO_3 als stikstofvoeding geeft.

Ritter (1909, 1911) vindt, dat *Aspergillus niger* en *Botrytis cinerea* een grootere opbrengst geven met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan met KNO_3 . Hij vindt verder, dat ammonium-nitraat, dat zoo vaak als N-bron voor schimmels wordt gebruikt, dikwijls een kleine oogst geeft en evenmin als NH_4Cl geschikt is. Hij bespreekt verder ook nog de nitraat-assimilatie. Meestal wordt aangegeven, dat de nitraten eerst tot nitriet, dan tot ammoniak worden gereduceerd. Maar het is slechts voor een enkele schimmel bewezen. Laurent vond de reductie tot ammoniak wel bij *Cladosporium herbarum*, *Penicillium glaucum*, *Mucor racemosus* en *Alternaria tenuis*, niet bij *Aspergillus niger*, *Aspergillus glaucus* en *Botrytis cinerea*.

Ritter vindt het onwaarschijnlijk, dat, waar zoowel bij de hoogere planten als bij de nitraat assimileerende bacteriën het vermogen bestaat om de nitraten te reduceeren, dit vermogen bij de schimmels ontbreken zou. Hij wijst er op, dat de nitrieten in zure oplossingen erg onbestendig zijn, en wijt het hieraan, dat Laurent geen nitrieten vond. Hij doet de proeven daarom nog eens over en vindt nitrietvorming bij alle nitraat-assimileerende schimmels; hoe het proces verder gaat na de nitrietvorming is niet positief bekend. Vaak wordt beweerd, dat er ammoniak gevormd wordt, wat wel waarschijnlijk, maar volgens Ritter niet bewezen is. De ammoniak, die vaak in de schimmelcultures ontstaat, kan volgens hem ook een product van proteolyse zijn.

Westerdijk (1911) vond bij *Sclerotinia libertiana* (= *Scl. sclerotiorum*) met pepton, proteïne, legumine, KNO_3 en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nergens bijzonder goede groei, het beste nog met pepton.

Killian (1921) wijst er op, dat het van de organische N-verbindingen als pepton, albumine bekend is, dat zij de vorming van luchtmycelium en de intensiteit van de kleurstofvorming bevorderen. De concentratie van de N-zouten kan sterk veranderen, zonder dat er een invloed te bespeuren valt; dit is in tegenstelling met de

invloed van het C-gehalte. Een vermindering van C-gehalte geeft direct minder myceliumvorming.

Killian komt tot de conclusie: hoe meer een organisme gespecialiseerd is, des te hogere N-verbinding heeft het voor zijn voeding nodig. Nitraat is niet voor alle schimmels geschikt, omdat het de bodem alkalisch maakt, zoodat alleen die schimmels er op groeien, welke door zuur-afscheiding dit alkali kunnen binden.

Vasudeva (1930) doet infectieproeven met *Botrytis allii*, waarmee hij appels infecteert. Hij infecteert door sporen in een wond te brengen en voegt hierbij een druppel van verschillende synthetische voedingsoplossingen. Het blijkt, dat hier vooral de stikstof een groote rol speelt; neemt hij b.v. een druppel Brown'sche voedingsoplossing ¹⁾, dan heeft er een sterke aantasting plaats. Laat hij echter de asparagine weg, dan is de aantasting veel minder sterk; laat hij de glucose weg, dan ziet men minder invloed. Met asparagine alleen is de aantasting even sterk als met een volledige voedingsoplossing. In een oplossing met pepton, glucose en mineralen is de pepton het voornaamste. Hij neemt ook nog andere N-verbindingen als KNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, waarbij hij overal een flinke aantasting krijgt.

Hij doet ook proeven met *Monilia fructigena* en krijgt hierbij ook een sterkere aantasting door toevoeging van stikstofverbindingen.

Vasudeva ziet, dat de toevoeging van N-verbindingen een invloed heeft op de vorming van pectinase, een enzym, dat *Botrytis allii* afscheidt. Kweekt hij *Botrytis allii* in zijn appelextract, dan heeft er geen enzymvorming plaats; voegt hij N toe, dan wel. Het blijkt ook, dat sterke groei niet altijd sterke enzymvorming ten gevolge hoeft te hebben.

b. eigen proeven.

Om de invloed van de stikstofvoeding op de virulentie van *Sclerotinia sclerotiorum* na te gaan, werden verschillende synthetische voedingsbodems gemaakt, bevattend:

2% saccharose; 0,5% KH_2PO_4 ; 0,25% MgSO_4 ; 1% KNO_3 en 2% agar, terwijl in plaats van 1% KNO_3 telkens andere N-verbindingen gegeven werden; de concentratie van deze verbindingen

¹⁾ Brown'sche voedingsoplossing bevat per L. 2 gr. glucose, 2 gr. asparagine en 1,25 gr. K_3PO_4 .

was een zoodanige, dat ze aequivalente hoeveelheden stikstof bevatten.

De reden, dat hier agar-bodems genomen werden en geen voedingsoplossingen, is de volgende: het bleek, dat *Sclerotinia sclerotiorum* wel in vloeibaar medium groeide, maar langzamer dan op vaste bodems. Bovendien was het resultaat van infectieproeven met een schimmelmassa uit de voedingsoplossingen ook niet zoo goed; het bleek, dat het mycelium zich dan niet zoo goed in de grond ontwikkelde. Letow (1930) vindt bij zijn proeven met *Sclerotinia libertiana*, dat deze schimmel, als reïncultuur in de grond gebracht, zich hierin niet verder ontwikkelt. Voor mijn verdere proeven heb ik dus steeds agar-bodems gebruikt; de reeksen worden alleen naar de N genoemd.

Met 1% KNO_3 ; 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4% NH_4NO_3 ; 0,5% NH_4Cl ; 0,5% $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$; 0,3% ureum; 0,5% asparagine en 1% asparagine was de groei van *Sclerotinia sclerotiorum* stam C. B. S. heel goed: flinke mycelium- en sclerotievorming. Met KNO_3 kreeg men soms een groote hoeveelheid kleine sclerotien van 2×2 mM, terwijl de normale grootte $3-4 \times 4-8$ mM bedraagt.

Met 2% pepton¹⁾ was de groei ook heel goed, maar het mycelium vormt soms een taaie laag en de sclerotien worden vaak, behalve over de schaal verspreid, ook langs de rand aangelegd. Foto II geeft cultures van *Sclerotinia sclerotiorum* te zien, die 14 dagen oud zijn: bovenste rij links met NH_4Cl , rechts met pepton als N-bron: onderste rij links met NH_4NO_3 , rechts met asparagine; de sclerotien langs de rand bij pepton zijn duidelijk te zien.

Een paar proeven werden gedaan met resp. 1% en 1,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ om te zien of verhooging van de concentratie invloed had; de groei op deze bodems was geheel gelijk aan die met 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Met cultures van *Sclerotinia*, die 14 dagen op deze verschillende bodems gestaan hadden, werden nu infectieproeven gedaan op de reeds beschreven manier (blz. 15).

Het bleek, dat met de meeste N-verbindingen de virulentie groot was. Alleen met pepton was er een vermindering te bemerken, terwijl het gedrag bij toevoeging van KNO_3 en asparagine wisselend was: soms was de aantasting groot, soms klein.

¹⁾ Er werd steeds pepton Chassaing gebruikt.

Verder bleek, dat, wanneer de uitwendige omstandigheden bijzonder gunstig voor de infectieproeven waren (dus niet te hoge temperatuur en een groote vochtigheid), men ook met een cultuur, die als N-bron pepton had gehad, soms een flinke aantasting kreeg.

Foto III geeft het beeld van een serie weer, 6 dagen nadat de tomatenplanten verspeend waren in de geïnfecteerde grond.

Van links naar rechts ziet men planten geïnfecteerd met cultures, die als N-bron resp. kregen pepton, asparagine, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en KNO_3 .

Tabel V geeft de resultaten weer van de infectieproeven met 14-daagsche cultures met verschillende voeding.

TABEL V

Infectieproeven met 14 dagen oude cultures van
Sclerotinia sclerotiorum

Bodem	Aantal geïnfect. planten	Aantal planten dood	% dood
1 % KNO_3	111	66	59,9
0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. . .	110	78	70,9
0,4 % NH_4NO_3 . . .	118	104	88,1
0,5 % NH_4Cl	177	142	80,2
0,5 % $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$. .	114	89	78,1
0,3 % ureum	87	54	62,1
0,5 % asparagine . . .	162	71	43,8
2 % "	45	24	53,3
2 % pepton	165	60	36,4
1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. . .	105	79	75,2
1,5 % "	27	25	92,5

Er is dus wel eenig verschil te zien; met pepton slaagt slechts 36,4% van de infecties, terwijl ook met KNO_3 , asparagine en ureum het percentage in vergelijking met de rest vrij laag is; ammoniumverbindingen zijn blijkbaar een goede N-bron voor *Sclerotinia sclerotiorum*.

Verder blijkt verhooging van de concentratie van de N-bron weinig invloed te hebben. Vergelijkt men de resultaten van 0,5%

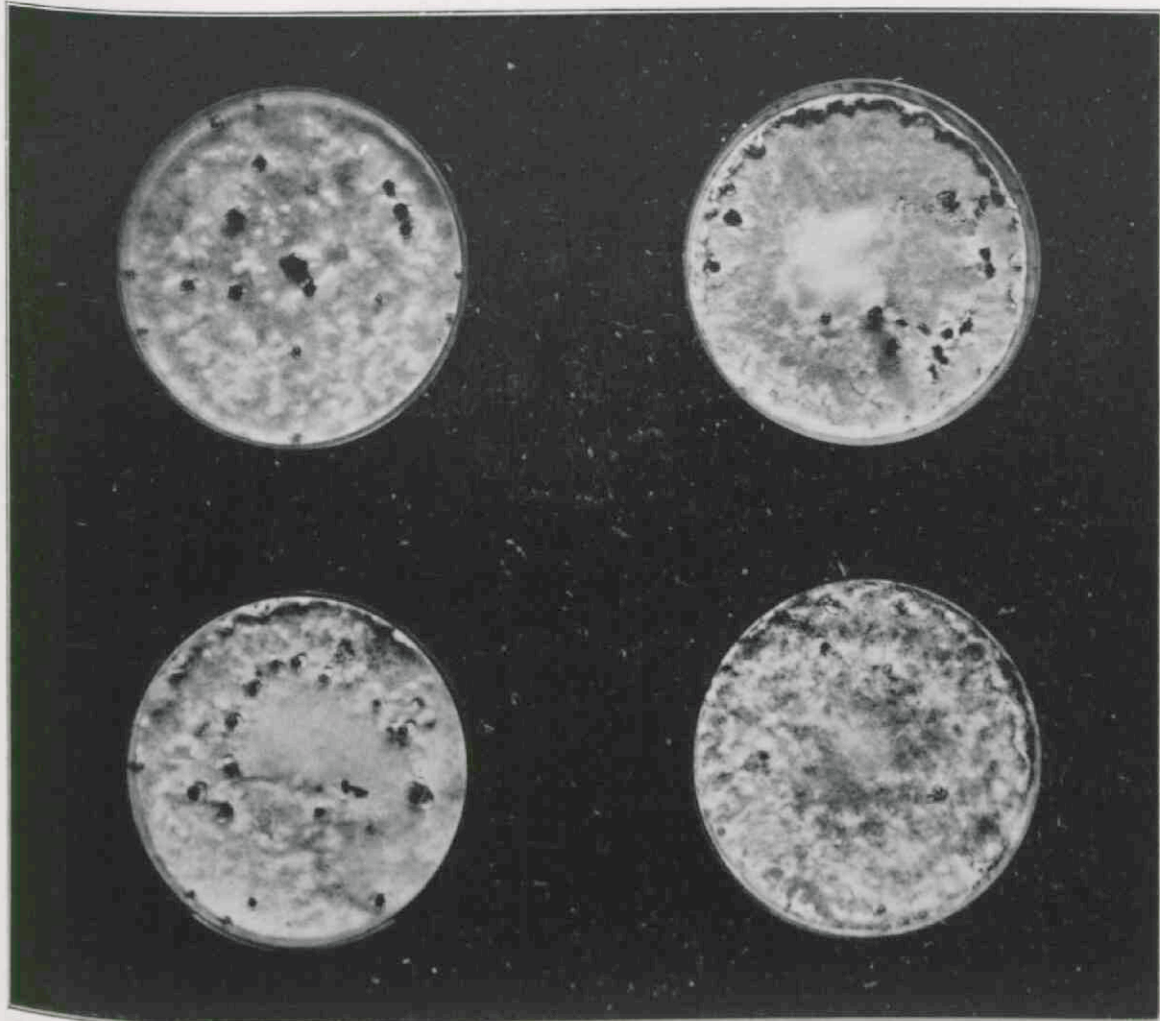


FOTO II.

14 daagsche reincultures van *Sclerotinia sclerotiorum* met verschillende N-bron.
 boven links: met NH_4Cl ; rechts met pepton. beneden links: met NH_4NO_3 ; rechts met asparagine.



FOTO III.

Tomatenkiemplanten geïnfecteerd met 14 daagsche cultures van *Sclerotinia sclerotiorum* na versch. N-voeding v. d. schimmel.

Van links naar rechts: Met KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; asparagine en pepton.

TABEL VI

Bodem	Aantal geïnfect. planten	Aantal planten dood	Temp. in ° C.	
			minimum	maximum
2 % asparagine . . .	15	5	9—14	24
	6	6	6—12	23
	12	8	3— 8	15—23
	12	5	11	23—30
0,5 % „ . . .	12	12	13—16	18—23
	9	7	10—12	26—30
	12	11	9—11	29—33
	51	12	12	26—35
	60	19	buiten	buiten
	18	10	7—11	28
2 % pepton	15	1	1— 9	24
	12	10	6—12	23
	12	12	3— 8	15—23
	12	2	11	23—30
	12	5	13—16	18—23
	18	13	9—11	29—33
	30	5	12	26—35
	18	5	4	25
	36	7	11	25— 28
	15	9	9—14	24
1 % KNO ₃	12	11	6—12	23
	12	11	3— 8	15—23
	12	1	11	23—30
	6	5	13—16	18—23
	12	7	4— 8	30
	12	10	9—11	29—33
	21	3	12	26—35
	9	9	10—15	20—24
	15	12	9—14	24
	12	12	6—12	23
1 % (NH ₄) ₂ SO ₄ . . .	12	8	11	23—30
	9	8	17—20	20—23
	12	10	13—16	18—23
	12	4	13—26	20—32
	12	5	1— 7	25—31
	12	12	9—11	25—32
	9	8	9—11	29—33
	12	12	17—20	20—23
	12	11	10—14	32
	12	7	1— 7	25—31
0,5 % (NH ₄) ₂ SO ₄ . .	3	3	10—12	27—31
	17	17	11—13	27—30
	54	28	12	26—35

asparagine met die van 2%, dan loopt het percentage gedooide planten slechts weinig uiteen. Evenzoo is dit het geval met 0,5% en 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; het heel hoge percentage bij 1,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ is natuurlijk niet geheel met de andere te vergelijken, aangezien het aantal gebruikte planten hier heel klein was. Men kan pas een conclusie trekken uit een groot aantal planten. Werkt men met kleine series, dan kan men vaak tot verkeerde conclusies komen, daar de individueele verschillen ook een rol spelen.

De getallen uit tabel V zijn verkregen uit verschillende reeksen; tabel VI nu geeft weer, hoe de infectie in die verschillende series verliep, tenminste voor een paar bodems. Tevens is hierbij weer aangegeven de temperatuur gedurende de proef.

Zooals vroeger reeds gezegd is, varieerde de temperatuur in de kas sterk, zoodat ook hier weer de gemiddelde min. en max. temperatuur genomen is. Eén serie bij 0,5% asparagine werd buiten in de schaduw ingegraven, aangezien het toen zoo buitengewoon warm was, dat de temperatuur in de kas de geheele dag boven de 30°C bleef.

Uit dergelijke uitkomsten kan men dus alleen de conclusie trekken, dat met pepton als N-bron in de meeste gevallen een verminderde virulentie optreedt, tenminste bij deze cultures, die 14 dagen oud zijn.

Toch is de groei, zooals reeds gezegd is, op deze bodems met pepton juist bijzonder goed: er wordt veel mycelium gevormd en de sclerotien zijn groot. Microscopisch ziet men geen verschil met de andere cultures.

Invloed van de ouderdom van de cultures.

De cultures, die voor de vorige proeven gebruikt werden, waren 14 dagen oud, wat betrekkelijk jong is. Er werd nu nagegaan, hoe de infectie verliep, wanneer men cultures gebruikte die 19—21 dagen oud waren.

Men kreeg nu een veel grooter verschil te zien. Er hebben alleen duidelijke infecties plaats met cultures die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ NH_4Cl of NH_4NO_3 als N-bron gehad hadden. Tabel VII geeft het resultaat weer.

Er is dus een groot verschil te zien; op de eene bodem verliest

de schimmel veel sneller zijn virulentie dan op de andere. Deze achteruitgang van de virulentie bij de oudere cultures wordt waarschijnlijk veroorzaakt door ophooping van stofwisselingsproducten; macroscopisch en microscopisch ziet men geen verschil met de jonge cultures. Nikitinsky (1904) heeft er al op gewezen, dat de stofwisselingsproducten sterk veranderen met de voedingsbodem;

TABEL VII

Infectieproeven met cultures van *Sclerotinia sclerotiorum*,
die 14—21 dagen oud zijn

Bodem	Aantal geïnfect. planten	Aantal planten dood	Temp. in ° C.	
			minimum	maximum
0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. .	40	29	5,5	25—29
0,5 % NH_4Cl	40	28	5,5	25—29
0,4 % NH_4NO_3 . . .	30	17	5,5	25—29
0,3 % ureum	60	0	10—11	20—37
0,3 % „	45	1	15	25
0,3 % „	36	2	5—8	12—25
1 % KNO_3	60	0	10—11	20—37
1 % „	42	1	15	25
1 % „	36	0	5—8	12—25
0,5 % $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$. .	60	1	10—11	20—37
0,5 % „	45	13	15	25
0,5 % „	36	0	5—8	12—25
2 % pepton	40	0	5,5	25—29
0,5 % asparagine . .	60	4	10—11	20—37
0,5 % „	45	1	15	25
0,5 % „	36	0	5—8	12—25

zoo krijgt men b.v. met pepton een ophooping van ammoniak (Butkewitsch).

Brown (1923) heeft onderzoekingen gedaan over de z.g. „staling” van cultures; hieronder verstaat hij de toestand van een cultuur, waarbij de groei verminderd of opgehouden is. Deze ontstaat niet, doordat de voedingsstoffen uit de voedingsbodem gehaald zijn, maar doordat de schimmel zelf stoffen afscheidt, die tenslotte de

groei belemmeren. Brown onderscheidt het 'staling type' en het 'non-staling type'; tot het eerste type behoort *Fusarium*, tot het tweede *Botrytis*. Op de eene voedingsbodem heeft het proces sterker plaats dan op de andere; ook de dikte van de voedingsbodem en de temperatuur spelen een rol. De stoffen, die het veroorzaken, zouden gasvormig zijn en ontstaan door de stofwisseling van de schimmel. Volgens Brown is het v.n.l. ammoniak en dit zou in de voedingsbodem oplossen.

Het is hoogst waarschijnlijk, dat de achteruitgang van de virulentie, die ik in sommige gevallen in mijn cultures van *Sclerotinia sclerotiorum* zag optreden, veroorzaakt wordt door een dergelijke ophooping van stofwisselingsproducten. Hiervoor spreekt ook het feit dat, wanneer men met cultures, die pepton als N-bron hadden gehad en die slechts 8 dagen oud waren, infecteerde, men dan wel een sterke infectie krijgt (van de 84 planten gingen er 69 dood), terwijl, zooals vroeger reeds gevonden is, met cultures die 14 dagen oud zijn slechts een geringe infectie plaats heeft en na 3 weken geen infectie meer.

Inderdaad kon ik met Nessler's reagens aantonen, dat er in cultures, die pepton als stikstof hadden gekregen en 8 dagen oud waren, slechts weinig ammoniak gevormd was: er ontstond een geel neerslag. In cultures die 2 en 3 weken oud waren kreeg ik een oranje neerslag.

Wanneer men KNO_3 als N-bron gegeven had, zag men het volgende: na 14 dagen kreeg men met Nessler's reagens een geel tot licht oranje neerslag, na 3 weken een oranje neerslag. Zooals we reeds gezien hebben, was de virulentie in dergelijke 3 weken oude cultures zeer klein.

Ent men van zoo'n 14-daagsche cultuur op pepton over op b.v. NH_4NO_3 en infecteert men met een dergelijke cultuur, nadat zij 14 dagen op deze bodem gegroeid is, dan krijgt men direct weer het normale percentage van infectie (van de 74 planten gingen er 64 dood).

Opmerkelijk is, dat, zooals vroeger al werd beschreven, de virulentie van de cultures op de voedingsbodem pepton-glucose-saccharose-agar zoo groot was. Hierop zal echter verder worden ingegaan in het volgende hoofdstuk, waar de invloed van de C-bron zal worden besproken.

Invloed van een eenvormige voeding.

Bovendien werd nog nagegaan, of men een invloed kon bemerken, wanneer de schimmel geregeld op dezelfde bodem werd overgeënt. Hiertoe werd op de bodems met pepton, asparagine, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en KNO_3 als N-bron de schimmel ook weer een jaar gehouden. Er had dus geen overenting plaats, zooals gewoonlijk, van de eene voedingsbodem op de andere. Infectie met dergelijke cultures, die 12 dagen oud waren, gaven weer hetzelfde beeld: op pepton een groote achteruitgang van de virulentie (van de 40 planten ging er maar één dood). Met de andere cultures kreeg men een behoorlijke infectie; met asparagine als N-bron ging er 60% van de planten dood, met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 95,2% en met KNO_3 96,9%. Infecteert men echter met dergelijke pepton-cultures, wanneer ze pas 7 dagen oud zijn, dan krijgt men hiermee weer een sterke infectie. Dit wijst er ook weer op, dat men door stofwisselingsproducten bij oudere cultures een schadelijke werking krijgt. Verder blijkt uit deze proeven, dat men ook op synthetische bodems geen verandering van de virulentie krijgt door eenzijdige voeding.

De vorige proeven zijn allemaal genomen met de stam C. B. S. van *Sclerotinia sclerotiorum*. Ook met de stam Whetzel II werd nu het gedrag bij verschillende stikstofvoeding nagegaan.

TABEL VIII

Infectieproeven met cultures van *Sclerotinia sclerotiorum*
stam Whetzel II

Bodem	Aantal geïnfect. planten	Aantal planten dood	% dood
1 % KNO_3	105	47	44,7
0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. .	105	88	83,8
0,4 % NH_4NO_3 . . .	120	70	58,3
0,5 % NH_4Cl	108	59	54,3
0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$. .	102	73	71,5
0,3 % ureum	101	54	53,5
0,5 % asparagine . . .	167	23	13,8
2 % pepton	102	3	2,9

Er bleek een groote overeenkomst te zijn met de vorige stam, alleen was over het algemeen genomen deze nieuwe stam iets minder virulent. De grootste virulentie werd weer gevonden, wanneer men ammoniumverbindingen als N-bron gaf; met ureum kreeg men ook nog een vrij sterke aantasting, minder sterk met KNO_3 en met asparagine een heel klein percentage, terwijl men met pepton als N-bron vrijwel geen aantasting kreeg.

Tabel VIII geeft de resultaten weer van de infectieproeven met cultures, die 12 tot 14 dagen oud waren.

Deze stam, hoewel pas 2 jaar kunstmatig voortgekweekt, is toch zeker niet virulenter dan de oude stam, die nu reeds 10 jaar kunstmatig gekweekt wordt.

c. verandering van de pH.

Het is bekend dat *Sclerotinia sclerotiorum* oxaalzuur vormt; dit werd al door De Bary in 1886 gevonden. Door mij werd nu nagegaan, of de pH van de bodem sterk veranderde en of dit varieerde bij de verschillende stikstofvoeding. Nikitinsky (1904) heeft er al op gewezen, dat men bij *Aspergillus niger* bij de stofwisseling niet alleen een ophooping van oxaalzuur kan krijgen, maar ook van het zuur van het gegeven zout.

De pH van de bodem werd colorimetrisch bepaald. In die gevallen, waar de voedingsbodem sterk geel gekleurd was, dus vooral bij de peptonbodems, werd de foliën-kolorimeter met indicatorfoliën naar Wulff gebruikt.

Zoo werd eerst de pH van de bodem bepaald en verder de pH, nadat de schimmel er 14 resp. 21 dagen op gegroeid had.

In de verschillende schalen van éézelfde serie liep de pH soms sterk uiteen, ook dan, wanneer in de verschillende schalen de schimmel even sterk gegroeid was. Toch zal er wel een verschil zijn, wat een eerder of later optreden van de stofwisselingsverschijnselen ten gevolge heeft.

Vooraf op pepton wisselde de pH sterk; hiermee kan ook samenhangen het verschil, dat soms optreedt bij de infectie. In die gevallen, waar de pH 6,5—6,2 was, kreeg men juist vrijwel geen infectie. Maar daar in het begin van het onderzoek niet geregeld de pH van elke cultuur, gebruikt voor infectieproeven, bepaald werd, zijn hiervoor niet voldoende bewijzen.

In de meeste gevallen was de bodem na 14 dagen overal erg zuur geworden; na 3 weken was er een duidelijk verschil te zien.

Het bleek nu, dat juist in die gevallen, waar men na infectie met 3 weken oude cultures nog een groote aantasting kreeg, de pH vrijwel niet veranderd was, terwijl in de overige gevallen de bodem minder zuur was geworden. De volgende tabel geeft een overzicht van de verandering van de pH.

TABEL IX

Bodem	Begin pH	pH na 14 dagen	pH na 3 weken
0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,8	2,6	2,4
0,5 % NH_4Cl	4,6	3,1	2,6
0,4 % NH_4NO_3	4,5	2,4	2,6
0,5 % $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$	5,4	2,4	$\pm 5,0$
1 % KNO_3	4,9	2,6—3,5	$\pm 5,2$
0,3 % ureum	6,6	3,3—5,3	5,0—5,4
0,5 % asparagine	4,8	2,4	4,3—4,4
2 % pepton	4,6	4,2—6,4	6,3

Deze resultaten maken het inderdaad zeer waarschijnlijk, dat de achteruitgang van de cultures komt door een ammoniakophooping, zooals Butkewitsch (1903) dit voor *Aspergillus niger* heeft gevonden, want hierdoor wordt de bodem minder zuur. Naast de schadelijke ammoniakophooping is misschien ook belangrijk voor de verminderde virulentie het feit, dat de enzymen van de schimmel het beste in een zuur milieu werken (Laurent, 1899; Vasudeva, 1930). Toch is de hogere pH op zichzelf niet schadelijk, wat uit de volgende proeven blijkt. Bij de bodems met pepton, KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , en NH_4NO_3 als N-bron, werd, door naast KH_2PO_4 ook K_2HPO_4 als fosphaat te geven, de pH verhoogd tot 6, 5—6, 7. De groei op deze bodems was heel goed.

Infectieproeven met dergelijke cultures gaven weer met pepton vrijwel geen aantasting en met ammoniumverbindingen een sterkere aantasting dan met KNO_3 . Men kreeg hier dus ook weer het gewone verloop. De pH liep ook weer sterk terug; tabel X geeft dit weer.

TABEL X

Bodem	Begin pH	pH na 14 dagen
1 % KNO_3	6,5	3,6
0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,5	2,6—3,3
0,5 % NH_4Cl	6,7	2,6
0,4 NH_4NO_3	6,5	2,6—3,7
2 % pepton	6,5	3,7—5,0

Wanneer we dus de resultaten van alle vorige proeven samenvatten, dan zien we, dat bij de oudere cultures de stikstofvoeding een invloed op de virulentie kan uitoefenen, doordat er een schadelijke ophooping van stofwisselingsproducten plaats heeft; vooral de gevormde ammoniak speelt hier een groote rol.

4. Invloed van de koolstofvoeding van de schimmel.

a. literatuur.

Over het gedrag van schimmels bij verschillende koolstofvoeding zijn vele onderzoeken gedaan, hoewel er niet op de verandering van de virulentie gelet werd. In het algemeen blijkt wel, dat verandering van concentratie van de koolstofbron een groote verandering in de ontwikkeling van de schimmel teweegbrengt. Dit is dus heel wat anders dan bij stikstof het geval was.

Butkewitsch (1903) vindt bij zijn proeven met *Aspergillus niger*, dat, wanneer men deze schimmel pepton als eenige C- en N-bron geeft, men een schadelijke ophooping van ammoniak krijgt. Wanneer hij bij de peptonbodems veel suikers toevoegt, dan heeft er geen ammoniakophooping plaats; zoo krijgt hij b.v. met 4% pepton en 10% suiker geen ophooping, wel met 0.2% en 6% suiker. Het blijkt, dat bij deze lage concentraties alle suiker aan het eind van de proef uit de oplossing verdwenen is.

Nikitinsky (1904) vindt sterke stijging in het schimmeldrooggewicht bij verhoogde concentratie van de C-bron (bij zijn experimenten met *Aspergillus niger*). Suiker blijkt hier bij hooge

concentratie een minder goede C-bron te zijn, bij lage concentratie een heel goede.

Westerdijk (1911) vond bij *Sclerotinia libertiana* op glucose, saccharose en fructose een vrij langzame groei. Lactose en zetmeel scheen *Sclerotinia* niet goed te kunnen verteren; verder was de schimmel in staat met cellulose als eenige C-bron te groeien.

Killian (1921) ziet bij zijn *Monilia cinerea* goede groei op verschillende koolhydraatbodems, b.v. op arabinose, dextrose, fructose, galactose, mannose, saccharose en maltose (lactose iets minder goed). Dextrinum en raffinose zijn niet goed en inuline, zetmeel en cellulose zijn slecht geschikt: op de laatste heelemaal geen groei, op de andere twee vrijwel geen vorming van luchtmycelium, alleen wat substraatmycelium. Hij vindt, dat het C-gehalte van de vloeistof alleen invloed uitoefent op de groeisnelheid. Een vermindering van het C-gehalte geeft direct vermindering in myceliumontwikkeling.

Vasudeva (1930) vindt bij zijn infectieproeven met *Botrytis allii* op appels, dat de verhitte appels, welke minder saccharose, maar meer gereduceerde suikers bevatten, heviger worden aangetast. Hij begrijpt niet, waardoor het komt, want ze groeien op bodems met deze beide verschillende suikers even goed. Hij komt dan tot de conclusie, dat hier een veranderde permeabiliteit een rol speelt, waardoor de N beter naar buiten kan diffundeeren. Hij vond n.l. door toevoeging van N een betere aantasting; maar de hoeveelheid N in de verhitte en onverhitte appels blijft dezelfde. Misschien kan de oplosbare N beter uit de verhitte appels diffundeeren. Toch is het best mogelijk, dat de suiker hier ook een rol speelt.

b. eigen proeven.

Bij mijn proeven over de invloed van de stikstof werd een groot verschil in virulentie gevonden tusschen de cultures, welke naast pepton als N-bron alleen saccharose als C-bron kregen en die, waarbij glucose-saccharose was toegevoegd. Nu is de verdere samenstelling van de pepton-glucose-saccharose-bodem ook verschillend, o.a. bevat het $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Het zou dus ook een invloed van nitraat of Ca kunnen zijn. Daarom werd het calciumnitraat weggelaten; ook nu werd een sterke infectie verkregen. Bovendien bevatte het slechts 1% pepton, terwijl de pepton-saccharose-agar

2% bevatte. Verwisselt men dit, dan krijgt men evenwel toch geen ander resultaat.

Daar echter ook de samenstelling van het milieu, wat de minerale zouten betreft, anders was, werd nu de volgende bodem gemaakt: 2% pepton, 0.5% KH_2PO_4 , 0.25% MgSO_4 , 3% glucose, 2% saccharose, 2% agar. Hiermee kreeg men ook weer een sterke aantasting, en ook, indien men in plaats van 2% pepton 1% pepton nam.

Nu was het percentage aan koolhydraten in de pepton-saccharose-agar eenerzijds en in de pepton-glucose-saccharose-agar anderzijds ook verschillend, dit was n.l. in het laatste geval grooter. Daarom werd nagegaan, hoe de infectie met de cultures van de pepton-saccharose bodems verliep, wanneer men in plaats van 2% saccharose 5% en 10% gaf.

Met 5% saccharose kreeg men nog een geringe aantasting, maar met 10% kreeg men een sterke infectie, van de 36 planten gingen er 31 dood. Dit zou er op wijzen, dat de schadelijke invloed werkelijk door een ophooping van ammoniak bij lage C-concentratie komt, zooals Nikitinsky en Butkewitsch vonden voor *Aspergillus niger*. Inderdaad krijgt men met Nessler's reagens in de cultures met pepton, waaraan 5% saccharose was toegevoegd, na 14 dagen nog een oranje neerslag; voegt men 10% saccharose toe, dan krijgt men na 14 dagen geen neerslag.

Er werden verder proeven genomen, waarin naast pepton en de mineralen verschillende suikers werden gegeven, en wel resp.: 2% glucose, 2% fructose, 2% lactose en 2% maltose. Infecteerde men met cultures van *Sclerotinia sclerotiorum* (stam C. B. S.), die 14 dagen op deze bodems hadden gestaan, dan zag men onderling weinig verschil; toch kreeg men een betere infectie dan met saccharose, echter niet zoo goed als met glucose-saccharose. Tabel XI geeft de resultaten weer.

Waardoor nu echter het groote verschil tusschen saccharose eenerzijds, de andere koolhydraten anderzijds, werd veroorzaakt, bleef onopgelost. De groei was op de verschillende bodems heel goed. Het is mogelijk, dat men resp. met glucose, fructose, lactose en maltose een andere stofwisseling krijgt, waardoor minder ammoniak opgehoopt wordt. Hierop wijst ook het feit, dat de pH met de andere koolhydraten ook niet zoo hoog wordt als met

saccharose. Met glucose, waar soms een vrij groote, soms een geringe aantasting plaats heeft, blijkt juist in die gevallen, waar de pH 3,4 tot 4,7 werd, een groote aantasting plaats te hebben. Waar

TABEL XI

Bodem	Aantal geïnfect. planten	Aantal planten dood	Temp. in ° C.	
			minimum	maximum
glucose	30	15	12—14	18—25
"	12	9	3—8	15—23
"	8	1	11	23—30
fructose	30	19	12—14	18—25
lactose	32	25	12—14	18—25
maltose	30	22	12—14	18—25

de pH 5,6 tot 6,4 werd, verkreeg ik een geringe aantasting.

De volgende tabel geeft de pH-verandering weer op de pepton-bodems met verschillende koolstofbron.

TABEL XII

Bodem	begin pH	pH na 14 dagen
glucose 2 %	4,7	3,4—6,4
maltose 2 %	5,0	3,4—3,7
lactose 2 %	4,7	3,2—3,8
saccharose 2 %	4,6	5,8—6,3
" 5 %	5,2	5,1
" 10 %	5,2	2,6—3,5
glucose 3 % sacch. 2 % .	4,9	2,8—3,4

Vervolgens werd nagegaan, of er verschil in virulentie was met varieerende C-bron en 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als N-bron; verder bevatte de voedingsbodem 0.5% KH_2PO_4 , 0.25% MgSO_4 en 2% agar. Met 2% saccharose, 2% glucose, 2% fructose en 2% galactose was de groei goed; er had sclerotievorming plaats. Met 2%

dextrinum, 1% maltose en 1% amyllum solubile was de groei vrij goed; er had sclerotiënvorming plaats; de sclerotiëen waren bij maltose vrij klein. Met cellulose was de groei ook vrij goed, doch er werden geen sclerotiëen gevormd. Met 1% gummi arabicum was de groei heel slecht.

Er werden nu weer tomatenkiemplanten geïnfecteerd met cultures, die 10 tot 16 dagen op deze verschillende bodems gestaan hadden. Het bleek, dat er weinig verschil in aantasting was. Alleen in die gevallen, waar gummi arabicum, amyllum solubile of cellulose gegeven werd, kreeg men een heel geringe aantasting. Nu was met gummi arabicum de groei ook heel slecht, maar met amyllum solubile en cellulose kreeg men een vrij behoorlijke groei. Door verscheidene onderzoekers is gevonden, dat verschillende *Sclerotinia*- en *Botrytis*-soorten in staat zijn cellulose door een enzym op te lossen (De Bary (1886), Marshall Ward (1888), Behrens (1898), Smith (1902)). Zodoende zijn ze in staat om op cellulose als eenige C-bron te groeien, hoewel niet overvloedig; ik kreeg evenwel met dergelijke cultures vrijwel geen infectie.

De pH na 14 dagen was met amyllum solubile 3.3—3.4, met gummi arabicum 3.7—4.4 en met cellulose 4.3—4.8, terwijl hij in de overige gevallen 2.8 was. Men ziet hier dus niet zulke groote pH-veranderingen als bij de pepton-bodems. Waarschijnlijk heeft men hier niet te doen met een schadelijke ophooping van stofwisselingsproducten, maar met een minder goede voeding van de schimmel.

Tabel XIII geeft een overzicht van de resultaten van de infectieproeven met cultures, die 10 tot 16 dagen oud waren.

TABEL XIII

Bodem	Aantal geïnfect. planten	Aantal doode planten	% dood
2 % saccharose	122	90	73,8
2 % glucose	29	22	75,8
2 % galactose	48	36	75,0
2 % dextrinum	102	64	62,4
1 % maltose	96	37	53,6
1 % lactose	48	28	58,3
1 % gummi arab.	122	10	8,2
1 % amyllum solubile	105	20	19,4
cellulose	18	4	22,2

Bovendien werden nog tomaten geïnfecteerd met cultures, die als C-bron glucose kregen en als N-bron resp. KNO_3 en asparagine. De groei hierop was goed. Men kreeg met KNO_3 93.7% infectie en met asparagine 59.4%. Ook met andere stikstofverbindingen is glucose een geschikte C-bron voor *Sclerotinia*.

De vorige proeven werden alle uitgevoerd met de stam C. B. S. Met de stam Whetzel II werden nu slechts nog enkele proeven gedaan; er werd nagegaan, of men hier ook met amyllum solubile en gummi arabicum een verminderde virulentie kreeg. Dit bleek inderdaad het geval te zijn. Op gummi arabicum was de groei ook weer slecht, een dun laagje mycelium en slechts enkele sclerotiën. De groei en de sclerotiënvorming op de andere koolhydraten bleken ook dezelfde te zijn als bij de vorige stam. Met gummi arabicum gingen er slechts 5.8% planten dood, met amyllum solubile 32.8%, met dextrinum 54.9% en met saccharose 83.8%. (de N-bron was ook hier 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Uit de verschillende proeven over de invloed van de koolhydraatvoeding op de virulentie blijkt, dat er over het algemeen weinig verschil is tusschen de verschillende koolhydraten; alleen blijkt met amyllum solubile, hoewel hierop een vrij behoorlijke groei is, de virulentie gering te zijn. Cellulose en gummi arabicum zijn niet geschikt als C-bron.

Verder is de koolstofbron van belang, doordat men bij voldoende toevoeging van de koolhydraten een verminderde ophooping van de schadelijke stofwisselingsproducten krijgt; dit is vooral het geval, indien men pepton als N-bron heeft.

DEEL II.

ONDERZOEKINGEN BIJ RHIZOCTONIA SOLANI KÜHN

HOOFDSTUK I.

MORPHOLOGIE EN BIOLOGIE VAN DE SCHIMMEL.

Over *Rhizoctonia solani* Kühn is reeds zeer veel gepubliceerd. Allereerst werd er strijd gevoerd of de uiteenlopende vormen op te vatten zouden zijn als verschillende soorten van *Rhizoctonia*, of dat men met verschillende stammen van *Rhizoctonia solani* te doen had. Het bleek nu, dat dikwijls stammen van *Rhizoctonia solani* als nieuwe soorten beschreven zijn, waardoor veel verwarring gesticht werd.

De groote moeilijkheid is, dat men in de meeste gevallen de basidiumvorm niet vindt; in cultuur worden zelden basidiosporen gevormd. Bij Müller (1923) vindt men vermeld, dat hij een enkele maal in zijn cultures het ontstaan van basidiosporen gezien heeft.

Simon Thomas (1925) geeft een uitgebreid literatuuroverzicht. Hij komt tot de conclusie, dat de verschillende *Rhizoctonia*'s, waarmee hij werkte, verschillende stammen van *Rhizoctonia solani* zijn en dat dit tevens het geval was met de schimmels, die bekend zijn onder de naam *Moniliopsis Aderholdii* en met de door hem gebruikte orchideeënschimmels.

Briton-Jones (1924) was tot dezelfde conclusie gekomen. Al ziet men macroscopisch verschil, toch moet men de verschillende vormen beschouwen als behorende tot *Rhizoctonia solani*; microscopisch zijn de verschillen gering.

De kweekkasschimmel (Vermehrungspilz, toile) werd vroeger als

een steriele vorm van *Botrytis cinerea* beschouwd (o.a. door Beauverie, 1899). Ruhl and (1906) bewees echter, dat het een geheel andere schimmel is. Omdat er *Monilia*-achtige cellen gevormd worden, stelt hij de naam *Moniliopsis* voor en noemt haar dan *Moniliopsis Aderholdii* Ruhl. Zooals reeds gezegd is, blijkt ook dit een stam van *Rhizoctonia solani* te zijn.

Ook is er verschil van meening over de naam van het fructificeerende stadium van *Rhizoctonia solani*. Volgens de Amerikaansche onderzoekers is dit *Corticium vagum* Berk. & Curt. (Rolf s, 1904; Duggar, 1915; Richards, 1921; Briton-Jones, 1924), terwijl de Europeesche onderzoekers van meening zijn, dat het geen *Corticium*, doch een *Hypochnus* is en wel *Hypochnus solani* Prill. & Delacr. (Aubert, 1906; Pethybridge, 1916; Wol len weber, 1920; Müller, 1923, 1925). Deze beide namen blijven in de literatuur gehandhaafd.

De hier besproken literatuur is slechts een klein deel van de over *Rhizoctonia* verschenen literatuur. Uitgebreid behandeld vindt men deze in de monographie van Braun (1930).

Rhizoctonia solani is een schimmel, waarvan het uiterlijk zeer verschillend kan zijn. Niet alleen de verschillende stammen, maar ook de cultures van één stam kunnen onderling zeer sterk varieren, al naar gelang van de voedingsbodem, waarop ze gekweekt worden; zoo is b.v. de kleur van de cultuur variabel.

Rhizoctonia vormt pseudoconidiën en pseudosclerotiën. De pseudoconidiën ontstaan, doordat in een zijhype een aantal dwarswanden wordt gevormd, zodoende ontstaat een reeks korte cellen. Doordat zoo'n hyphe slechts zelden en dan in onregelmatige stukken uiteenvalt, onderscheiden de pseudoconidiën zich van de echte conidiën. De pseudosclerotiën bestaan uit een homogene massa van door elkaar gevlochten hyphen en pseudoconidiën-kettingen en ze hebben niet, zooals de echte sclerotiën, een centraal deel met een duidelijke wand.

De vorm van de pseudosclerotiën kan bij de verschillende stammen zeer verschillend zijn, in sommige gevallen ontbreken ze zelfs.

De temperatuur speelt bij *Rhizoctonia* een voorname rol; de optimumtemperatuur voor de groei loopt voor de verschillende stammen sterk uiteen.

Men kan bij *Rhizoctonia solani* niet van biologische rassen spre-

ken: de verschillende stammen zijn in staat andere planten dan hun oorspronkelijke voedsterplant aan te tasten.

M a t s u m o t o (1923) onderzocht, op welke wijze *Rhizoctonia solani* binnendringt. Het blijkt, dat het proces veel overeenkomst vertoont met dat bij *Sclerotinia*; hij vindt zoowel mechanische als enzymatische werking; de middenlamel wordt opgelost door extra- en intracellulair gevormde pectinase. Verder wordt er ook cellulase gevormd. Bovendien gelooft hij, dat ook de cuticula aangetast wordt en dat dus bij het doordringen hiervan door de hyphen niet alleen een mechanische werking plaats heeft. Wel is waar krijgt hij geen aantasting van de cuticula door een mycelium-extract, maar hij vindt, dat men hieruit niet mag concludeeren, dat er dus absoluut geen oplossing van de cuticula plaats heeft, want het levende mycelium kan heel anders werken dan het extract.

Hij ziet bovendien, dat de cuticula onder de eroverheen groeiende hyphen dunner is dan normaal en soms zelfs ontbreekt.

Verder gaat hij na, of *Rhizoctonia solani* een duidelijk pH-optimum voor haar groei heeft. Dit blijkt niet het geval te zijn. Het optimum wisselt sterk met de verschillende bodems, maar de groei is overal goed binnen de pH 3,0—7,0.

De stam van *Rhizoctonia solani*, waarmee ik mijn proeven deed, was door v a n L u i j k in 1931 geïsoleerd van graszaad. In navolging van S i m o n T h o m a s (1925) zou ik deze stam willen noemen *Rhizoctonia solani graminis*.

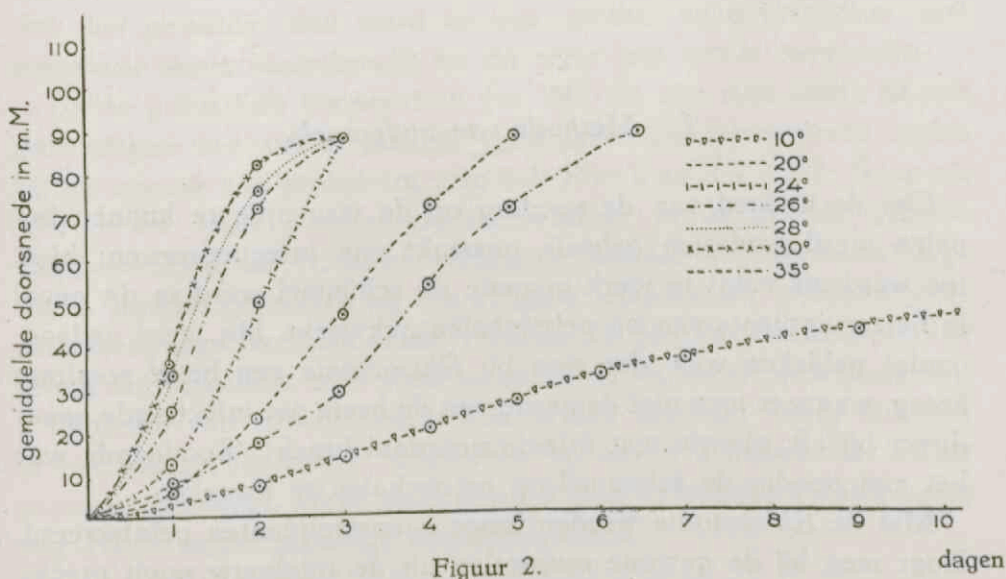
Deze stam vormt weinig luchtmycelium; het substraatmycelium vormt een dichte laag. De kleur van dit mycelium varieert van wit tot bruin.

De bruine pseudosclerotiën, die tegen de wand van de cultuurbuis gevormd worden, zijn klein (1—1 à 2 mM.), soms worden er heele korsten van dergelijke kleine, aan elkaar hangende pseudosclerotiën gevormd. De pseudosclerotiën, die op de voedingsbodem ontstaan, zijn grooter; de grootte varieert echter sterk, gemiddeld bedraagt ze 3 à 4—3 à 7 mM. Maar in sommige gevallen kunnen ze veel grooter worden, b.v. 7—14 mM in 3 maanden oude cultures op pepton-glucose-saccharose-agar; ook op bouillon-agar zijn de pseudosclerotiën vaak heel groot.

De optimumtemperatuur voor de groei ligt bij deze stam heel hoog, $\pm 31^{\circ}$ C. Boven deze temperatuur neemt de groei sterk af

en wordt bovendien erg onregelmatig. Fig. 2 geeft een grafische voorstelling van de groei bij verschillende temperaturen en wel bij 10, 20, 24, 26, 28, 31 en 35° C; bij 37° C was de groei zoo onregelmatig, dat er geen gemiddelde van te bepalen viel. Bij 10° C was de groei heel langzaam, pas na 23 dagen was de schaal volgegroeid.

Om de groeisnelheid te meten werd de schimmel in petrischalen op moutsalep gekweekt en de doorsnede van de cultuur na 1, 2... enz. dagen gemeten. Wanneer de schaal volgegroeid was, bedroeg de doorsnede 88 mM. Op de abscis is de tijd aangegeven, op de ordinaat de gemiddelde doorsnede in mM.



Groei van *Rhizoctonia solani* bij verschillende temperaturen.

Het is wel opmerkelijk, dat het groeioptimum van deze schimmel, die van graszaad geïsoleerd is, zoo hoog ligt. Simon Thomas (1925) kon bij zijn *Rhizoctonia*-stammen twee groepen onderscheiden; een groep met een hoge optimumtemperatuur (hiertoe behooren stammen, die uit een warme omgeving afkomstig zijn) en een groep met een lage optimumtemperatuur; in deze laatste groep treft men de stammen uit de gematigde streken aan. Toch kwamen er bij Simon Thomas ook uitzonderingen voor; hij vond n.l. dat de symbionten van twee tropische orchideeën ook een lage optimumtemperatuur hadden.

HOOFDSTUK II.

INVLOED VAN DE VOEDING VAN DE SCHIMMEL OP HAAR VIRULENTIE.

1. Methode van onderzoek.

Om de invloed van de voeding op de virulentie te kunnen bepalen werd wederom gebruik gemaakt van infectieproeven; hier toe werd als volgt te werk gegaan: de schimmel werd in dit geval in buizen inplaats van op petrischalen gekweekt. Dit werd gedaan, omdat gebleken was, dat men bij *Rhizoctonia* een beter resultaat kreeg, wanneer men niet de aarde van de heele pot infecteerde, maar direct bij elk plantje wat infectiemateriaal bracht. Zoodoende was het niet noodig de schimmel op petrischalen te kweken.

Met de *Rhizoctonia* werden jonge raapsteelplanten geïnfecteerd. Daar men bij de gewone raapstelen uit de tuinbouw nooit precies weet, met welke variëteit men werkt, gebruikte ik de kiemplanten van *Brassica chinensis*.

Er werd eerst nagegaan of er verschil in vatbaarheid is tusschen de gele variëteit (*Brassica chinensis* var. *Nunhem*) en de groene (*Brassica chinensis* var. *Lungbok*). Er bleek geen verschil te zijn; voor de verdere proeven werd alleen de groene variëteit gebruikt.

Het zaad werd gedesinfecteerd in een 0,25% Germisanoplossing gedurende 20 minuten en hierna een uur gespoeld met leidingwater en vervolgens uitgezaaid in zaaipannen. Na 7 tot 12 dagen, wanneer de planten de gewenschte grootte bereikt hadden, werden ze verspeend; ze hadden dan goed ontwikkelde kiembladen. Naarmate de temperatuur in de kas hoog of laag was, duurde dit

natuurlijk korter of langer, vandaar dat er meer op de grootte dan op de leeftijd gelet werd. Er werden telkens 5 planten in een pot met bladaarde geplant; de pot had een doorsnede van 10 cM. Ook in dit geval was het, evenmin als bij *Sclerotinia* nodig de bladaarde te steriliseeren. De potten werden in de verwarmde kas in turfmoalm ingegraven en goed vochtig gehouden. De volgende dag werden de planten pas geïnfecteerd; zodoende kon men ook nagaan of er door het verspenen geen plantje beschadigd was geworden. Een enkele maal kwam dit voor (de jonge raapsteelplanten zijn zeer bros), maar dan konden er nieuwe planten voor in de plaats gezet worden. Bij het infecteeren werd de aarde om het hypocotyl wat los gemaakt, dan werd er een stukje voedingsbodem met schimmel tegen aangebracht en dit weer met aarde toegedekt.

Bij de gunstigste temperatuur ($\pm 24^{\circ} \text{C}$) ziet men reeds na een paar dagen een aantal planten verwelken. De temperatuur speelt bij de infectie een groote rol (zie ook Richards, 1921; Simon Thomas, 1925). Indien de temperatuur in de kas de geheele dag beneden de 20°C bleef, verliep de infectie buitengewoon langzaam. Zoodra de potten bij een hogere temperatuur gebracht werden, kreeg men weer het snelle verloop. Bij de gunstige temperatuur groeit het mycelium zeer goed in de aarde en breidt zich sterk uit.

De stam van *Rhizoctonia solani*, welke gebruikt werd, is reeds in het vorige hoofdstuk beschreven en wordt *Rhizoctonia solani graminis* genoemd. Deze stam is nu 2 jaar in cultuur en infecteert nog 100% onder gunstige omstandigheden.

2. Invloed van eenige natuurlijke en synthetische voedingsbodems.

Evenals *Sclerotinia* werd *Rhizoctonia* gekweekt op verschillende voedingsbodems, die in het laboratorium aanwezig zijn; dit zijn v.n.l. natuurlijke bodems, echter ook eenige synthetische (de recepten van de gebruikte voedingsbodems werden op p. 17 gegeven).

De schimmel vertoonde op de meeste van de onderzochte bodems een uitstekende groei. Zoo was de groei zeer goed met flinke mycelium- en pseudosclerotieënvorming op: pepton-glucose-saccharose-agar, mout-, X-, bouillon- en boon-agar. Alleen de kleur van de cultures was verschillend: bij de eerste drie was deze bruin, bij de cultures op bouillon- en boon-agar wit.

Rijke mycelium-, maar geringe pseudosclerotiënvorming had plaats op 1% pepton- en op aardappel-agar; de kleur van de cultures was bruin.

Op maismeel-agar was de groei wat minder goed, ook was de pseudosclerotiënvorming niet zoo sterk; de kleur van de cultures was wit.

Bepaald slecht was de groei te noemen op cellulose- en 2% agar; er werd een heel dun laagje mycelium gevormd, terwijl de pseudosclerotiën bijna geheel ontbraken.

Jonge raapsteelplanten werden geïnfecteerd met deze verschillende cultures van *Rhizoctonia solani graminis*. Er werden jonge cultures gebruikt (6—10 dagen oud) en oudere cultures (18—23 dagen oud).

Bij de goede voedingsbodems maakte dit verschil in leeftijd weinig uit, maar met de cultures op 2% agar was er een groot verschil. Infecteerde men met jonge cultures van deze bodem, dan kreeg men nog een sterke aantasting: van de 25 planten gingen er 21 dood. Met de oudere cultures kreeg men bijna geen aantasting meer (van de 49 planten gingen er maar 4 dood).

Bij de cultures van de overige voedingsbodems was de virulentie van de schimmel even groot in de jonge als in de oude cultures; ook tusschen de meeste van de cultures van de verschillende voedingsbodems is onderling weinig verschil in virulentie te zien. Een uitzondering maken de cultures van cellulose- en aardappel-agar, want, terwijl in de overige gevallen de infectie zeer snel gaat en 100% bedraagt, gaat het hier langzamer en niet altijd tot 100%; toch is de aantasting soms nog groot.

Uit deze resultaten blijkt dat *Rhizoctonia* zeer goed kunstmatig te kweken is en dat zij geen bijzondere voorkeur voor een bepaalde voedingsbodem heeft. Alleen indien de voedingsbodem slecht is, is de aantasting geringer, b.v. met 2% agar. Edson en Shapovalov (1918) vonden iets dergelijks. Zij kregen weinig of geen infectie, wanneer ze aardappels infecteerden met een cultuur van *Rhizoctonia solani* die gegroeid was op Melilotusstengel en een sterke aantasting met een cultuur van rijst en aardappel.

Verder hebben de stofwisselingsproducten bij *Rhizoctonia* geen

schadelijke invloed, wat het geval was bij *Sclerotinia*. Nadat *Rhizoctonia* 10 dagen op 1% pepton-agar gegroeid was, kreeg men al met Nessler's reagens een oranje neerslag, wat op ammoniakop-hooping wijst; toch was de virulentie hier nog groot.

3. Invloed van de stikstofvoeding van de schimmel.

Voor de proeven om de werking van de stikstof na te gaan, werden de volgende voedingsbodems gemaakt, bevattende:

2% saccharose; 0,5% KH_2PO_4 ; 0,25% MgSO_4 ; 1% KNO_3 en 2% agar. KNO_3 werd in andere series door verschillende N-verbindingen vervangen.

De groei was op deze verschillende bodems heel goed; met 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5% NH_4Cl en 0,4% NH_4NO_3 werden er veel pseudosclerotiën gevormd en was het mycelium wit.

Met 2% pepton was het mycelium bruin en werden er weinig pseudosclerotiën gevormd.

Met 0,3% ureum en 0,5% asparagine was het mycelium licht bruin gekleurd, terwijl er ook weinig pseudosclerotiën ontstonden.

Met 1% KNO_3 tenslotte was het mycelium ook bruin, maar de pseudosclerotiën waren heel klein en weinig talrijk.

Infectieproeven met dergelijke cultures, die 6—10 dagen oud waren, gaven weinig verschil te zien: na 5 dagen was er vrijwel in geen enkele serie een gezonde plant meer over, terwijl na 3 weken alle planten dood waren.

Met cultures, die 18—23 dagen oud waren, is er wat meer verschil te zien. Bovendien ging de infectie hiermee langzamer. In tabel XIV is weergegeven, hoe de infectie met cultures van 18—23 dagen verliep. Vijf dagen na de infectie werden de planten onderscheiden in: gezond, licht aangetast, zwaar aangetast. Onder licht aangetast werd een beginnende verwelking verstaan, terwijl zwaar aangetaste planten geheel omgevallen waren, maar nog niet afgestorven. Na 3 weken werden de overgebleven planten onderzocht; vaak bleken planten, die er gezond uitzagen, toch aangetast. De verschillende sterkte van aantasting wordt in de tabel als volgt onderscheiden:

1. de schors van het hypocotyl vertoont enkele bruine vlekjes; de plant ziet er verder gezond uit;
2. een grooter deel van de schors is bruin verkleurd; de plant ziet er echter nog gezond uit;
3. de bruine verkleuring breidt zich uit; de plant is ziek;
4. de plant is sterk aangetast en veel kleiner dan normaal;
5. er is bijna niets meer van de plant over, terwijl het hypocotyl geheel doorgerot is en nieuwe wortels gevormd zijn.

Op foto IV zijn deze verschillende stadia te zien: van links naar rechts: contrôle, stadium 1, 2, 3, 4 en 5.

TABEL XIV

Verloop van infectieproeven met cultures van
Rhiz. solani graminis (18—23 dagen oud)

Temp. in ° C.		Bodem	Aantal geïnfect. planten	Na 5 dagen				Na 3 weken					
minimum	maximum			dood	gezond	licht	zwaar	dood	gezond	1	2	3	4
5,5—12	24—29	pepton . .	15	2	5	3	5	7	5	3	0	0	0
6—9	18—30	" . .	25	0	25	0	0	18	0	0	0	0	1
13—18	13—26	" . .	25	0	16	9	0	25	0	0	0	0	0
13—18	13—26	(NH ₄) ₂ SO ₄	25	0	19	6	0	24	0	0	0	0	1
13—18	13—26	KNO ₃ . .	25	0	25	0	0	25	0	0	0	0	0
13—18	13—26	NH ₄ Cl . .	25	0	19	6	0	24	0	0	1	0	0
5,5—12	24—29	" . .	15	3	11	0	1	5	10	0	0	0	0
10—12	30—37	asparagine .	50	48	0	0	2	50	0	0	0	0	0
10—12	30—37	ureum . .	50	47	0	1	2	50	0	0	0	0	0
10—12	30—37	NH ₄ NO ₃ .	50	43	0	3	4	50	0	0	0	0	0

Van een duidelijke invloed van de stikstofvoeding van de schimmel op haar virulentie is hier bij *Rhizoctonia solani* niets te zien. Met pepton is in enkele gevallen de virulentie wel iets minder, terwijl ook met 0,5% NH₄Cl de aantasting in één serie wat geringer was; maar daar tegenover staan weer series met cultures van deze bodems, waar de aantasting sterk was.

De invloed van de temperatuur is in deze tabel goed te zien. In de series met asparagine, ureum en NH₄NO₃ als stikstofbron liep de temperatuur hoog op en het resultaat was, dat de infectie hier



FOTO IV.

Verschillende stadia van aantasting bij raapstelen door *Rhizoctonia solani*.

Van links naar rechts: Contrôle, stadium 1, 2, 3, 4 en 5.



FOTO VI.

Raapstelen geïnfecteerd met 11 daagsche cultures van *Rhizoctonia solani* na versch. C-voeding v. d. schimmel. — gefotografeerd 7 dagen na de infectie.

Van links naar rechts: Met maltose, glucose, lactose. Geheel rechts de contrôle.

veel sneller verliep dan in de overige gevallen. Er werd natuurlijk voor gezorgd, dat het mycelium niet uit kon drogen.

Invloed van een eenvormige voeding.

Bij de volgende proeven werden cultures gebruikt, die al eenige maanden telkens op dezelfde bodem overgeënt waren. Met de jonge cultures was de infectie na een stikstofvoeding van KNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en pepton overal nog 100%; alle planten gingen dood.

Met de oudere cultures kreeg men nog wel een flinke aantasting, maar niet alle planten gingen dood. Tusschen de diverse N-series onderling is weinig verschil te zien (zie tabel XV).

TABEL XV.

Invloed van een eenvormige voeding bij cultures van *Rhizoctonia*, die 21 dagen oud zijn

Temp. in ° C.		Bodem	Aantal geïnf. planten	Na 5 dagen				Na 3 weken						
minimum	maximum			dood	gezond	licht	zwaar	dood	gezond	1	2	3	4	5
3—8	23—30	KNO_3 . .	25	0	21	4	0	18	0	0	1	3	2	1
3—8	23—30	NH_4Cl . .	25	14	4	7	0	22	0	0	0	0	2	1
3—8	23—30	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	25	10	6	9	0	21	1	0	0	3	0	0
5—9	18—30	pepton . .	25	0	20	5	0	18	0	0	0	0	0	7
3—8	13—30	asparagine.	25	13	6	6	0	19	0	0	2	4	0	0

Toch kan men hier niet spreken van een achteruitgang van de virulentie door eenvormige voeding; het verschil is te klein, ook doordat de uitwendige factoren een rol bij de infectie spelen, dan dat men een dergelijke conclusie mag trekken.

4. *Invloed van de koolstofvoeding van den schimmel.*

Om uit te maken, hoe *Rhizoctonia* reageerde op verschillende C-voeding, werd deze schimmel gekweekt op synthetische voedingsbodems met varieerende C-bron. De voedingsbodem bevatte be-

halve 2% van de verschillende koolhydraten nog: 0,5% KH_2PO_4 ; 0,25% MgSO_4 ; 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 2% agar.

De groei was op de verschillende onderzochte bodems uitstekend, terwijl de kleur van de cultures in alle gevallen wit was.

Het eenige verschil was, dat met 2% gummi arabicum en 2% lactose vrij weinig pseudosclerotiën werden gevormd en dat met 2% dextrinum, 2% amyllum solubile, 2% saccharose, 2% maltose en 2% glucose de vorming van de pseudosclerotiën behoorlijk was. Op foto V is het verschil tusschen lactose eenerzijds en glucose en maltose anderzijds te zien; deze cultures waren 16 dagen oud.

Wanneer men nu jonge raapsteelplanten met dergelijke cultures infecteert, dan blijkt, dat de cultures, die lactose als C-bron kregen, minder virulent waren dan de andere. Het verschil is wel niet groot, maar de infectie verloopt ook langzamer in geval van jonge cultures. Met de overige koolhydraten kreeg men overal een sterke aantasting. De cultures, die gebruikt werden waren weer 6—10 en 18—23 dagen oud. De resultaten zijn in tabel XVI weergegeven.

TABEL XVI

Bodem	Aantal geïnfect. planten	Na 5 dagen				Na 3 weken							
		dood	gezond	licht	zwaar	dood	gezond	1	2	3	4	5	
<i>Jonge cultures</i>													
g. arab.	80	69	2	1	8	78	0	0	1	1	0	0	
dextrinum. . . .	75	64	2	1	8	73	0	0	0	0	2	0	
amyllum solubile	25	24	1	0	0	24	1	0	0	0	0	0	
saccharose . . .	75	73	0	2	0	75	0	0	0	0	0	0	
lactose.	50	9	20	11	0	45	0	0	0	0	2	3	
maltose	50	39	1	4	6	49	0	0	0	0	0	1	
glucose	50	22	6	6	16	49	0	0	0	0	0	1	
<i>Oudere cultures</i>													
g. arab.	25	4	6	6	9	18	0	0	1	3	1	2	
dextrinum. . . .	29	8	7	14	0	20	1	0	4	2	0	2	
amyllum solubile	50	34	2	3	11	46	0	0	0	2	1	1	
saccharose . . .	25	0	19	6	0	24	0	0	0	0	1	0	
lactose.	25	0	25	0	0	8	0	2	5	8	2	0	
maltose	30	6	11	13	0	17	0	0	3	8	0	2	
glucose	30	3	11	16	0	20	0	0	1	7	0	2	

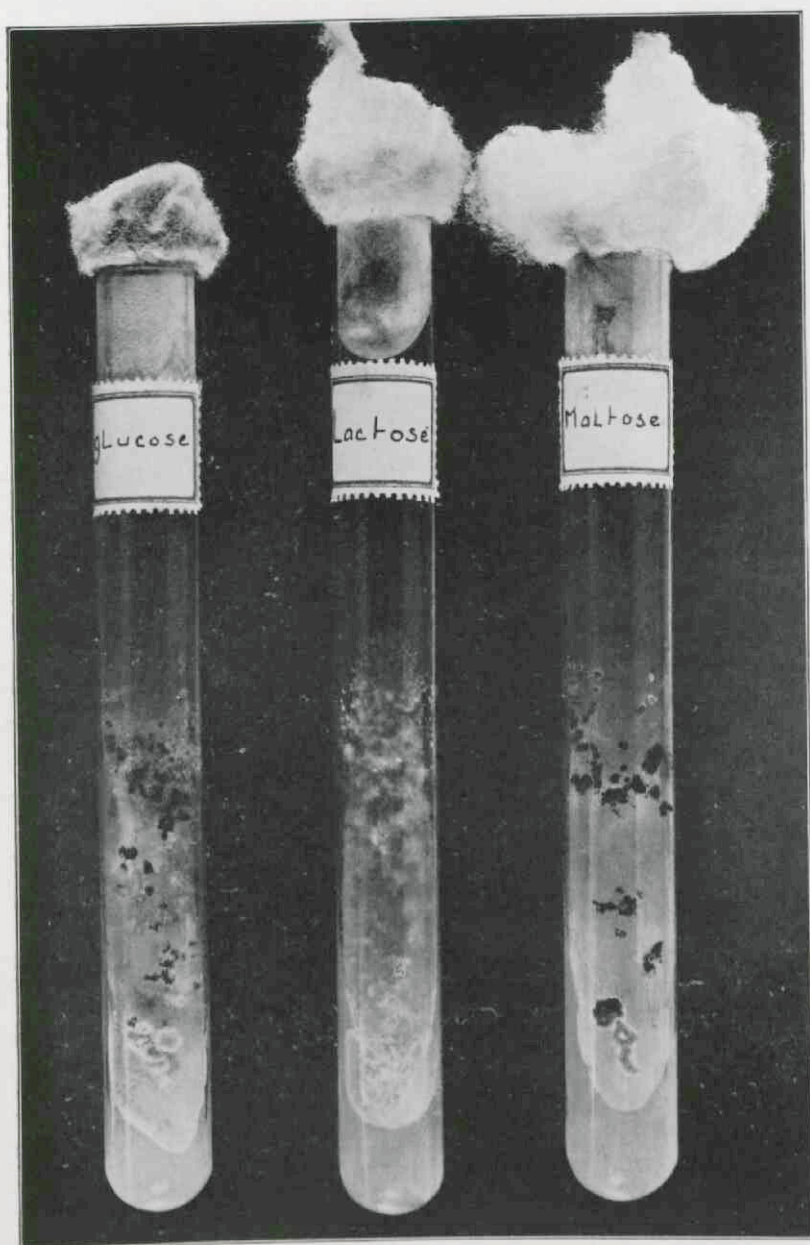


FOTO V.
Reincultures van *Rhizoctonia solani*
met verschillende C-bron.

Lactose is dus blijkbaar niet zoo geschikt als C-bron voor deze stam van *Rhizoctonia solani*; vooral na infectie met oudere cultures is dit te zien. Met amyllum solubile verloopt de infectie in beide gevallen bijzonder snel.

Met de andere koolhydraten is onderling weinig verschil te bemerken.

Foto VI geeft het beeld van een serie, waarbij geïnfecteerd was met een cultuur van 11 dagen, gefotografeerd 7 dagen na de infectie. Van links naar rechts had de schimmel als C-bron gekregen: maltose, glucose en lactose, geheel rechts is de controle.

Ook werd nog geïnfecteerd met cultures gegroeid op:
2% amyllum solubile; 0,5% KH_2PO_4 ; 0,25% MgSO_4 ; 2% pepton en 2% agar.

De groei was heel goed op deze bodem (kleur van de cultuur bruin), maar er werden weinig pseudosclerotiën gevormd.

Het resultaat van de infectieproeven met dergelijke cultures, die 18—23 dagen oud waren, was als volgt:

Aantal geïnfect. planten	Na 5 dagen				Na 3 weken						
	dood	gezond	licht	zwaar	dood	gezond	1	2	3	4	5
90	13	58	14	5	57	8	0	2	11	12	0

Indien de C-bron amyllum solubile is, krijgt men dus met pepton als N-bron een minder goed resultaat dan met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, al is de virulentie nog vrij groot.

Resumeeren we dus de verschillende resultaten over de invloed van de koolstofbron op de virulentie van *Rhizoctonia solani*, dan zien we dus weer, dat ook hier weer bijna overal de virulentie groot was; alleen met lactose als C-bron was de virulentie wat minder groot.

Verder verloopt in de meeste gevallen de infectie met oudere cultures langzamer dan met jonge cultures. Alleen met amyllum solubile als C-bron en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als N-bron krijgt men met 3 weken oude cultures nog een vrij snelle aantasting.

Bij lactose zijn vooral de oudere cultures minder virulent; met

de jonge cultures gaat de infectie wel langzaam, maar het eindresultaat geeft toch een groot percentage doode planten.

De virulentie van *Rhizoctonia solani* Kühn is dus niet zoozeer afhankelijk van de voedingsbodem als wel van de leeftijd van de cultuur. Indien men jonge cultures gebruikt, krijgt men overal een sterke aantasting, ook wanneer de schimmel al een paar jaren kunstmatig gekweekt is.

Planten	1911		1912		1913	
	1	2	3	4	5	6
1	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100
6	100	100	100	100	100	100

SAMENVATTING

Bij de voorgaande proeven werd nagegaan, in hoeverre er sprake is van een invloed van de voeding van schimmels op de virulentie. Eerst werd het gedrag van *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Massée nagegaan.

1. Er werden cultures van 14 dagen vergeleken, met verschillende stikstofverbindingen als N-bron en saccharose als C-bron. Met ammoniumverbindingen is de virulentie het grootst, KNO_3 geeft in een aantal gevallen een minder goed resultaat. Van de organische stikstofverbindingen krijgt men met ureum de sterkste infecties, maar toch minder sterk dan met de anorganische N-verbindingen; dan volgt asparagine, terwijl op pepton de virulentie veel geringer is. De groei is op al deze bodems goed.
2. Proeven, waarbij de invloed van de verschillende koolhydraten (met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als N-bron) werd nagegaan, gaven het volgende resultaat: met cellulose en gummi arabicum een slechte groei en gering infectievermogen; met amyllum solubile een vrij behoorlijke groei, maar toch geringe virulentie. Met saccharose, glucose, fructose, galactose, dextrinum, maltose en lactose was de virulentie sterk.
3. De ouderdom van de cultures speelt een belangrijke rol, daar er in de oudere cultures een schadelijke ophooping van ammoniak kan optreden. Het is natuurlijk mogelijk, dat er nog andere stofwisselingsproducten een rol spelen, maar deze zijn niet aangetoond.

Met pepton-bodems is deze schadelijke werking bijzonder groot, zoodat de virulentie bij cultures van 14 dagen al gering is; cultures van een week geven nog een flinke aantasting; er zijn dan slechts weinig stofwisselingsproducten gevormd. Met 3 weken oude cultures krijgt men alleen met ammoniumverbindingen als N-bron een behoorlijke aantasting.

4. Door suiker in groote hoeveelheid toe te voegen wordt de schadelijke ophooping van de ammoniak bij de pepton-bodems tegengegaan, daar de gevormde ammoniak dan weer verbruikt kan worden.
5. Met de verschillende natuurlijke voedingsbodems bleef de virulentie groot.
6. Langdurige groei op dezelfde bodem heeft in enkele gevallen een nadeelige invloed. Na eenvormige voeding met 4% en 40% saccharose-agar is de virulentie na 5 maanden nog sterk. Na een half jaar is de groei echter zoo gering, dat de cultures niet meer te gebruiken zijn.

Na een groei van een jaar op moutsalep (na geregelde overenting) is de virulentie verdwenen. Macroscopisch ziet zoo'n cultuur er ook anders uit. Bij overenting van een dergelijke cultuur op pepton-glucose-saccharose-agar, ziet deze er zeer abnormaal uit en ook hiermee geven de infectieproeven een negatief resultaat. In de overige gevallen was er geen nadeelige invloed van eenvormige voeding te zien.

Bij *Rhizoctonia solani* Kühn was weinig van een invloed van de bodem op de virulentie te bemerken; de proeven gaven het volgende resultaat:

1. De virulentie van de cultures, met de verschillende stikstofverbindingen als N-bron, is overal sterk.
2. Van de onderzochte koolhydraten is lactose het minst geschikt als C-bron; de infectie verloopt in dit geval langzamer dan in de overige gevallen; amyllum solubile als C-bron geeft daarentegen zeer goede resultaten.
3. De leeftijd van de cultuur is van belang; na gebruik van cultures van 3 weken verloopt de infectie langzamer dan met jongere.
4. Na een eenvormige voeding van eenige maanden is de virulentie op de onderzochte bodems, met KNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pepton en asparagine als N-bron, nog sterk.

LITERATUURLIJST

- APPEL, O., BRUCK, W. F., *Sclerotinia Libertiana* Fuckel als Schädiger von Wurzelpflanzen.
1907, Arb. Biol. Reichsanst., Bd. 5, p. 189.
- APPEL, O., WOLLENWEBER, H. W., Grundlagen einer Monographie der Gattung *Fusarium* (Link).
1913, Arb. Biol. Reichsanst., 8., p. 1.
- ATIENZA, M., Sclerotium disease of Tomato and Pepper.
1927, Philipp. Agr., vol. 15, p. 579.
- BARY, A. DE, Ueber einige Sclerotinien und Sclerotienkrankheiten.
1886, Bot. Zeit., Bd. 44, p. 377.
- BEAUVÉRIE, J., *Le Botrytis cinerea* et la maladie de la toile.
1899, Comp. Rend. Acad. des Sc. Paris, 128, p. 846 et 1251.
- BEHRENS, J., Ueber das Auftreten des Hanfkrebsses in Elsass.
1891, Zeitschr. f. Pflanzenkr., Bd. I, p. 208.
——— Trockene und nasse Fäule des Tabaks.
1893, Zeitschr. f. Pflanzenkr., Bd. 3, p. 82.
——— Beiträge zur Kenntnis der Obstfäule.
1898, Centr. Bl. Bakt. Abt. II, Bd. 4, p. 514.
- BOYLE, C., Studies in the Physiology of Parasitism. VI.
1921, Ann. of Bot., vol. 35, p. 337.
- BRAUN, H., Der Wurzeltöter der Kartoffel *Rhizoctonia solani* K.
1930, Julius Springer Verlag.
- BREFELD, O., Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze.
1881, Heft 4.
- BRITON-JONES, H. R., Strains of *Rhizoctonia solani* Kühn (*Corticium vagum* Berk & Curt.)
1924, Transact. Brit. Myc. Soc., vol. 9, p. 200.
- BROOKS, F. T., Observations on the Biology of *Botrytis cinerea*.
1908, Ann. of Bot., vol. 22, p. 479.
- BROWN, W., On the Physiology of Parasitism.
1917, The New Phytologist, vol. 16, p. 109.
——— Experiments on the growth of Fungi on culture media.
1923, Ann. of Bot., vol. 37, p. 105.
——— Studies in the genus *Fusarium*. IV On the occurrence of saltations
1926, Ann. of Bot., vol. 40, p. 223.

- BROWN, W., HARVEY, C. C., Physiology of Parasitism. X On the entrance of parasitic Fungi into the host plant.
1927, Ann. of Bot., vol. 41, p. 643.
- BURKHOLDER, W. H., Variation in a member of the genus *Fusarium* grown in culture for a period of five years.
1925, Am. Journ. of Bot. vol. 12, p. 245.
- BÜSGEN, M., Ueber einige Eigenschaften der Keimlinge parasitische Pilze.
1893, Bot. Zeit., Bd. 51, p. 53.
——— Studien mit *Botrytis cinerea*.
1918, Flora, Bd. 111/112, p. 606.
- BUTKEWITSCH, WL., Umwandlung der Eiweissstoffe durch die niederen Pilze im Zusammenhange mit einigen Bedingungen ihrer Entwicklung.
1903, Jahrb. wiss. Bot., Bd. 38, p. 147.
- BUTLER, E. J., Fungi and Disease in plants.
1918, Thacker, Spink & Co, Calcutta.
- DONANDT, S., Untersuchungen über die Pathogenität des Wirtelpilzes *Verticillium albo-atrum*.
1932, Ztschr. f. Parasitenkunde, Bd. 4, p. 653.
- DUGGAR, B. M., *Rhizoctonia crocorum* (Pers) D. C. and *Rhizoctonia solani* Kühn (*Corticium vagum* B. & C.) with notes on other species.
1915, Ann. Missouri Bot. Garden, vol. 2, p. 403.
- EDSON, H. A., SHAPOVALOV, M., Potato-stem lesions.
1918, Journ. Agr. Res., vol. 14, p. 213.
- EIDAM, Culturversuche der Lupinensclerotien.
1877, Jahres-Ber. d. Schles. ges. f. vaterl. Cultur, 55, p. 149.
- ELMER, O. H., Pathogenic and cultural comparisons of strains of *Rhizoctonia solani*.
1932, Phytopath., vol. 22, 1, p. 8.
- FISCHER, E., GÄUMANN, E., Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze.
1929, Gustav Fischer, Jena.
- FOËX, Et., ROSELLA, Et., Sur deux Helminthosporioses de l'orge.
1928, Ann. des Epiphytes 14e année no. 4.
- FRANK, B., Die Krankheiten der Pflanzen, Bd. 2.
1895, Breslau.
- FULTON, H. R., Chemotropism of Fungi.
1906, Bot. Gaz., vol. 41, p. 81.
- GRAVES, A. H., Chemotropism in *Rhizopus nigricans*.
1916, Bot. Gaz., vol. 62, p. 337.
- HUMPHREY, J. E., The rotting of lettuce.
1891, Rept. Mass. State, Exp. Sta. 9 : 29.
——— On *Monilia fructigena*.
1893, Bot. Gaz. vol. 18, p. 85.
- IWAO HINO, Notes on Sclerotia of milk vetch Rot Fungus.
1930, Miyazaki Bull. 2.

- KILLIAN, K., Ueber die Ursachen der Spezialisierung bei den Askomyceten.
I. Die *Monilia cinerea* der Kirschen.
1921, Centr. Bl. f. Bakt. Abt. II, Bd. 53, p. 560.
- KISSLING, E., Zur Biologie der *Botrytis cinerea*.
1889, Hedwigia, Bd. 28, p. 227.
- LA RUE, C. D., Loss of virulence in Fungi.
1925, Science, vol. 62, p. 207.
- LAUBERT,
1906, Bot. Centrbl., 102, p. 527.
- LAURENT, M. E., Recherches experimentales sur les Maladies des Plantes.
1899, Ann. de l'Inst. Pasteur, 13, p. 1; 1888, 2, p. 593; 1889, 3, p. 362.
- LETOW, A. S., Ueber die Bedeutung der *Sclerotinia Libertiana* auf Sonnenblumen.
1930, Phytopath. Zeitschr., Bd. 2, p. 167.
- MARCHAL, E., Elements de Pathologie végétale.
1925, Jules Duculot, Gembloux.
- MATSUMOTO, T., Further Studies on Physiology of *Rhizoctonia solani* Kühn.
1923, Bull. Imp. Coll. Agr. and Forestry, Morioka, Japan. No. 5.
1924, idem no. 8, Supplementary note on the enzyme activity of *Rh. solani*.
- MIYOSHI, M., Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden.
1885, Jahrb. wiss. Bot., Bd. 28, p. 269.
- MÜLLER, K. O., Ueber die Beziehungen zwischen *Rhizoctonia solani* Kühn und *Hypochnus solani* Prill. et Del.
1923, Arb. Biol. Reichsanst., 11, p. 326.
——— Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte und Biologie von *Hypochnus solani* P. et D. (*Rhizoctonia solani* K.).
1925, Arb. Biol. Reichsanst. 13, p. 197.
- NIKITINSKY, J., Ueber die Beeinflussung der Entwicklung einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprodukte.
1904, Jahrb. wiss. Bot. Bd. 40, p. 1.
- NORDHAUSEN, M., Beiträge Biologie parasitärer Pilze.
1899, Jahrb. wiss. Bot., Bd. 33, p. 1.
- OTTO, H., Untersuchungen über d. Auflösung v. Zellulosen u. Zellwänden durch Pilze.
1918, Beiträge zur Allgem. Bot., Haberlandt, Bd. 1, p. 190.
- PETHYBRIDGE, G. H., Investigations on Potato diseases.
1916, Dept. Agr. and Techn. Instr. for Ireland, vol. 16, no. 4, p. 27.
- RAMSEY, G. B., *Sclerotinia spec.* causing Decay of vegetables under transit and market conditions.
1926, Journ. Agr. Res., vol. 31, p. 597.
- RICHARDS, B. L., Pathogenicity of *Corticium vagum* as affected by Soil Temperature.
1921, Journ. Agr. Res., vol. 21, p. 459.

- RITTER, G., Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle für Schimmelpilze.
 1909, Ber. D. Bot. Ges., Bd. 27, p. 582.
 1911, " " " " Bd. 29, p. 570.
- ROLFS, F. M., Potato Failures.
 1902, Color. Agr. Exp. Stat., Bull. 70.
 1904, " " " " , Bull. 91.
- RUHLAND, W., Beitrag zur Kenntnis des sog. Vermehrungspilzes.
 1908, Arb. Biol. Reichsanst., 6, p. 71.
- SANDER, O., Zur Sklerotienkrankheit der Tomaten.
 1931, Obst u. Gemüsebau, 77, 2, p. 36.
- SCHELLENBERG, H. C., Untersuchungen über das Verhalten einiger Pilze gegen Hemizellulose.
 1908, Flora, Bd. 98, p. 257.
 ——— Sclerotinia Mespili und Sclerotinia ariae.
 1909, Centr. Bl. f. Bakt. Abt. II, Bd. 17, p. 188.
- SHERBAKOFF, C. D., Fusaria of Potatoes.
 1915, Cornell Agr. Exp. Stat. Mem., 6, p. 85.
- SIMON THOMAS, K., Onderzoekingen over Rhizoctonia.
 1925, Utrecht, Electr. drukkerij „de Industrie“ (diss.).
- SMALL, T., Rhizoctonia Foot-rot of the Tomato.
 1927, Ann. Appl. Biol., vol. 14, p. 290.
- SMITH, R. E., Botrytis and Sclerotinia; their relation to certain plant diseases and to each other.
 1900, Bot. Gaz. vol. 29, p. 369.
 ——— The Parasitism of Botrytis cinerea.
 1902, Bot. Gaz., vol. 33, p. 421.
- VASUDEVA, R. S., Studies in the Physiology of Parasitism, XII, an analyse of the factors underlying specialisation of Parasitism with spec. reference to the fungi Botrytis allii Munn. and Monilia fructigena Pers.
 1930, Ann. of Bot., vol. 44, n 174, p. 469.
- VOLK, A., Einflüsse des Bodens, der Luft und des Lichtes auf die Empfänglichkeit der Pflanzen.
 1931, Phytopath. Zeitschr., Bd. 3, p. 1.
- WAKEFIELD, ELSIE, M., On the name Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) Massee and Sclerotinia libertiana Fuckel.
 1924, Phytopath., vol. 14, p. 126.
- WARD, M., On a lily disease.
 1888, Ann. of Bot., vol. 2, p. 319.
- WESTERDIJK, JOH^a., Untersuchungen über Sclerotinia Libertiana Fuck. als Pflanzenparasit.
 1911, Med. Phytopath. Lab. „Willie Commelin Scholten“ II.
- WOLLENWEBER, H. W., Pilzparasitäre Welkekrankheiten der Kulturpflanzen.
 1913, Ber. D. Bot. Ges., Bd. 31.
 ——— Der Kartoffelschorf.
 1920, Arb. Forschungsinst. f. Kartoffelbau, 2, p. 32.

WOLLENWEBER, H. W., Die Wirtelpilz-Welkekrankheit (Verticilliose) von Ulme, Ahorn und Linde, usw.

1930, Arb. Biol. Reichsanst., 17, p. 273.

WORMALD, H., The brown rot disease of fruit trees with special reference to two biologic forms of *Monilia cinerea*.

1919, Ann. of Bot., vol. 33, p. 361.

YOUNG, P. A., Facultative Parasitism and Host Ranges of Fungi.

1926, Am. Journ. of Bot., vol. 13, p. 502.

ZIMMERMANN, A., Sammelreferate über die Beziehungen zwischen Parasit und Wirtspflanze, Nr. 3, Sclerotinia, *Monilia* und *Botrytis*.

1927, Centr. Bl. f. Bakt. Abt. II, Bd. 70, p. 51, 261, 411.

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

STELLINGEN

I

Uit de morphologie van een schimmel mag men niet zonder meer conclusies omtrent haar virulentie trekken.

II

Het narcissenaaltje is niet door adaptatie uit het hyacinthen-aaltje ontstaan; het zijn twee duidelijk te onderscheiden rassen; daar er ook morphologische verschillen zijn, is het gewenscht ze te onderscheiden als *Tylenchus devastatrix narcissi* en *Tylenchus devastatrix hyacinthi*.

M. P. de Bruyn Ouboter, diss. Leiden, 1930.

III

Het is niet bewezen, dat slijmvloed van boomen een infectie-ziekte is.

IV

Het tot genus maken van het sub-genus *Nematosporangium* A. Fischer brengt veel bezwaren met zich mee.

V

Ook bij ondergedoken, wortelende waterplanten heeft water-transport plaats.

VI

De periodieke beweging der bladen van *Phaseolus multiflorus* is niet alleen autonoom, maar ook erfelijk.

Bünning, Jahrb. f. wiss. Bot. 77, p. 283, 1932.

VII

De gecultiveerde vijg stamt af van een tweehuizige wilde vijg.

VIII

De meening van Mellanby, dat ongesplitst vet, waaraan alleen gal wordt toegevoegd, geresorbeerd kan worden, is onjuist.

Mellanby, Journ. Physiol. 64, p. V, 1927.
Verzár, Erg. Physiol. 32, p. 445, 1931.

