De bacterieziekte van de boon (Phaseolus vulgaris L.), veroorzaakt door Pseudomonas medicaginis f. sp. phaseolicola Burk

DE BACTERIEZIEKTE VAN DE BOON
(PHASEOLUS VULGARIS L.),
VEROORZAAKT DOOR PSEUDOMONAS MEDICAGINIS F. SP. PHASEOLICOLA BURK.

I. J. LE COSQUINO DE BUSSY

DE BACTERIEZIEKTE VAN DE BOON
(PHASEOLUS VULGARIS L.),

VEROORZAAKT DOOR PSEUDOMONAS MEDICAGINIS F. SP. PHASEOLICOLA BURK.

DE BACTERIEZIEKTE VAN DE BOON (PHASEOLUS VULGARIS L.), VEROORZAAKT DOOR PSEUDOMONAS MEDICAGINIS F. SP. PHASEOLICOLA BURK.

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. W. E. RINGER, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE OP MAANDAG 28 SEPTEMBER 1936, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR DOOR

Ivonne Jeanne le Cosquino de Bussy
GEBOREN TE MEDAN (NED. OOST-INDIË).

N. V. Drukkerij en Uitgeverij J. H. DE BUSSY
AMSTERDAM
1936

PATRI AC MATRI.
SORORIBUS FRATRIBUSQUE.

CURRICULUM VITAE

van Ivonne Jeanne le Cosquino de Bussy, dochter van L. P. le Cosquino de Bussy, Hoogleeraar te Utrecht en directeur van de afd. Handelsmuseum van het Koloniaal Instituut, en van F. Kehrer, zonder beroep.

Na lagere en middelbare school (Lyceum, afdeeling Gymnasium B) doorloopen te hebben, werd te Utrecht aangevangen met de studie in de biologie.

Afgelegd werden in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde candidaatsexamen i, (hoofdvakken plant- en dierkunde, bijvakken chemie en natuurkunde) en doctoraalexamen (hoofdvak plantkunde, bijvakken phytopathologie en dierkunde).

Na het doctoraalexamen werd gedurende eenige maanden op het Microbiologisch Laboratorium te Delft gewerkt, waar een cursus gevolgd werd en een klein onderwerp bestudeerd. Hierna werd met een phytopathologisch-bacteriologisch onderwerp voor een dissertatie aangevangen, waarvan deze publicatie het resultaat is.

Tijdens dat onderzoek werd gedurende twee achtereenvolgende jaren een seizoenassistentschap vervuld vanwege het Comité inzake bestudeering en bestrijding van de Iepenziekte.

VOORWOORD.

Bij het voltooien van mijn proefschrift wil ik gaarne jegens allen, die mijn academische opleiding beïnvloed hebben, mijn dank uitspreken.

Hooggeleerde Professor WESTERDYK, Hooggeachte Promotor. Het is mij niet mogelijk een juiste weergave te vinden voor mijn dank jegens U. Dat ik op Uw Laboratorium onder Uw leiding de laatste phase van mijn academische opleiding heb mogen afsluiten, zal ik steeds buitengewoon op prijs blijven stellen. Ook zal in mijn verder leven mij steeds voor oogen blijven staan de wijze, waarop U de groote lijn in het leven zoo zuiver ziet en tevens ook anderen kunt doen aanvoelen. Zeer dankbaar ben ik ook U, dat ik een seizoenassistentschap vanwege het Comité inzake bestrijding van de Iepenziekte heb mogen vervullen onder de zoo buitengemeen sympathieke leiding van STIEN BUISMAN.

Hooggeachte Professoren in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde te Utrecht. Dat het mij gegund was, door Uw colleges en practica eenig begrip te krijgen van het vele schoone en de samenhang, die het fundament zijn van de levende natuur, was mij een groot voorrecht.

Hooggeachte Professor KLUYVER. Zeer erkentelijk ben ik U, dat ik, als niet direct belanghebbende, op Uw Laboratorium heb mogen werken en dat onder Uw leiding mijn oogen geopend zijn voor „het geene in dien groote schat der verborgentheden voor onze bloote oogen als door vergroot-glasen verborgen is, aangaande de uitnemende kleyne Dierkens".

Zeergeachte Heer VAN LUYK. U dank ik voor alle hulp en raad, waarmede U mij met Uw bekende bereidwilligheid steeds terzijde stond.

Verder wil ik al diegenen, die op eenigerlei wijze aan het tot stand komen van dit proefschrift bijgedragen hebben, hiervoor hartelijk dank zeggen. Vooral U, waarde DE BOUTER, voor de verzorging van de teekeningen.

Tenslotte rest mij nog een woord van dank aan het Bestuur van de Stichting „Willie Commelin Scholten" voor de gastvrijheid mij op het Laboratorium betoond.

INHOUD.

INLEIDING.

Toen de laatste jaren in Noord-Holland de boonen (*Phaseolus vulgaris* L.) zeer veel te lijden hadden van een onbekende ziekte, heb ik geprobeerd de oorzaak te vinden.

Eenige tijd, nadat ik het onderzoek aangevangen had, bemerkte ik, dat deze ziekte ook onder de naam „stippelstreep" in de praktijk bekend staat. Verondersteld werd, dat de stippelstreep door een virus veroorzaakt wordt.

Bij mijn onderzoek bleek deze ziekte een bacterieziekte te zijn, n.l. de vetvlekkenziekte, die in 1929 door WIERINGA in ons land geconstateerd was en die in 1924 door BURKHOLDER in Amerika het eerst was beschreven.

Daar voor de in Nederland gekweekte soorten het ziektebeeld en de ziektesymptomen niet duidelijk waren vastgelegd, werden deze op het veld en in de kas uitvoerig nagegaan en beschreven.

De eigenschappen van de pathogene bacterie (*Pseudomonas medicaginis f. sp. phaseolicola* BURK.) werden in reincultuur bestudeerd en vergeleken met beschrijvingen van buitenlandsche onderzoekers.

Verschillende inoculatieproeven werden uitgevoerd, waarbij verscheidene inoculatiemethodes gevolgd werden, hoofdzakelijk op twee boonenvariëteiten n.l „Gele Citroen" (stamdopboon) en „Verbeterde Vroege Veensche" (stoksnijboon), die in de praktijk getoond hadden zeer gevoelig te zijn.

Tenslotte was het, daar de verspreiding van de bacterie hoofdzakelijk door het zaad plaats heeft van

belang na te gaan of het zaad vanuit de aanhechtingsplaats in de peul geïnfecteerd wordt en in welk gedeelte van het zaad de bacterie dan zou kunnen voorkomen. Hieromtrent was door vroegere onderzoekers niets met zekerheid vastgesteld.

HOOFDSTUK I.

IN NEDERLAND VOORKOMENDE BOONENZIEKTEN.

Bij bestudeering van de literatuur, waarin het optreden van in Nederland voorkomende boonenziekten beschreven wordt (Verslagen van het Phytopathologisch Laboratorium Willie Commelin Scholten 1902—1904, van het Instituut voor Phytopathologie te Wageningen 1909—1911, van de Plantenziektenkundige Dienst te Wageningen 1919—1935) blijkt, dat vóór 1923 alleen schimmels als veroorzakers daarvan vermeld worden, t.w. *Gloeosporium Lindemuthianum* SACC. et P. MAGN., *Sclerotinia sclerotiorum (Lib.)* SACC. et TROTT., *Uromyces phaseoli* (PERS.) WINT., *Fusarium roseum* LINK., *Fusarium vasinfectum var. pisi*, *Fusarium spec.*

In 1923 werd voor het eerst een ziekte geconstateerd, waarvan men vermoedde, dat zij door bacteriën werd veroorzaakt; ook in 1927 en 1928 werd dit vermoeden uitgesproken, terwijl in 1929 de vetvlekkenziekte voor het eerst genoemd wordt, welke door *Pseudomonas (Phytomonas) medicaginis var. phaseolicola* BURK. veroorzaakt wordt.

In de genoemde verslagen over 1923—1935 worden de volgende ziekten, door verschillende organismen verwekt, vermeld.

Bruine boonen, die bij doorsnijding een bruinachtige vlek vertoonden, welk verschijnsel in uiterlijk geheel overeenkwam met de zoogenaamde kwade of zwarte harten of pitten bij erwten.

Fusaria, terwijl in een bepaald jaar uit de zelfde planten *Thielavia basicola* ZOPF. geïsoleerd werd.

Gloeosporium Lindemuthianum, virusmozaiek, Uromyces phaseoli. In Mededeeling No. 11, 1935 van de verslagen van de Plantenziektenkundige Dienst wordt verklaard, dat de ziekten, waarmee men rekening moet houden bij de keuring te velde van landbouwgewassen, *Gloeosporium, Macrosporium,* vetvlekkenziekte en virusmozaiek zijn.

De ziektebeelden door de hierbovengenoemde organismen teweeggebracht, zal ik in de volgende pagina's in het kort beschrijven, en wanneer het mij in verband met een gelijkenis met de vetvlekkenziekte wenschelijk lijkt, zal ik er nader op in gaan.

Gloeosporium Lindemuthianum SACC. et P. MAGN.

Geraadpleegde literatuur: VAN POETEREN, BURKHOLDER en CROSBY, RITZEMA BOS, MORTIER BARRUS.

Op de kiemplanten ziet men op de cotylen en op de stengeltjes bruine tot zwarte ingezonken plekken, waarop in het midden lichtrose slijmachtige sporenhoopjes ontstaan. Bij sterke aantasting wordt het geheele weefsel van de kiemplant vernietigd en gaat deze spoedig te gronde. Bij jonge planten komen op de nerven van de bladeren en speciaal aan den achterkant donkere zwarte vlekken voor, die bij oude bladeren niet zoo opvallend zijn. Op de peulen zijn de symptomen het karakteristiekst en treedt de infectie het heftigst op. Evenals op de stengels zijn de vlekken donkerbruin tot zwart; zij zijn ingezonken, over het algemeen rond en bij een groot aantal versmelten zij.

In het midden ontstaan de lichtgrijze tot lichtrose slijmachtige sporenhoopjes.

Deze vlekken, die droog zijn, kan men gemakkelijk onderscheiden van de „water doordrenkte" vetvlekken, veroorzaakt door de bacterie. Een vergissing tusschen beide ziekten is dus ook uitgesloten.

Door de peulen tast de schimmel het zaad aan, waarop men groote bruine verkleuringen kan waarnemen. Wanneer dergelijk zaad wordt gezaaid, gaat òf de groeiende kiem spoedig te gronde òf wordt de plant bij doorgroeiing een besmetting voor zijn omgeving. In zieke plantendeelen kan de zwam overwinteren en ter bestrijding moet men ze spoedig opruimen.

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) SACC. et TROTT.

BURKHOLDER en CROSBY, RITZEMA BOS.

De schimmel veroorzaakt een zacht, bruin rot van stengels en peulen, waar hij als een dik witvlokkig mycelium uit kan groeien. In deze witte schimmelmassa en in de rotte deelen worden de kleine, harde sclerotia gevormd.

Bij sterke infectie worden de bladeren geel, vallen zij af en kunnen de planten geheel afsterven.

Doordat deze ziekte alleen bij sterke vochtigheid optreedt, kan men haar door goede drainage en flinke doorluchting gemakkelijk tegen gaan.

Uromyces phaseoli (PERS) WINT.

SCHENK, BURKHOLDER en CROSBY, VAN POETEREN.

Uromyces komt in 3 vormen op boonen voor.

1°. Aan de onderzijde van de bladeren als lichtgele, witachtige vlekken (de aecidiën) waaruit een wit poeder vrij komt. Men noemt dat het „kalk".

2°. Als kaneelkleurige, bruine stofhoopjes op de bladeren en de peulen.
Op het blad is een kleine rand om het stofhoopje licht geel verkleurd.
Het zijn de uredo- of zomer-sporen. Het „roest".

3°. Als bruine, later zwartbruine hoopjes op bladeren en peulen. De teleuto- of wintersporen. Het „zwart".

De schade bestaat in hoofdzaak hieruit, dat de peulenopbrengst verminderd is; het volkomen wegvallen van de planten komt niet voor.

Van deze drie schimmels staat de pathogeniteit volkomen vast.

Fusarium spec.

De verschillende *Fusaria*, die in Nederland uit zieke boonenplanten geïsoleerd zijn, waren *Fusarium roseum* LINK., *Fusarium vasinfectum* ATH. en *Fusarium spec.*

Inoculatieproeven zijn òf niet vermeld, òf slaagden niet.

Fusarium roseum LINK. en *Fusarium spec.* werden geisoleerd uit planten, waarbij een bruine tot zwarte verkleuring aan de wortelhals, welke week en rottig werd, opgetreden was. Verdere symptomen werden niet beschreven.

Van *Fusarium vasinfectum* ATH. wordt alleen vermeld, dat hij in slaboontjes voorkwam.

Daar de inoculatieproeven met deze *Fusaria* niet werden uitgevoerd of geen positief resultaat gaven, is niet het bewijs gegeven dat ze parasitair waren en bestaat de mogelijkheid, dat ze zich secundair in de plant ontwikkeld hadden.

Thielavia basicola ZOPF.

In 1928 werd door de Plantz. Dienst uit planten met bruine wortelhalzen, waaruit een *Fusarium* geisoleerd was, ook de als wortelparasiet bij vele andere planten bekende *Thielavia basicola* ZOPF gekweekt.

Met verschillende isolaties van *Thielavia basicola* heeft TIDDENS in 1932 na inoculatie op bruine boon aantasting verkregen. De planten waren spichtig met een enkele zwarte vlek op de stengel en roodbruine verkleuringen op de wortels. De wortelknolletjes waren geheel zwart en zaten vol mycelium en sporen.

Volgens ROODENBURG (1927) moet echter de *Thielavia* aantasting als een secundair verschijnsel beschouwd worden en is *Thielavia basicola* geen sterke parasiet voor de boon. De infectie komt slechts tot stand, als de wortels verzwakt zijn en de schimmel onder bijzonder gunstige omstandigheden leeft.

Pleospora herbarum (PERS) RHB.

Bij *Pleospora (Macrosporium)* aantasting is aan de volwassen boonenplanten uitwendig geen enkel symptoom te zien; alleen de zaden in de peulen hebben een rose vlekje bij de micropyle.

Zooals uit het bovenstaande blijkt, onderscheiden de ziektesymptomen van de genoemde ziekten zich zeer duidelijk van de vetvlekkenziekte, beschreven in een volgende paragraaf.

Bacteriën.

De symptomen van het eerst ontdekte, vermoedelijke geval van aantasting door bacteriën, waren de volgende. Plantenziektenkundige Dienst. 1923.

Aangetast waren Vroege Veensche en princesseboonen. Aan de onderzijde van de bladeren waren op de nerven violetbruine strepen en vlekken, die ook op de stengels voorkwamen.

In de naar beneden gebogen bladeren waren doode plekken en gaten en scheuren. De bloemen vielen spoedig af.

In 1927 ontving de Plantenziektenkundige Dienst boonenplanten met roodbruine verkleuringen op bladstelen en stengels. De hoofdstengels vertoonden verdikte geledingen. Aan de voet van de bladstelen waren ook ingezonken, bruinroode vlekjes en op die plekken braken de stelen dikwijls af.

Het lijkt mij, dat deze symptomen op een bacterieaantasting wijzen, want de bruinroode stengel- en bladsteelvlekken zijn typeerend voor bacterieziekten; het doorbreken op de geïnfecteerde plek vermeldt BURKHOLDER voor *Phytomonas phaseoli* ERW. SMITH.

In 1929 constateerde WIERINGA voor het eerst de vetvlekkenziekte; de beschrijving door hem gegeven staat in een volgende paragraaf.

In dat zelfde jaar trad in een kas een beschadiging op, waarvan de Plantenziektenkundige Dienst in

1931 het vermoeden uit, dat zij door bacteriën veroorzaakt zou zijn.

De ranken en bladeren waren plotseling gaan verwelken, terwijl op de grens van het slap neerhangende gedeelte de stengel doorgestoken of doorgeknepen leek.

Het Proefstation voor Zaadcontrole te Wageningen vermeldt het voorkomen van saprophytische bacteriën op boonenzaden, die bij ongunstige omstandigheden zijn geoogst. DOYER, FRANCK.

Bij kiemkracht- en gezondheidsonderzoek van zaden, was het opgevallen, dat boonenzaden, na voorweeking in water, in de kiembedden verslijming vertoonden en in bederf overgingen.

Het verslijmen, dat door saprophytische bacteriën geschiedt, wijst op een geringe levenskracht, zooals dat het geval is bij boonen, onder ongunstige voorwaarden gerijpt of geoogst.

Het zaad verliest dan zijn immuniteit tegen microorganismen en vormt in voorgeweekte toestand een goede voedingsbodem voor de saprophytische bacteriën, die de zaadhuid en de daaronder liggende weefsels aantasten en verslijmen.

De zaaisels van dergelijk zaad met geringe kiemkracht en besmet met saprophytische bacteriën, zullen slecht opkomen; de planten die er doorheen groeien zullen echter normaal zijn.

Tenslotte wil ik de ziekten noemen, die volgens de Plantenziektenkundige Dienst waarschijnlijk door een *virus* veroorzaakt worden.

De ziektebeelden zijn:

a. Geleidelijk in elkaar overgaande kleine, licht en donkergroene vlekjes (het gewone mozaiek).

b. dofgoene, groote plekken, afgewisseld met donkerglanzend groene eenigszins hol staande bladgedeelten.

c. Sterk gebobbeld blad, bladpunt omlaag gericht,

soms ook beide helften van het blad langs hoofdnerf eenigszins omlaag gebogen; bruine dorre plekken in de harde, broze bladeren.

d. donkerbruine vlekjes op de bladeren en bruine strepen langs nerven en stengels, planten sterven spoedig af (stippelstreep). (Zie pag. 10).

e. Bladeren geel geaderd (marmermozaïek).

Een verschijnsel, dat vaak met de virusziekten der boonen gepaard gaat , is het afvallen van de bloesems.

Of deze typen van verschijnselen door één bepaald virus worden veroorzaakt was niet bekend, noch of één virus enkele groepen van verschijnselen kan veroorzaken en dat die verschijnselen verschillen als gevolg van uitwendige omstandigheden of in verband met verschillende boonenrassen.

In de buitenlandsche literatuur vinden wij de volgende beschrijvingen van boonenmozaïek. MERKEL.

Men kan het mozaïek in drie beelden verdeelen.

1. „Sprenkelmosaïk". Blad is onregelmatig geelgroen gevlekt; de ligging van de vlekken hangt niet van de nervatuur af.
2. „Marmormosaïk". Meest voorkomende vorm. Langs de nerven loopen de donkergroene banden, terwijl het veld daartusschen zeer licht groen of geel is.
3. „Pockenmosaïk". Op licht blad donkergroene bobbels, die sterk afsteken tegen de lichte achtergrond en die onregelmatig verspreid liggen. De bladeren zijn dikwijls misvormd.

Aan de stengels en wortels van mozaïekzieke planten zijn geen verkleuringen te zien, alleen kunnen de stengels kort en weinig uitgegroeid blijven. De bloemen vallen vroegtijdig af, zoodat er een slechte oogst optreedt.

FAJARDO. De bladeren van mozaiekzieke planten zijn gevlekt, chlorotisch, gebobbeld en stijf, de nerven steken duidelijk tegen het blad af.

Mozaïekzieke planten sterven zelden volkomen af, maar ze blijven dikwijls klein en misvormd. Peulvorming heeft later in het seizoen en in mindere mate plaats.

PIERCE. De oppervlakte van de bladeren is onregelmatig met lichtgele vlekken, die zich uitspreiden. De bladeren worden volkomen chlorotisch, ze hebben een neiging tot hard worden en buigen om. Sommige virus veroorzaken necrotische vlekken op de bladeren.

Wanneer we met de beschrijvingen uit het buitenland die door de Plantenziektenkundige Dienst vergelijken, dan valt ons o.a. op, dat beeld *a* (gewoon mozaïek) overeenkomt met Sprenkelmosaïk van MERKEL en beeld *e* (marmermozaïek) met Marmormosaïk van MERKEL.

Beeld *c* (gebobbeld blad) zal Pockenmosaik zijn, terwijl ik beeld *b* (dof groene en glanzendgroene, holstaande vlekken) daar ook toe reken.

Deze vier beelden komen ook overeen met de beschrijvingen van FAJARDO, PIERCE, SMITH.

Het beeld *d* van de Plantenziektenkundige Dienst, de stippelstreep met bruine vlekken en strepen langs bladnerven en stengels, vond ik elders in de literatuur nergens beschreven, daar voornoemde onderzoekers behalve de bladsymptomen, totaal geen vlekken of verkleuringen op de andere plantendeelen van boonen noemen. Bij mijn onderzoek is gebleken, dat de stippelstreep door een bacterie veroorzaakt wordt. Daar bacterieziekten ook mozaiekverkleuringen van het blad kunnen veroorzaken, is deze begrijpelijkerwijs met een virusmozaïek verward.

HOOFDSTUK II.

DE VETVLEKKENZIEKTE OF STIPPEL-STREEPZIEKTE VAN DE BOONEN.

§ 1. Literatuur over de vetvlekkenziekte.

(Pseudomonas (Phytomonas) medicaginis var. phaseolicola Burk).

Sinds Burkholder in 1924 in Noord-Amerika een nieuwe bacterie-ziekte van *Phaseolus vulgaris*, die hij de „halo-blight" noemde, geconstateerd had, heeft men langzamerhand in zeer veel landen in bijna alle werelddeelen deze ziekte gesignaleerd.

In 1924 trad er in Amerika een heftige epidemie in het boonengewas op en daar deze aantasting zoo bijzonder sterk was, vermoedde men dat zij een andere dan de bekende bacterieziekten zou zijn.

De ziektesymptomen vertoonden veel overeenkomst met die door *Phytomonas phaseoli* en *flaccumfaciens* veroorzaakt, met dien verstande, dat de roodbruine vlekken op de stengels en de waterachtige vlekken op de peulen gelijk waren, maar dat bij deze nieuwe ziekte op de bladeren bruine vlekjes met groote lichte gele rand voorkwamen, wat bij aantasting door andere bacteriën niet het geval was.

Burkholder isoleerde de pathogene bacterie en noemde haar, daar zij voor dat tijdstip nog niet beschreven was, *Phytomonas medicaginis var. phaseolicola*, daar zij in cultuur en morphologische eigenschappen veel overeenkwam met *Phyt. medicaginis* Sackett, maar niet pathogeen was voor *Medicago*.

De bacterie is hoofdzakelijk een vaatorganisme, maar komt bij zeer zieke planten ook in het parenchym weefsel voor. Overwintering van de bacterie heeft hoofdzakelijk in of op het zaad plaats; na kieming ontwikkelen bij voldoend hooge en vochtige temperatuur de bacteriën zich op de jonge, reeds geïnfecteerde, kiemplanten en kunnen zij dan een bron van infectie voor de nabijzijnde planten worden.

Volgens BURKHOLDER treedt *Phyt. med. var. phaseolicola* BURK. in een koele zomer heftiger op dan in een warme.

De bacterie is pathogeen voor *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus* en *Phaseolus coccineus*.

In 1927 onderzocht HEDGES een ziekte van Kudzuvine *(Pueraria)*, waarbij zij een bacterie ontdekte, die zij *Bacterium puerariae* betitelde; eenige jaren later kwam ze tot de slotsom, dat deze bacterie identiek was met *Phytomonas med. var. phaseolicola* BURK.

Op de geïnfecteerde Kudzuvine waren op de bladeren de speciale halo-vlekken te zien, die eveneens kenmerkend zijn voor de halo-blight op de boon en bij kruisinoculaties bleek de gelijkheid van deze bacteriën.

De ziekte overwintert in de oude wortelstokken van Kudzuvine en na uitplanten van deze geïnfecteerde stokken in het voorjaar kan de ziekte zich verder verbreiden. HIGGINS bevestigde de conclusie van HEDGES dat *Bacterium puerariae* en *Phyt. med. var. phas.* gelijk zijn. De bacterie overwintert in het boonenzaad en in de zieke kankers van de Kudzuvines. Bij het aanleggen van een boonenveld moet men er dus nauwkeurig op letten dat zich geen ranken van Kudzuvine van het vorig jaar bij het veld kunnen ontwikkelen.

De „haloblight" is zooals BURKHOLDER, HEDGES en ZAUMEYER vermelden in de volgende staten in Amerika geconstateerd: Utah, Colorado, Wyoming,

Montana, Idaho, Georgia; in Californië waarschijnlijk niet.

In Europa werd in Duitschland de vetvlekkenziekte voor het eerst in 1927 door STAPP en KOTTE vermeld. In latere jaren kwamen verscheidene publicaties van hen over dit onderwerp uit.

STAPP en KOTTE isoleerden een bacterie, die gelijk bleek aan de *Phyt. med. var. phas.* door BURKHOLDER beschreven.

Daar men volgens beiden de ziekte slechts kan tegengaan door resistente boonensoorten te kweeken, werd op uitgebreide schaal de gevoeligheid van de in Duitschland voorkomende variëteiten nagegaan. 115 boonensoorten, stam- en stokboonen, werden op hun vatbaarheid onderzocht en daarbij bleek, dat bijna alle in meer of mindere mate gevoelig waren; slechts 3 stam- en 6 stokboonen waren volgens de door STAPP gebruikte inoculatie-methode, die in hoofdstuk IV door mij beschreven wordt, niet gevoelig.

Bij het keuren van boonensoorten op gevoeligheid is het volgens STAPP aan te raden, naast de te onderzoeken soorten, een zeer gevoelig ras te inoculeeren, waarvan de graad van gevoeligheid bekend is en waaraan duidelijk de ziektesymptomen te herkennen zijn, zoodat men de andere soorten hiermee vergelijken kan.

BÖNING beschreef in 1934 in een vlugschrift de kenmerken en karakteristieken van de vetvlekkenziekte en in 1935 publiceerde hij zijn onderzoekingen over de mogelijke invloed van bodem en bemesting op de ziekte en over de bestrijding door beitsing van het zaad.

Volgens hem geeft diverse bemesting zoogenaamd geen verschil in aantasting.

Als de beste middelen om ziek zaad te behandelen noemde BÖNING warmwaterbehandeling van 10 min. bij 50° C., van 30 min. bij 45° C. en Ceresan natbeitsing $^1/_8$ % gedurende 30 min.

De meening van BURKHOLDER, dat speciaal in koele zomers de ziekte sterk huishoudt, deelt BÖNING niet, daar volgens hem warme, vochtige zomers de aantasting sterk bevorderen.

Tot de conclusie, dat warmwaterbehandeling gedurende 15—30 minuten bij 45—50° C. goede resultaten kan geven, waren BREMER en HÄHNE ook gekomen.

In Nederland werd door WIERINGA in 1929 het eerst de vetvlekkenziekte geconstateerd en een bacterie, waarmee goed geslaagde inoculatieproeven werden uitgevoerd, geïsoleerd. Zijn meening, dat violetbloeiende variëteiten van de bruine boon zeer vatbaar zijn voor deze ziekte en wit bloeiende veel minder of niet, konden noch STAPP noch KOTTE noch BURKHOLDER en ZALESKI bevestigen.

In Mededeelingen No. 11, 1935 van de Plantenziektenkundige Dienst te Wageningen werd vermeld, dat de weersomstandigheden bij de vatbaarheid waarschijnlijk ook een groote rol spelen, daar een boonenras, dat in het eene jaar zoo goed als niet werd aangetast, in een ander jaar toch een vrij sterke aantasting vertoonde.

In Engeland vermeldden OGILVIE en MULLIGAN in 1930 het eerst een bacterieziekte van boonen, die door *Phytom. med. var. phas.* veroorzaakt werd. Zij beschreven de ziektesymptomen en kwamen als de anderen tot de conclusie, dat hoofdzakelijk geïnfecteerd zaad de ziekte verspreidt.

Phaseolus vulgaris wordt in sterke mate door de bacterie aangetast; *Phaseolus multiflorus* eenigszins, maar de groei wordt niet erg tegengehouden.

Voldoend resistente *Phaseolus vulgaris*-soorten bleken Black Wonder, Ne Plus Ultra en Superlative.

LABROUSSE beschreef in 1931 in Frankrijk de vetvlekkenziekte. Bij zijn onderzoek over gevoeligheid

van boonenvariëteiten was onder 30 soorten „Nain abondant" de eenige die niet werd aangetast. Het bepalen van de gevoeligheid werd in Frankrijk een paar jaar later op veel grootere schaal uitgevoerd; 234 boonensoorten waren geïnoculeerd en slechts bij een paar was de aantasting miniem.

In Polen werd de vetvlekkenziekte in 1931 opgemerkt; in Bulgarije in 1932 en in Denemarken in 1933.

ZALESKI onderzocht in Polen 139 *vulgaris* soorten en 5 *multiflorus* soorten op resistentie en vond ook slechts een zeer klein, niet gevoelig percentage; 3 soorten waren immuun en 18 zeer resistent en de andere matig tot zeer gevoelig.

Buiten Amerika en Europa werd de vetvlekkenziekte nog in de volgende landen geconstateerd.

In Tasmania in 1930 door DOWSON.

In Queensland in 1932 door MANDELSON.

In West-Australië in 1932 door PITTMAN.

Vermoedelijk in Zuid-Australië in 1930 door SAMUEL.

In Kenya in Afrika werd het in 1933 waarschijnlijk geacht, dat deze bacterieziekte voorkwam.

Zooals uit deze gegevens blijkt, is het gebied, waar de *Pseudomonas medicaginis var. phaseolicola* BURK. voorkomt, zeer uitgestrekt, en daar alle auteurs de groote schade, die aan de boonenoogst toegebracht wordt, vermelden, moet men deze bacterieziekte tot een van de belangrijkste boonenziekten rekenen.

§ 2. ZIEKTEBEELD VAN DE VETVLEKKENZIEKTE.

Literatuur.

Hieronder zal ik een overzicht geven van de ziektesymptomen volgens verschillende phytopathologen en ze met elkaar vergelijken.

Zooals in § 1 van dit hoofdstuk meegedeeld werd,

was BURKHOLDER in Amerika de eerste, die de ziekte nader onderzocht en beschreef. Zijn beschrijving van het ziektebeeld is als volgt.

Jonge geïnfecteerde planten vertoonen een stuntelige groei en bij sterke infectie een verlepping.

Op de bladeren zijn twee soorten van symptomen te ontdekken, ten eerste een droog, bruin, dor plekje, omgeven door een groote lichtgele rand; deze vlek is zeer karakteristiek voor *Phytomonas medicaginis var. phaseolicola* en wegens deze vlekken noemt men de ziekte in Amerika „halo-spot" of „halo-blight".

Bij het tweede symptoom zijn de gele vlekjes kleiner en meer over het blad verdeeld, zoodat het blad zeer chlorotisch gevlekt is.

De bacterie maakt een toxine, dat zich ook vóór de bacterie uit in het weefsel verspreidt; de bacterie kan tenminste niet geïsoleerd worden uit chlorotisch weefsel, waarin zij niet microscopisch te ontdekken is. Bij sterk geïnfecteerde planten is het blad zoo chlorotisch, dat het ziektebeeld op, door een virus veroorzaakt, mozaïek gelijkt, maar door het optreden van necrotische vlekken in het blad is er onderscheid met virusmozaïek.

De „halo-spot" en de volkomen als mozaïekachtig verkleurde bladeren zijn zoo karakteristiek voor deze bacterie, dat men op grond hiervan in bijna alle gevallen deze ziekte kan diagnosticeeren.

Op de stengels en bladstelen komen overlangsche strepen en vlekken voor, die bij een jeugdstadium eerst waterdoordrenkt, later droog en roodbruin gekleurd zijn. Typeerend voor deze bacterie is het feit, dat bij sterke aantasting de bacterie in druppels uit de stengels naar buiten kan treden, wat bij andere bacterieele boonenziekten nooit gezien is. Dit naar buiten druppelen heeft BURKHOLDER zoowel op het veld als in de kas opgemerkt.

Op de peulen zijn de vlekken eerst waterdoordrenkt en groen; later zijn zij ingezonken en rood en gelijken zij op die, veroorzaakt door *Bacterium phaseoli* en *Bacterium flaccumfaciens*, waarvan zij niet te onderscheiden zijn.

Het waterdoordrenkt uiterlijk blijft soms op een gerijpte peul, waardoor dan een donkere groene vlek tegen het droge, gele peulweefsel afsteekt; over de vlekken ligt dikwijls een fijne, droge, grijze bacterielaag uitgespreid.

Bij wit zaad duiden maïsgele tot crême vlekken aan, dat het met de bacterie besmet is. Sterk geïnfecteerd zaad is klein en gerimpeld en volkomen geel verkleurd.

Bij gekleurde zaden komen ook vlekken voor, maar hierop komen zij niet zoo duidelijk naar voren als bij de witte.

Lichte infecties zijn bij het keuren van het zaad op ziekte moeilijk of niet te ontdekken.

De bacterie is hoofdzakelijk een vaatparasiet, maar zij kan in bijna alle weefsels doordringen en voorkomen.

Volgens BURKHOLDER is het geheele ziektebeeld niet altijd 100 % gelijk, daar de uitwendige omstandigheden er invloed op uitoefenen en de symptomen daardoor uiteen kunnen loopen.

Van belang hierbij zijn vooral oecologische factoren en speciaal temperatuur en vochtigheid.

In koele zomers treedt de ziekte in Amerika heftiger op dan in warme.

STAPP en KOTTE in Duitschland geven de volgende beschrijving van de „Fettfleckenkrankheit".

Op de bladeren komen gele vlekken voor, waardoor het blad op mozaïek gaat gelijken.

In de gele vlekken worden de binnenste deelen bruin en dor en doorschijnend; daarna wordt het blad geheel bruin, totdat het tenslotte afvalt. Bij vochtig weer treden uit de bladvlekken bacteriemassa's naar buiten.

Bij weinig gevoelige boonensoorten treden na inoculatie in de jeugd zwak chlorotische vlekken op, die bij ouder worden van de plant langzamerhand verdwijnen, zoodat oude proefplanten er even gezond uitzien als de contrôleplanten.

Op de stengels zijn de vlekken langwerpig met een waterdoordrenkt uiterlijk en een smalle roodachtige kring.

Bij geïnoculeerde gevoelige boonensoorten kunnen de vlekken soms bijna geheel uitblijven, terwijl zij bij geïnoculeerde ongevoelige soorten wel optreden.

Bij doorsnijden van de stengel zagen STAPP en KOTTE, dat de bacteriemassa een gedeelte van de vaten (waardoor de verspreiding gaat) vult en later uit de vaten in het cambiale gedeelte overgaat.

Op de peulen komen waterdoordrenkte vlekken voor, die langzamerhand grooter worden en in elkaar overgaan, z.g. „Fettflecken". Bij het geel worden van de peulen blijven de vetvlekken zacht groen, wat zeer afsteekt. Over deze vlekken kan dikwijls een zilverglanzend huidje van bacteriën liggen.

Van de peulen uit gaat de ziekte dikwijls op de zaden over, waarop doorschijnende hoornachtige, soms min of meer ingezonken bruine vlekken te zien zijn. De bacterie wordt met het zaad overgebracht.

De beschrijving van BÖNING van de ziektesymptomen komt ongeveer overeen met de hierboven vermelde. Op de bladeren komen de typische bruine vlekken met een lichtgele rand voor. De bladeren, die door de vaatbundels aangestoken zijn, worden hard en bros; zij krijgen een gele en later een bruine tint en vallen tenslotte af.

Op de stengels zijn lange, water doordrenkte plekken te zien, die door een roode rand omgeven zijn. Op de peulen de roode, waterdoordrenkte, vetachtige vlekken, die in elkaar overgaan en die volgens BÖNING het ka-

rakteristiekst voor de ziekte zijn. Op het zaad bruine, hoornachtige vlekken.

Het bros en stijf worden van de bladeren wordt alleen door BÖNING als symptoom van deze ziekte vermeld; andere auteurs noemen het niet, terwijl het daarentegen kenmerkend is voor boonenmozaïek door virus veroorzaakt, zooals FAJARDO, PIERCE en KENNETH SMITH vermelden.

Als laatste wil ik de beschrijving van WIERINGA behandelen.

Op de bladeren zag hij de typische halo-vlekken met een klein doorzichtig middelpunt en een lichte gele zoom. Later verdorren de vlekjes en er om heen groeien de bladeren minder snel of niet uit, en zij nemen dan grillige vormen aan.

WIERINGA nam aan de onderzijde van de bladeren roestbruin verkleurde nerven waar, wat andere onderzoekers van deze ziekte voor *Phaseolus vulgaris* niet vermelden; BURKHOLDER echter wel voor *Phaseolus lunatus*.

Op de stengels en bladstelen zijn longitudinale, roestbruingekleurde vlekken.

Van peulen en zaad geeft WIERINGA geen beschrijving en blijkbaar heeft hij geen symptomen daarop onder oogen gehad.

Zooals uit het hierboven gegeven résumé blijkt, komen de verschillende beschrijvingen hoofdzakelijk met elkaar overeen en is het kenmerkendste van de ziekte halovlekken óp en chlorose ván de bladeren, bruinroode strepen en vlekken op de stengels en bladstelen, vetvlekken op de peulen.

Bovendien noemt BÖNING nog het bros worden van de bladeren en WIERINGA een bruine verkleuring van de nerven aan de achterkant van de bladeren.

Men moet natuurlijk wel in aanmerking nemen, dat

de verschillende onderzoekers niet allen met dezelfde boonen-variëteiten gewerkt hebben.

Volgens BURKHOLDER, die hoofdzakelijk Red Kidney variëteiten naging, verschillen de symptomen niet, alleen slechts in intensiteit. In de kas zag hij de symptomen even duidelijk als in het veld.

In Duitschland werkten STAPP, KOTTE en BÖNING met andere variëteiten.

Ook volgens STAPP en KOTTE treedt het verschil alleen door de intensiteit van de symptomen naar voren; zoo heeft de zeer gevoelige Flageolet rote Pariser veel stengelvlekken en de niet gevoelige Kaiser Wilhelm en Wachs Bahnbrecher geen stengelvlekken. BÖNING geeft geen nadere aanduiding van de door hem gebezigde variëteiten.

BURKHOLDER en de Duitschers gingen hoofdzakelijk de sla- en snijboonen na, terwijl WIERINGA daarentegen een landbouwboon (bruine boon) onderzocht en daarvan de symptoombeschrijving gaf.

Eigen onderzoek.

In verschillende streken van Noord-Holland en Utrecht, o.a. bij Castricum, Hoorn, het Eemland hadden de laatste jaren de boonenplanten op de kweekerijen en in de tuinen zeer veel te lijden van een ziekte, welke als typisch beeld had bruine streepvlekken op de stengels en bladstelen en chlorotische en verdorde vlekken op de bladeren.

Toen ik de oorzaak van deze ziekte trachtte te vinden, bemerkte ik dat deze ziekte ook wel de stippelstreepziekte werd genoemd, waarvan verondersteld werd, dat hij naar alle waarschijnlijkheid door een virus werd veroorzaakt en die o.a. in Noord-Holland de meest voorkomende boonenziekte is. (Zie pag. 8 en 9).

Bij isoleeringsproeven kreeg ik een bacterie in handen, die na inoculatieproeven pathogeen bleek te zijn

en die volgens verdere onderzoekingen *Pseudomonas medicaginis f. sp. phaseolicola* BURK., de verwekker van de vetvlekkenziekte was. De stippelstreep is dan ook geen virusziekte, maar een bacterieziekte en identiek met de vetvlekkenziekte.

De ziektesymptomen, die ik hieronder beschrijven zal, vermeldden andere onderzoekers reeds eerder, maar daar soms de eene onderzoeker het eene symptoom, een ander een ander symptoom niet noemt, leek het mij wenschelijk het ziektebeeld, dat in Holland nog slechts in het kort beschreven was, in zijn vollen omvang na te gaan en weer te geven. De symptomen heb ik op verschillende boonenvariëteiten gezien, zoowel in de kas, als op het veld. In de kas waren de planten geïnoculeerd; op het veld waren zij zoowel geïnoculeerd, als zoogenaamd „spontaan" geïnfecteerd.

De geïnoculeerde boonenvariëteiten waren: stamdopboon „Gele Citroen"; stamboon „Fijne Trosprincesse Zonder Draad"; stoksnijboon „Verbeterde Vroege Veensche".

De „spontaan" geïnfecteerde boonenvariëteiten waren: stamdopboon „Gele Citroen"; stamdopboon „Flageolet; stokdopboon „Boonerwt of Kievitsboon"; stamboon „Dubbele Slaboon Zonder Draad"; stamboon „Vroege Gele Wagenaars Van Nunhem"; stokboon „Trosprincesse Rentegevers Zonder Draad"; stokboon „Trosprincesse"; stoksnijboon „Verbeterde Vroege Veensche"; stoksnijboon „Verbeterde Vroege Veensche, Ras Verschoor"; enkele Duitsche variëteiten.

Algemeen ziektebeeld.

In de maand Juli, wanneer het ziektebeeld het duidelijkst is, is het opvallendst de slechte groei van de planten en bij sterke aantasting het verfomfaaide uiterlijk van het gewas.

De klein gebleven planten (bij stokboonen is de lengte aanzienlijk geringer dan bij gezonde planten; bij stamboonen is de vorm gedrongen en klein) vallen in het oog door geel-groen gevlekte, chlorotische bladeren, die een bobbelig of gekroesd oppervlak kunnen hebben. De teekening van het geel-groen is soms niet zeer scherp; zij steekt echter wel af tegen het effen groen van de gezonde, gladde bladeren.

Op de bladstelen en stengels komen longitudinale bruine streepvlekken voor, terwijl ook de bladeren aan de achterkant geheel of gedeeltelijk bruin verkleurde nerven vertoonen. De bladstelen zijn zeer bros en breekbaar, waardoor de bladeren, die spoedig bruine vlekken vertoonen, voortijdig afvallen, zoodat dit het verfomfaaide uiterlijk aan het aangetaste gewas geeft.

Vroeger in het jaar vallen bij de kiemplanten de geïnfecteerde planten in het oog door hun onuitgegroeide vorm. De pluim is dikwijls bruin en verdord. De eerste bladeren zijn niet of half uitgegroeid en vertoonen dan grillige vormen, terwijl zij lichtbruine vlekken kunnen hebben. De aangetaste kiemplanten hebben op de witte wortelhals roode of roodbruine scherp afstekende vlekjes, die eenigszins ingezonken kunnen zijn. Zie foto A2.

Bij matige infectie blijft de plant in leven, maar geeft minder peulopbrengst dan een gezonde plant; bij sterke infectie kunnen de planten, waarbij zeer weinig bladvorming en soms geen bloemvorming heeft plaats gehad, op jongere of oudere leeftijd in de groei blijven steken en te gronde gaan.

Op de bladeren.

De symptomen welke op de bladeren kunnen voorkomen zijn van verschillende aard. Door welke invloed de symptomen zoo verschillen kan ik niet met zekerheid zeggen. Bij een ziek gewas op een proefveld

viel het mij op, dat de daar gekweekte Duitsche variëteiten de typische halo-vlekken vertoonden en de Hollandsche variëteiten de geel-groene chlorose.

Symptoom 1. Chlorose van de bladeren kan in sterkere en in zwakkere mate voorkomen. De bladeren kunnen geel-groen gevlekt zijn, terwijl zij dan een bobbelig of gekroesd oppervlak kunnen hebben.

Ook kan een gedeelte van een blad of een blad in zijn geheel zoodanig chlorotisch getint zijn, dat het weefsel tusschen de nerven geel gekleurd is, terwijl de groene nerven daartegen scherp afsteken. Zie foto B2.

Deze bladeren doen veel aan virusmozaïek denken, maar het verschil kan men spoedig zien door andere vetvlekkenziektesymptomen, n.l. bruingekleurde nerven aan de achterzijde van de bladeren en longitudinale bruine streepvlekken op de stengels.

2. Kleine, donkerbruine vlekken met een min of meer groote, lichtgele of lichtgeelgroene rand. Zie foto C1. Het binnenste van het vlekje wordt dikwijls doorzichtig en dor, en tenslotte valt er een gat in, terwijl de necrotische rand om het gat en de gele chlorotische kring daaromheen zich uit kunnen breiden. Dit zijn de typische halo-vlekken, om welke de Amerikanen deze ziekte „halo-blight" noemen.

3. Lichtbruine, onregelmatig verspreide vlekken zonder gele rand, waardoor het blad een sterk gevlekt lichtbruin uiterlijk krijgt. De vlekken kunnen zich uitbreiden, zoodat het geheele blad necrotisch kan worden.

4. Donkergroene, vetachtige vlekken, die zoowel mèt als zonder lichte gele rand voorkomen; zij worden langzamerhand donkerbruin en necrotisch. Zie foto B1. In de grootere vlekken kunnen gaten vallen.

5. Zeer kenmerkend zijn aan de achterkant van de bladeren de gedeeltelijk of geheel bruin verkleurde nerven.

Bij deze bruinverkleuring zijn óf de nerven plaatselijk of over de geheele lengte necrotisch en bruin óf bruine, langwerpige vlekken komen voor, of op de nerven of langs de nerven tusschen de overgang van de nerven en het bladmoes. Zie foto D1.

De bruine of roodbruine verkleuringen komen ook voor op de bladstelen, welke brosser zijn dan bij gezonde planten, terwijl deze verkleuring zeer opvallend is op de overgang van blad in bladsteel.

Aangetaste bladeren zijn dikwijls niet uitgegroeid, zoodat zij grillige vormen vertoonen.

Bij oudere bladeren zijn deze verschillende vlektypen dikwijls minder scherp van elkaar te onderscheiden; de bladeren zijn dan geel en groen gevlekt met een bobbelig oppervlak, necrotische plekken en gaten en scheuren. Zie ook foto D2.

Vlekken, die duidelijk te zien waren bij jonge planten, kunnen bij het ouder worden van de planten minder duidelijk worden of verdwijnen. Een minder gevoelig zijn van de betreffende boonenvariëteit kan daarvan de oorzaak zijn, maar ook verandering van uitwendige omstandigheden, bijv. temperatuur- of klimaatsomstandigheden.

Op de stengels.

Op de stengels en bladstelen vallen kortere of langere, longitudinale streepvlekken, die roodbruin, licht- of donkerbruin gekleurd zijn, zeer in het oog,

De vlekken zijn het eerst te onderscheiden aan de stengelbasis, terwijl zij later over de geheele stengel voorkomen.

Bij kiemplanten steken de vlekken, die helderrood tot roodbruin tot bruin gekleurd en soms eenigszins ingezonken zijn, duidelijk af tegen de witte wortelhals. Zie foto A1 en A2.

Bij volwassen planten zijn de vlekken grooter en

kunnen zij langgerekt over groote stukken van de stengel loopen. Zie foto E1.

Waterdoordrenkte stengelvlekken, welke wel door andere auteurs genoemd worden, zag ik niet, noch in de kas, noch op het veld.

Bij sterke aantasting komen de bacteriën in druppels, welke waterachtig tot witmelkig getint zijn, uit de stengels naar buiten gebroken.

Op de peulen.

Op de groote volwassen peulen kunnen ronde waterdoordrenkte vlekken, de vetvlekken, voorkomen, die zich langzamerhand uitbreiden en met elkaar gaan anastomiseeren. De vlekken zijn eerst groen getint, krijgen vervolgens een roode rand of verkleuren geheel rood. Zie foto E2.

Wanneer de peulen bij ouderdom geel worden, blijven de vlekken groenachtig of rood getint en steken dan zeer af.

Deze typische vetvlekken op de peulen heb ik slechts bij geïnoculeerde Gele Citroenboonplanten gezien. Bij snij- en slaboonplanten zag ik deze duidelijke ronde vlekken niet, terwijl ook de kweekers ze niet opmerkten. De verklaring hiervan ligt misschien in het feit, dat de peulen waarschijnlijk vóór de aantasting, welke pas bij volwassen peulen geschiedt, geoogst worden.

Op het zaad.

Het zaad, geoogst van zieke planten, is hoofdzakelijk gelijk aan gezond zaad, zonder verkleuringen of misvormingen; slechts een zeer klein aantal zaden vertoont bruine of doffe plekken.

De aantasting is aan lichtbesmet zaad uitwendig niet op te merken, zoodat de verbreiding van de ziekte door het aanwenden van dit zaad zeer in de hand wordt gewerkt.

HOOFDSTUK III.

ISOLATIE EN BESCHRIJVING VAN DE BACTERIE.

§ 1. Isolatie van de bacterie.

Natuurlijk was het in de eerste plaats noodzakelijk zoo spoedig mogelijk de pathogene bacterie uit planten te isoleeren en rein in handen te krijgen. In Januari 1934 ontving ik uit Castricum, waar in de zomer van 1933 de ziekte sterk was opgetreden en groote schade had aangericht, een partijtje zaad van stamboon „Gele Citroen", dat er zeer slecht uit zag, o.a. donker en licht bruin gevlekt, met ingezonken en doffe plekken.

Voor het isoleeren van de bacterie uit dit zaad paste ik de gewoonlijk gebruikte methode toe; eerst uitwendig desinfecteeren van het materiaal en daarna uitleggen op een vaste agarbodem. Het zaad werd gedesinfecteerd in sublimaat (1 : 1000) gedurende respectievelijk 30 sec., 1 minuut, 5 minuten en 10 minuten en daarna afgespoeld gedurende 5 minuten in gesteriliseerd water, dat een paar keer ververscht werd. Daarna werden de zaden uitgelegd op aardappelagar en peptonagar. De schalen werden in de thermostaat bij 25° C. gezet en na één of twee dagen waren om de zaden op de agar bacteriekringen gegroeid. Door uitstrijkplaten bleek, dat zich verschillende soorten bacteriën hadden ontwikkeld; hoofdzakelijk kleine, beweeglijke, witte koloniën vormende staafjes, die op grond van de literatuur vermoedelijk de parasiet zouden zijn, maar bovendien ook sporenvormers, cocci en groote Bacteria. Wanneer na eenige op één volgende

malen uitstrijken slechts één zelfde bacterie in een schaal bleek voor te komen, werd van een mooi eenzaam liggende kolonie een reincultuur aangelegd, die op snijboonenagar, pepton- en aardappelagar werd aangehouden.

Op deze wijze werden van een aantal zaden zes gelijk uitziende stammen kleine, beweeglijke, witte koloniën vormende bacteriën geïsoleerd, die, zooals later beschreven wordt, na inoculatieproeven pathogeen bleken.

Voordat men tot de parasitaire natuur van een plantenziekte mag besluiten, moet men uit een geïnoculeerde plant, die de speciale ziektesymptomen vertoont, de parasiet herisoleeren.

Voor de herisolatie uit de geïnoculeerde groene planten werd de stengel in stukken van ± 5 cm lengte gesneden en de peulen in hun geheel gelaten; daarna werden deze gedesinfecteerd gedurende een paar minuten in alcohol-sublimaat (gelijke deelen alcohol 96 % en sublimaat 1 : 1000) of 5—10 minuten in formol 4 % en vervolgens 10 minuten in eenige malen ververscht, gesteriliseerd water afgespoeld. Tusschen gesteriliseerd filtreer papier werden de natte stukken even afgedroogd. Dunne bladstelen of stengeldeelen werden met een gesteriliseerd mes in tweeën gespleten en op de agar uitgelegd. Bij dikke stukken werd de buitenkant weggesneden, zoodat dus alleen het inwendige op de agar werd gelegd. Van de peulen werd slechts het zaad uitgelegd of de binnenkant van een peul onder een vlek. De schalen werden in de thermostaat bij 25° C. gezet en nadat zich bacteriën ontwikkeld hadden, werden hiervan uitstrijkplaten gemaakt en vervolgens reincultures. Bij het herisoleeren uit geïnoculeerd materiaal werd steeds het kleine, beweeglijke, witte koloniën vormende staafje, *Pseudomonas medicaginis f. sp. phaseolicola* BURK. op de platen gevonden, daarnaast

ook andere bacteriën bijv. sporenvormers en o.a. ook bijna geregeld de beweeglijke, gele koloniën vormende *Bacterium herbicola*.

Deze komt veel op gezonde en in zieke planten voor, zooals o.a. DÜGGELI, BEYERINCK en VON WOLZOGEN KÜHR vermelden.

§ 2. METHODE TOEGEPAST BIJ DETERMINATIE EN BESCHRIJVING VAN DE BACTERIE.

Methodiek en voedingsbodems.

Van 3 stammen n.l. van één oorspronkelijke isolatie en van twee herisolaties, werden de eigenschappen op verschillende voedingsmedia nagegaan. Hoofdzakelijk werden de methodes gevolgd die in het „Manual of Bacteria" edited by the Society of American Bacteriologists, vermeld worden.

Bij het maken van steekcultures of cultures op agar in reincultuurbuizen werd overgeënt van een snijboonenagarcultuurbuis van een paar dagen oud. Bij het enten in vloeistofmedia, waarvan in buizen 10 cc werd afgemeten, werd een oogje overgebracht uit een bacteriecultuur in peptonwater van 24—28 uur. Uit een zelfde genre cultuur werden de strijkcultuurplaten gestreken. Altijd werden de cultures, die voor het steriliseeren met natronloog op pH 7,3 waren gebracht, in duplo en met een blancoproef geïncubeerd bij een temperatuur van 25° C., behalve bij gelatinecultures, die bij 20°—22° C. werden gezet. De pH werd bepaald met chloorphenolrood, broomthymolblauw en cresolrood volgens de kleurenkaart van CLARK.

De kleuringen met carbolfuchsine, gentiaanviolet, volgens GRAM, werden op bacteriën van een peptonagarbuis van ± 48 uur uitgevoerd. Gramkleuring volgens „Manual".

De lengte van de staafvormige bacterie (24 uur oud

op peptonagar) werd gemeten in een druppel water.

Bij ciliënkleuring werd een gecombineerde methode toegepast; de beits werd gebruikt die SAFFORD en FLEISCHER vermelden en de zilveroplossing van ZETTNOW. Als volgt, werd bij de ciliënkleuring te werk gegaan. Er werd voor zeer zuivere kleurstoffen en glaswerk gezorgd en speciaal voor zeer schoone dekglaasjes. Op deze werd een bacteriesuspensie uitgestreken. Hiervoor was van een peptonagarbuis van 12—24 uur, in een druppel gedestilleerd water slechts zoo weinig bacteriemassa gebracht, dat de druppel even troebel was. Wanneer in deze druppel zeer sterke eigenbeweging gezien werd, werd een ander schoon dekglas genomen, één kant even in de druppel gedompeld en hiermede zeer snel over het eerste dekglas gestreken, zoodat slechts een zeer dunne bacterielaag uitgespreid was, die aan de lucht gedroogd werd. Vervolgens werd met versche beitsvloeistof bedekt, tot stoomen verhit, bijv. boven het spaarvlammetje van de bunsenbrander en twee minuten gestoomd. De beitsvloeistof, die niet langer goed blijft dan 48 uur, wordt als volgt bereid:

100 cc van ¼ verzadigde oplossing van prikinezuur.
(verzadigde oplossing van prikinezuur is 1,22 gr. pikrinezuur op 100 cc H_2O bij 20° C.)
5 gr. tanninezuur.
7,5 gr. ferrosulfaat.

Met gedestilleerd water werd het dekglaasje afgewasschen en dan even gedroogd. Met Zettnowzilveroplossing werd het glaasje bedekt, tot stoomen verhit en 1—2 minuten gestoomd. Zilveroplossing kan langen tijd bewaard blijven en wordt als volgt bereid.

Aan 20 cc verzadigde zilversulfaatoplossing (= 0,146 gr. $AgSO_4$ in 20 cc aqua dest.) plus 40 cc aqua dest. voegt men zooveel druppels aethylamine toe, dat het eerst gevormde neerslag weer oplost.

Na het behandelen met Zettnow-zilveroplossing werd met gedestilleerd water afgewasschen, aan de lucht gedroogd en dan op een zeer schoon voorwerpglas in balsem ingesloten.

Voor peptonagar, peptongelatine, snijboonenagar, aardappelagar, moutagar werden de volgende recepten gebruikt.

Peptonagar:

1000 cc leidingwater.
10 gr. pepton.
5 gr. NaCl.
15 gr. agar.

Opkoken, neutraliseeren pH 7,3, steriliseeren 15 min. bij 120° C.

Peptongelatine:

1000 cc leidingwater.
10 gr. pepton.
5 gr. NaCl.
120 gr. gelatine.

Oplossen, afkoelen, neutraliseeren pH 7,3, steriliseeren 15 min. bij 100° C.

Snijboonenagar:

1000 cc snijboonenextract.
15 gr. agar.

Opkoken, neutraliseeren pH 7,3, steriliseeren 15 min. bij 120° C.

Snijboonenextract:

200 gr. snijboonen op 1000 cc leidingwater; snijboonen fijn snipperen en eenige uren op een zacht vuur laten trekken. Daarna filtreeren en tot 1000 cc bijvullen.

Aardappelagar:

1000 cc aardappelextract.
15 gr. agar.

Opkoken, neutraliseeren pH 7,3, steriliseeren 15 min. 120° C.

Aardappelextract:

1000 cc leidingwater.
100 gr. aardappelen.

½ uur koken, filtreeren, tot op 1000 cc water bijvoegen.

Moutagar:

1000 cc moutextract van 10° Balling.
20 gr. agar.

Oplossen, opkoken en filtreeren, steriliseeren 15 min. bij 110° C.

Moutextract:

1,5 kg. moutmeel en 4000 cc leidingwater wordt goed gemengd in een geëmailleerde pan. De pan in een waterbad en verwarmen tot 45° C. Op deze temperatuur blijft de pan een uur of drie staan. Vervolgens verder verwarmen tot 60° C. Hier blijft alles nog één uur op staan. Dan filtreeren door een paardenharen zeef. In kolven steriliseeren 15 min. bij 120° C. Daarna filtreeren en verdunnen tot 10° Balling. Vervolgens steriliseeren 15 min. op 110° C.

Voor peptonwater werd het recept van het „Manual" gevolgd.

Lakmoesmelk:

Tapte-melk in buizen 15 min. bij 110° C. steriliseeren; 1 % lakmoesoplossing (Kahlbaum) apart steriliseeren; daarna in iedere buis melk ± 3 cc lakmoesoplossing.

Om na te gaan of de bacterie groenfluorescentie vertoont, werd o.a. een medium gebruikt, dat de Heer VAN BRAAM HOUCKGEEST mij aanraadde, omdat daar zeer spoedige optreding van groenfluorescentie bij te verwachten is. In deze oplossing komen magnesiumsulfaat, kaliumsulfaat en een organische stof voor; deze zijn volgens GEORGIA en POE noodzakelijk voor mooie groenfluorescentie.

Volgens VAN BRAAM HOUCKGEEST is het bij zijn ammoniumsuccinaatoplossing zeer wenschelijk, dat de bacteriën veel zuurstof ter beschikking hebben, zoodat men de vloeistof in dunne lagen met groot oppervlak moet gieten. In een Erlenmeyer van 50 cc deed ik daarom 10 cc vloeistof, dus met een hoogte van ± 1 cc.

Ammoniumsuccinaatoplossing met pH 7,2:

1000 cc aqua dest.
4 gr. ammoniumsuccinaat.
0,400 gr. kaliumfosfaat (K_2HPO_4).
0,200 gr. magnesiumsulfaat.

Volgens CLARA is voor groenfluorescentie het beste medium dat van SULLIVAN, dat zij in twee modificaties opgeeft.

Sullivan 1 p H, 8,2:

1000 cc aqua dest.
5 gr. asparagine.
0,500 gr. bikaliumfosfaat (K_2HPO_4).
0,500 gr. magnesiumsulfaat.

Sullivan 2 p H 8,2:

1000 cc. aqua dest.
10 gr. asparagine.
1 gr. bikaliumfosfaat (K_2HPO_4).
1 gr. magnesiumsulfaat.

Fermi-oplossing:

1000 cc aqua dest.
45 gr. glycerine.
10 gr. ammoniumfosfaat.
1 gr. kaliumfosfaat (KH_2PO_4).
0,200 gr. magnesiumsulfaat.

Neutraliseeren pH 7,3 en steriliseeren.

Cohn-oplossing:

1000 cc. aqua dest.
0,500 gr. kaliumchloride.
10 gr. neutraalammoniumtartraat.
5 gr. kaliumfosfaat (KH_2PO_4).

Neutraliseeren pH 7,3 en steriliseeren.

Voor bepaling van fermentatie van koolhydraten werden gistingsapparaatjes van SMITH van 10 cc met peptonwater van pH 7,3 plus 1 % van de betreffende koolhydraat gevuld en met broomcresolpurpur als indicator gekleurd op de wijze van het „Manual".

De kleurenomslag van broomcresolpurpur loopt van paars naar geel.

pH	7,0	6,0	5,5	5,0	4,5
Br. cres. purpur.	paars	← gevoeligezone →		geel.	

De gevulde, paarse gistingsapparaatjes werden 10 min. bij 110° C. gesteriliseerd.

Voor het nagaan van zetmeelhydrolyse werden de bacteriën eenige malen uitgestreken op zetmeelagarplaten.

Zetmeelagar:

Peptonagar plus 0,2 % oplosbaar zetmeel, op pH 7,3 brengen en steriliseeren.

Na 8 dagen werd de geheele schaal met J K J-oplossing overgoten om na te gaan of totale blauwkleuring van de agar plaats vond, of blauwkleuring met lichte, witte zones om de koloniën, wat op géén of wel hydrolyse wijst.

Aardappel:

De aardappels werden goed afgeboend, in schijven gesneden; deze werden in schalen gedaan en 10 min. bij 110° C. gesteriliseerd.

Cellulose-bodem:

100 cc. aqua dest.
0,2 gr. pepton.
0,1 gr. kaliumfosfaat (K_2HPO_4).

Op pH 7,3 brengen, in buizen doen, in iedere buis een stukje filtreerpapier, zoodat het half in en half uit de vloeistof steekt; daarna steriliseeren 10 min. bij 110° C.

Daar de bacterie een plantenparasiet is, wilde ik ook onderzoeken of hij pectine aantast.

Voor het nagaan van de enzymatische ontleding van pectinestoffen noemt SLOEP o.a. twee methoden, n.m.l. die der gelatineering en het direct aantoonen van pectinezuur.

Bij deze laatste methode giet men in glasdoozen met ingeslepen rand een gesteriliseerde, geneutraliseerde oplossing van 10 % gelatine en 1½ % pectine, die met een geconcentreerde lakmoesoplossing sterk gekleurd is, in een laag van ± 3 mm dikte.

Op de vast geworden plaat brengt men de stof, die op pectine onderzocht wordt. Een roode vlek om de stof geeft de vorming van zuur, dus van pectinezuur aan. Daar de door mij onderzochte bacteriën gelatine doen vervloeien, gaf deze methode geen resultaat.

Het aantoonen van pectase door gelatineering verloopt als volgt. Wanneer pectase inwerkt op een pectine-oplossing, treedt er gelvorming op, zoodat het mogelijk is de reageerbuizen met inhoud om te keeren, zonder dat deze er uit loopt. De 1 % pectine-oplossing heb ik in buizen gedaan, maar ook in een dunne laag in Erlenmeyers, opdat er meer zuurstof aanwezig zou zijn.

Pectine-oplossing:

1000 cc leidingwater.
10 gr. pepton.
10 gr. pectine (citruspectine).

Het oplossen van de pectine geeft wel eens moeilijkheden, daarom wordt de werkwijze vermeld.

In kokend peptonwater doet men voorzichtig onder geregeld omschudden met een droog spateltje, dat in de vlam wordt afgebrand, zoodat het verdampte peptonwater er niet tegen condenseert, zeer langzaam het pectinepoeder. De oplossing wordt geneutraliseerd en bij 100° C. 10 min. gesteriliseerd.

Voor het aantoonen van indolvorming werd een 1 % Disco bactotrypton oplossing aangewend, terwijl volgens de Ehrlich-Böhmtest („Manual") na eenige dagen op indol werd beproefd.

Ter bepaling van nitraatreductie werd het volgend medium gebruikt.

Nitraatmedium:

1000 cc leidingwater.
10 gr. pepton.
5 gr. NaCl.
1 gr. KNO_3.

Filtreeren, op pH 7,3 brengen en steriliseeren 10 min. bij 110° C.

Voor het aantoonen van nitriet werd het reagens van GRIESS-ROMYN gebezigd, dat KINGMA BOLTJES vermeldt.

Reagens Griess-Romyn:

1 deel α-naphthylamine, 10 deelen sulfanilzuur en 90 deelen wijnsteenzuur worden in een mortier goed gemengd. Dit reagens blijft zeer lang goed.

Ter aanduiding van ammoniakvorming werd Nessler's reagens aangewend.

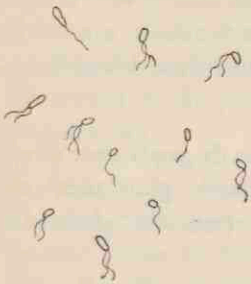
De mogelijkheid tot H_2S-vorming werd gecontroleerd met steekcultures in loodacetaatagar. Bij H_2S-vorming heeft om de steek, of in den geheele buis bruine verkleuring plaats.

Loodacetaatagar:

1000 cc aqua dest.
15 gr. agar.
20 gr. pepton.
1 gr. glucose.
0,200 gr. loodacetaat.

Beschrijving van de bacterie.

Morphologie.



TEEKENING 1.
Pseudomonas medicaginis f. sp. phaseolicola BURK.
Ciliënkleuring naar SAFFORD en FLEISCHER.

Staafje of diplostaafje met ronde uiteinden. Goede kleuring door carbolfuchsine, gentiaanviolet en methyleenblauw. Gramkleuring was negatief. De lengte van een staafje, na groei op peptonagar (pH 7,0) gedurende 24 uur, gemeten in gedestilleerd water was 0,7 (0,5—0,9) bij 2,7 (1,8—3,6) μ. De bacterie is zeer beweeglijk en heeft, zooals bleek na de ciliënkleuring, die toegepast werd, polaire ciliën (1—3).

Physiologisch onderzoek.

Peptonagarbuizen: Na twee dagen was de groei tamelijk goed. De vorm van de streep was eenigszins filiform, met gladde randen. Kleur wit.

Peptonagarplaten: Na twee dagen was er een matige groei, de koloniën waren slechts ½—1 mm in diameter, rond, glanzend en crême wit.

Peptongelatineplaten: De groei was vrij slecht en de vervloeiing had zeer langzaam plaats. Na twee dagen was er geen vervloeiing opgetreden; de koloniën waren zeer klein, ½ mm in diameter, rond en wit. Na een week waren de koloniën niet veel grooter geworden; wel zeer zwakke vervloeiing, bij sommige koloniën slechts verweeking. Na 9 dagen was de vervloeiing veel verder gegaan.

Peptongelatinesteek: De groei in de steek was goed met vervloeiing na 7 dagen, zakvormig. Na 27 dagen was de gelatine tot over de helft vervloeid.

Peptonwater: Na twee dagen was de cultuur troebel met een dun netvormig of glad vliesje, dat gemakkelijk uit elkaar viel. Na een week was het vliesje verdwenen en was er een sediment in de zeer troebele vloeistof, die zwak groen fluoresceerde, terwijl deze kleur langzamer sterker werd.

Snijboonenagar: Na drie dagen was de groei zeer goed. De vorm van de streep was filiform, glad met iets gerimpelde randen. Kleur wit tot crême wit, glanzend, vochtig.

Moutagar: Zeer, zeer slechte, om niet te zeggen geen groei.

Lakmoesmelk: Na 5 dagen was de melk niet veranderd, alleen ontstond een dun vliesje, dat niet ver-

dween en steeds op de vloeistof bleef. Na 9 dagen was de vloeistof zeer alcalisch geworden; zij bleef ook alcalisch. Peptonisatie had niet plaats.

Ammoniumsuccinaatoplossing: In buizen. Na 4 dagen was de vloeistof flink troebel, zonder groenfluorescentie, die evenwel na 7 dagen zeer sterk was. De oorspronkelijke pH van de vloeistof van 7,2 was na 21 dagen opgeloopen tot 8,6.

In Erlenmeyers. Hierbij trad veel sneller groenfluorescentie in, na drie dagen namelijk was er al een prachtige groene kleur. De begin pH van 7,2 was opgeloopen tot 8,2.

Fermi-oplossing: Na 5 dagen had er zwakke, witte groei plaats gehad. Na 7 dagen was de troebeling sterk en begon groenfluorescentie, die na 23 dagen zeer mooi was geworden. Na diezelfde tijd was er òf geen vliesje, òf een randje òf een dun vliesje en een sediment. Na 50 dagen was de begin pH van 7,3 teruggeloopen tot 6,3 en na bijvoeging van alkali kwam de groene kleur duidelijker uit.

Sullivan 1: Na 5 dagen goede groei, terwijl aan de oppervlakte een begin van fluorescentie te zien was, die na 7 dagen niet veel sterker was geworden. Na 23 dagen was de kleur zwak door de geheele vloeistof verspreid en de pH was na 50 dagen van 8,2 tot 8,6 opgeloopen.

Sullivan 2: Hierbij was de fluorescentie zwakker dan bij Sullivan 1, want na 7 dagen was nog geen groene kleur te bekennen, terwijl wel groei was opgetreden. Na 23 en 50 dagen was de fluorescentie zeer, zeer zwak en de pH was van 8,2 tot 8,6 opgeloopen.

Cohn-oplossing: Hierin had totaal geen groei plaats.

Glucose-oplossing: Na 2 dagen was er groei en zuur-

vorming in het open been opgetreden. In het open been was de kleur tusschen geel en paars in, terwijl in het gesloten been de vloeistof nog uitgesproken paars was. Na 5 dagen was de zuurvorming verder gegaan en na 7 dagen werd de paarse kleur in het gesloten been lichter. Wel zuur en geen gasvorming.

Saccharose-oplossing: De groei was na 2 dagen in het open been goed met een matige zuurvorming, tusschen paars en geel in. In het gesloten been nog totaal geen zuurvorming. Na 5 en 7 dagen was de zuurvorming iets verder gegaan, maar toch zeer weinig. Matige zuurvorming en geen gas.

Lactose-oplossing: Na 2 dagen was de groei bijna niets, terwijl geen zuurvorming was opgetreden. Na 5 en 7 dagen was de groei zeer goed geworden, terwijl de vloeistof haar heldere paarse kleur had behouden. Geen zuur en geen gas.

Maltose-oplossing: Na 2 dagen had zich in het open been een vliesje gevormd en was de vloeistof troebel geworden, terwijl de kleur onveranderd was. Na 5 dagen had er zich geen zuur gevormd. Geen zuur en geen gas.

Mannose-oplossing: Na 2 dagen was de vloeistof in het open been prachtig geel geworden en had er goede groei plaats gehad. In dicht been was de kleur nog paars. Na 5 dagen was de zuurvorming verder gegaan en na 14 dagen was zij tot ver in het gesloten been gegaan. Wel zuur en geen gas.

Zetmeelagarplaten: Na 8 dagen hadden de bacteriën zich wel ontwikkeld, maar slechts matig. Volgens KJ_2-onderzoek had geen hydrolyse plaats gehad.

Aardappel: Op gesteriliseerde aardappel was na 3 dagen op de strijkplaatsen de groei vrij goed. De kleur

van de bacteriën was crême wit, terwijl de aardappel grijs werd.

Cellulose-aantasting: De groei was zeer miniem, zoowel na 26 dagen als na 50 dagen, terwijl de cellulose totaal niet aangetast was.

Pectine-oplossing: Zoowel in buizen als in Erlenmeyers was er na 5 dagen of 1 maand geen verandering of troebeling te zien. De pectinevloeistof was geen samenhangende massa geworden. Geen pectine aantasting.

Indolvorming: Na 5 en 7 dagen werd op indol getest, waarbij bleek, dat het niet gevormd was, terwijl de bacteriën zich goed ontwikkeld hadden.

Nitraatreductie: Na 2, 4 en 12 dagen kon geen nitriet aangetoond worden, wel echter steeds ammoniak, terwijl beide nooit in de contrôle aantoonbaar waren. De groei was goed in de oplossing, die na 12 dagen mooi groen fluoresceerend was geworden.

Zwavelwaterstofvorming: Geen zwavelwaterstofvorming, daar bij steekcultuur in loodacetaatagar totaal geen zwarte verkleuring optrad. De groei op de agar was na 9 dagen goed, crême groenigwit, terwijl later een metaalglans over de kolonie kwam. In de agar was de groei matig, slechts 2 cm diep, filiform tot harig.

Zuurstofbehoefte: De bacterie is facultatief anaeroob. Zooals uit de proeven met de gistingsapparaatjes en met loodacetaatagar blijkt, groeit de bacterie bij voorkeur aan het zuurstof oppervlak, maar hij kan ook groeien, waar minder zuurstof ter beschikking staat.

Invloed van de temperatuur: Uitstrijkplaten op snijboonenagar werden in de thermostaten gezet, respec-

tievelijk bij 15° C., 20° C., 25° C., 30° C., 35° C. Na 5 dagen werd gecontroleerd. Bij 15° C. was de groei slechts zeer weinig geweest en waren de koloniën ± ½ mm in diameter. Bij 20° C. was de groei vrij goed en verschilde niet van den groei bij 25° C. De kolonievorm was 2 mm in diameter. Bij 30° C. was het weer minder en was de kolonievorm 1—2 mm; bij 35° C. was er totaal niets opgekomen.

De hier boven behandelde bacterie komt in bijna alle opzichten overeen met *Pseudomonas medicaginis var. phaseolicola*, beschreven door BURKHOLDER en door STAPP en KOTTE, maar op een enkel punt is er verschil, terwijl ook de determinatieresultaten van den Amerikaan en de Duitschers onderling eenigszins uiteen loopen.

Over het aantal ciliën verschillen de meeningen sterk. Volgens BURKHOLDER is er 1 polair flagellum, volgens STAPP en KOTTE zijn er 1—12, die mono- of bipolair zijn, terwijl ik door mijn kleuring 1—3 monopolaire ciliën kon aantoonen. Over de gelatinevervloeiing zijn de opvattingen ook niet hetzelfde. Volgens STAPP en KOTTE heeft er geen vervloeiing plaats. BURKHOLDER kwam bij zijn origineele beschrijving ook tot deze conclusie, maar bij latere proeven met andere gelatine merkte hij op, dat toch langzame vervloeiing plaats had, zoodat bijv. na zes weken de gelatine in een zware olie veranderd was. Bij mijn onderzoekingen trad de vervloeiing vrij spoedig in, terwijl na 4 weken de gelatine in een cultuurbuis tot over de helft dun vloeibaar was geworden.

Verder zijn de resultaten hoofdzakelijk alle gelijk, met alleen een klein verschil bij enkele koolhydraatfermentaties. Bij glucose- en saccharose-vergisting zagen zoowel BURKHOLDER als STAPP en KOTTE een voorbijgaande zuurvorming, terwijl bij mij de zuurvorming verder ging en er geen reactie naar de alca-

lische kant intrad. Bij maltose vonden BURKHOLDER en ik geen zuur, terwijl STAPP en KOTTE voorbijgaand zuur vermelden. Niettegenstaande deze kleine verschillen, die ik niet onvermeld mocht laten, moet toch ongetwijfeld de door mij onderzochte bacterie identiek geacht worden met *Pseudomonas medicaginis f. sp. phaseolicola* BURK. daar, hij in alle verdere opzichten overeenkomt met de door de voornoemde auteurs gegeven beschrijving.

Evenals STAPP wil ik de geslachtsnaam *Phytomonas* (pathogeen voor planten, staafjes, geel of wit, beweeglijk of niet beweeglijk; beweeglijke bezitten mono- of lophotriche flagella.) vermijden, daar deze alleen gebaseerd is op het kenmerk van pathogeniteit voor planten, welk kenmerk niet voldoende is en de geslachtsnaam *Pseudomonas* (water- en grondbacteriën, die een in water oplosbaar pigment vormen, dat door het medium diffundeert als groen, blauw en geelgroen; beweeglijk of niet beweeglijk, gramnegatief, polaire en peritriche flagella.) gebruiken.

Evenzeer wil ik de term „*variëtas*" niet gebruiken, alhoewel deze bij andere phytopathologen en bacteriologen gebruikelijk is, daar volgens mij deze niet de juiste term is om verschil in pathogeniteit te karakteriseeren. (*Pseudomonas medicaginis f. sp. phaseolicola* BURK. onderscheidt zich van *Pseudomonas medicaginis* SACKETT alleen, doordat hij niet pathogeen is voor *Medicago.*)

Niettegenstaande de bacteriën niet onder de algemeene botanische nomenclatuurregels vallen, lijkt het mij meer aangewezen de term „*forma specialis*" (onderscheidingsterm volgens de nomenclatuurregels bij parasietische schimmels) te gebruiken.

HOOFDSTUK IV.

INOCULATIES MET DE BACTERIE.

Met de geïsoleerde bacteriën werden verschillende inoculatieproeven uitgevoerd voornamelijk op twee boonenvariëteiten, „Verbeterde Vroege Veensche" en „Gele Citroen", en wel op vier verschillende hieronder beschreven wijzen, n.l. op kiemplanten (in potten), op zaad (daarna in de volle grond uitgezaaid), op zaad (in buizen uitgelegd) en op grond (in potten).

§ 1. Inoculatie van kiemplanten in potten.

Om de pathogeniteit van de 6 geïsoleerde bacteriestammen na te gaan werd de methode van de inoculatie van kiemplanten, die Stapp aangeeft, toegepast en daarmede verkreeg ik zeer duidelijke resultaten.

De inoculaties werden uitgevoerd in een kas met een temperatuur van 5—20° C.

De zaden werden na desinfectie in $^1/_8$ % Ceresanoplossing gedurende een half uur en na droging aan de lucht, te kiemen gelegd in vochtig gesteriliseerd zand.

Als kiemingsbodem gebruikte Stapp vochtig zaagsel; ik kreeg met het mij ter beschikking staande slechte resultaten, daar het zaad er slecht in kiemde en slecht groeide na de kieming. Deze kiemingsbodem is ook volgens 's Jacob niet aan te raden, daar de boonen door de te groote vochtigheid erin spoedig aan rotting onderhevig zijn.

Nadat de kiemplanten zoo groot waren geworden, dat de cotylen uit de zaadhuid sprongen, werden zij

omgekeerd met cotyl en pluimpje gedurende 2 uur in een bacteriesuspensie gelegd. De bacteriesuspensie, die bereid werd door 6 wortelagarbuizen met een 2—4 dagen oude bacteriecultuur af te spoelen met 100 cc gesteriliseerd water, was in een glazen bakje van diameter 11 cm en hoogte 3,5 cm uitgegoten en hierin werden de kiemplanten slechts met hun cotylen en pluimpje gelegd, terwijl de wortels er boven uit staken, zoodat zooveel mogelijk alleen het bovengrondsche gedeelte geïnoculeerd werd.

Over het geheel werd een glazen bak van diameter 14 cm en hoogte 7,5 cm gezet, zoodat alles van de lucht afgesloten was en zoo weinig mogelijk zou uitdrogen.

Na het liggen in de bacterie-suspensie werden de kiemplanten even op filtreerpapier te drogen gelegd en vervolgens in een gewone bloempot met, door stoom gesteriliseerde bladaarde, geplant (3 in een pot).

In April en Mei 1934 werden de inoculatieproeven op „Verbeterde Vroege Veensche" om de pathogeniteit van de 6 stammen na te gaan, uitgevoerd.

Bijna steeds werden voor iedere bacteriestam reeksen van 8 potten, dat is dus 24 planten ingezet, en voor de contrôle-reeks van niet geïnoculeerde planten hetzelfde aantal.

Daar de kieming van het zaad zeer onregelmatig verloopt, kon ik niet de reeksen tegelijkertijd inzetten, en was het tijdsverschil tusschen het eerste aanzetten van de proef en het laatste ± 3 weken.

Voor het bepalen van de pathogeniteit nam ik hoofdzakelijk alleen de ziekteverschijnselen op bladeren of stengels in aanmerking; de lengte van de planten werd ook wel eens bepaald, maar daar de temperatuur van de kas niet constant was, niet nader beschouwd.

Inoculatie met stam I.

Bij de 21 geïnoculeerde planten vertoonden 16 planten na 16 dagen chlorotische vlekken met kleine verdorde stipjes op de bladeren. Enkele planten hadden op de stengels roodbruine vlekstrepen, die na 24 dagen bij 17 planten voorkwamen.

Na 32 dagen waren de planten hoog en groot en goed ontwikkeld; alle bladeren echter waren zeer licht groen. Twee planten vertoonden aan de voet van de stengel een groote lichtbruine schimmelvlek en moesten dus als proefobject uitgeschakeld worden.

15 planten hadden chlorotische vlekken op de bladeren en 17 roodbruine streepvlekken op de stengels. Van 10 planten waren de bladeren opgerold. Van de 21 planten waren na ± 50 dagen 2 door schimmel aangetast en 19 met vlekken op de stengels.

Inoculatie met stam II.

Met deze stam werden eerst 18 kiemplanten geïnoculeerd en een week later nog eens 6.

Van de 18 planten hadden na 1 week alle planten enkele vetvlekken op de cotylen, terwijl bij 14 planten halo-vlekjes op de bladeren te ontdekken waren.

Na 17 dagen hadden de planten zich vrij goed ontwikkeld en zagen zij er niet zeer aangetast uit. De bladeren hadden nog wel enkele vlekken, waarvan het binnenste dor en bruin was, maar de vlekken waren niet grooter geworden. Een enkele plant had een blad, dat groengeel mozaïekachtig verkleurd was.

Onder op de stengels waren al eenige roodbruine vlekjes te zien.

Na 25 dagen waren de planten hoog en forsch ontwikkeld met groote bladeren. Het leek of zij over de ziekte heen waren gegroeid. 11 planten hadden chlorotische vlekken op de bladeren en 12 roodbruine streepvlekken op de stengels. 1 plant was door schimmel aangetast aan de voet.

Van de 6 planten, die 1 week later behandeld waren dan de eerste 18, waren van alle na 11 dagen de bladeren zeer chlorotisch gevlekt; zij zagen er alle zeer slecht en sterk aangetast uit.

Na 19 dagen waren de bladeren nog sterk chlorotisch getint en vertoonden 4 planten roode vlekken op de stengels. Deze planten waren sterk aangetast.

Van de 24 planten waren er 19 met vlekken op de stengels.

Inoculatie met stam III.

Met deze stam werden eerst 12 kiemplanten geïnoculeerd, daarna 6 en toen nog eens 6.

Eerste 12. Na 5 dagen hebben alle planten vetvlekken op de cotylen en chlorotische halo-vlekjes op de bladeren, waarvan bij enkele planten zeer vele op een blad voorkomen en bij andere slechts een enkele.

Na 25 dagen waren de planten hoog opgegroeid, maar de bladeren waren weinig uitgegroeid en bij alle planten verscheiden chlorotisch gevlekt. Bij alle 12 planten traden roodbruine vlekken op de stengels op.

Bij de eerste 6 geïnoculeerde planten zagen alle er na 11 dagen zeer slecht uit, met vetvlekken op de cotylen en sterk chlorotisch gekleurde bladeren.

Na 19 dagen waren de planten klein gebleven en slecht uitgegroeid, met kleine, leelijk gevormde, chlorotische bladeren. 4 planten vertoonden roodbruin gevlekte stengels.

Na 35 dagen hadden alle planten roodbruin gevlekte stengels.

Van de laatste 6 geïnoculeerde planten waren na 5 dagen bij alle de cotylen met vetvlekken bespikkeld, die eenigszins bruinachtig verkleurden. 1 plant vertoonde vele halo-vlekken op de bladeren, terwijl de andere slechts een enkele hadden.

Na 13 dagen waren deze 6 planten zeer slecht ontwikkeld en uitgegroeid met zeer chlorotische bladeren.

Na 29 dagen was 1 plant door een schimmel aangetast en verdord, de andere 5 waren met duidelijke roodbruine vlekken op de stengels.

Van de 24 planten was dus 1 door een schimmel aangetast en 23 met roodbruine vlekken op de stengels.

Inoculatie met stam IV.

Eerst werden 9 planten behandeld en 14 dagen later 15 planten.

Van de 9 planten was na 5 dagen 1 plantje niet ontwikkeld en verrotte in de aarde. De 8 andere vertoonden vetvlekken op de cotylen en meer of minder halo-vlekken op de bladeren.

Na 25 dagen waren de 8 planten wel hoog ontwikkeld, maar de bladeren zagen er niet mooi uit en waren chlorotisch gevlekt. Bij alle waren de stengels met roodbruine vlekstrepen.

Van de 15 planten waren na 12 dagen alle klein gebleven en slecht ontwikkeld met vetvlekken op de cotylen, chlorotische vlekken op de bladeren en roodbruine vlekken op de stengels.

Van de 24 planten was 1 te gronde gegaan en hadden 23 roodbruin gevlekte stengels.

Inoculatie met stam V.

Bij deze stam werden ook eerst 9 kiemplanten behandeld en later 15.

Van de 9 planten vertoonden na 5 dagen alle vetvlekjes op de cotylen en halo-vlekken op de bladeren.

Na 17 dagen waren de planten hoog opgegroeid met bladeren met lichte vlekken.

Na 25 dagen waren de planten flink en groot en eenigszins over de ziekte heengegroeid.

Van de 9 hadden alle chlorotische vlekken op de bladeren en 7 roodbruine vlekken op de stengels.

Van de 15 later behandelde planten hadden na 5 dagen alle vetvlekken op de cotylen, bij slechts 9 waren halo-vlekken op de bladeren.

Na 13 dagen waren de planten weinig hoog uitgegroeid en weinig ontwikkeld, alle 15 hadden chlorotische vlekken op de bladeren en 9 hadden bruine vlekken op de stengels.

Van de 24 planten hadden na 30 dagen alle kleine of zeer kleine roodbruine vlekken op de stengel.

Inoculatie met stam VI.

Eerst werden 15 planten behandeld en eenige dagen later 9 planten.

De eerste 15 waren na 12 dagen zeer sterk aangetast. Bij alle planten vetvlekken op de cotylen, die bruinachtig verkleurd waren; geen enkel blad was normaal uitgegroeid, alle met bruine necrotische en chlorotische vlekken, op de stengels roodbruine plekken,

Van de 9 later behandelde planten waren na 8 dagen alle met vetvlekken op de cotylen en met chlorotische vlekken op de bladeren. Bij 5 waren roodbruine vlekken op de stengels.

Na 24 dagen vertoonden alle planten roodbruine vlekken op de stengels.

Contrôle-planten.

Als contrôle werd een reeks van 24 kiemplanten aangezet, die op dezelfde wijze als de geïnoculeerde planten behandeld waren, behalve dat in plaats van een bacteriesuspensie voor de onderdompeling 100 cc gesteriliseerd water gebruikt werd.

Na 11 dagen waren alle planten goed ontwikkeld en bij geen van alle waren vlekken te bekennen, noch op de cotylen, bladeren of stengels.

Na 20 dagen waren alle planten hoog en mooi ontwikkeld, met groote forsche bladeren, geen vlekken op de bladeren of stengels.

Uit de hierboven beschreven proeven bleek, dat de contrôle-planten er steeds volkomen gezond uitzagen, terwijl bij de geïnoculeerde planten de inoculaties

positief waren, waaruit te concludeeren viel, dat de bacteriestammen pathogeen waren.

Op „Gele Citroen" werden in April 1936 op dezelfde wijze inoculatie-proeven uitgevoerd met 2 bacteriestammen. De proefreeksen bestonden uit 30 planten in 10 potten.

Inoculatie met stam V.

Na 15 dagen hadden alle planten vetvlekken op de cotylen en vele donkergroene, waterdoordrenkte, kleine vlekken, op de bladeren. Bij 28 planten waren aan de achterzijde van de bladeren op de nerven roodbruine streepjes en vlekken.

Vele planten vertoonden verleppingsverschijnselen.

Na 37 dagen waren alle, klein gebleven planten verlept met bruine verdorde plekken op de bladeren.

Bij alle planten zijn uit de stengel op verscheidene plaatsen witte bacteriemassa's naar buiten gekomen. Roode verkleuringen op de stengels kwamen slechts weinig voor.

De aantasting is bij alle planten zeer heftig geweest.

Inoculatie met stam VI.

Na 15 dagen vertoonden alle planten vetvlekken op de cotylen. Bij alle planten waren ook waterdoordrenkte vlekjes op de bladeren, maar in veel mindere mate dan bij de vorige stam V, want de meeste planten hadden slechts een enkel vlekje.

Geen enkele plant vertoonde een begin van verlepping, alle waren veel beter ontwikkeld dan degene, die met stam V besmet waren. Slechts bij een enkele plant een bruine verkleuring aan de achterzijde van de bladeren.

Geen chlorotische bladvlekken.

Na 34 dagen zijn de waterdoordrenkte vlekken op de bladeren donkerbruin en verdord.

Bij een enkele plant is een chlorotisch blad. Vele verkleurde nerven aan de achterzijde van de bladeren.

1 plant was aan de voet van de stengel door een schimmel aangetast, welke schimmel ik niet nader onderzocht heb.

Bij 26 planten waren onder op de stengel kleine, lichtroode verkleuringen.

Alle planten waren aangetast, maar in veel mindere mate dan bij bacteriestam V.

Contrôle.

Na 15 dagen zagen de planten er goed uit; geen vetvlekken op de cotylen.

Bij 1 plant was een waterdoordrenkt vlekje op het blad. Geïnoculeerde en contrôle-planten stonden wegens ruimtegebrek vrij dicht naast elkaar, zoodat de mogelijkheid van besmetting van de contrôle-planten niet uitgesloten was.

Na 37 dagen waren de planten goed ontwikkeld, grooter en forscher dan de geïnoculeerde. 3 waren echter door een schimmel aan de stengelvoet aangetast en 2 vertoonden bacterievlekken op de bladeren.

Evenals op „Verbeterde Vroege Veensche" verliepen de inoculaties op „Gele Citroen" positief.

De ziektesymptomen van beide boonenvariëteiten kwamen bij deze proeven in de kas niet volkomen overeen; er moet bij in aanmerking genomen worden, dat de uitwendige omstandigheden wegens verschillende jaren (de maanden waren dezelfde), waarin de proeven uitgevoerd werden, ook niet volkomen gelijk waren.

Bacteriestam V en stam VI tastten deze twee boonen-variëteiten niet in dezelfde mate aan.

De „Verbeterde Vroege Veensche" werd door stam VI sterker aangetast dan door stam V, terwijl het omgekeerde het geval was bij „Gele Citroen".

De oorzaak hiervan kan ik niet met zekerheid verklaren. Behalve een verschil in gevoeligheid van de

boonen-variëteiten tegenover de bacterie, kan er mogelijk een verschil in uitwendige omstandigheden bij de proeven aanwezig zijn geweest of kan er achteruitgang in virulentie van bepaalde stammen in reincultuur hebben plaats gehad.

§ 2. INOCULATIE VAN ZAAD IN DE VOLLE GROND.

Bij deze proef was het de opzet na te gaan, of het mogelijk was door het zaad uitwendig te besmetten zieke boonenplanten te krijgen.

Hierbij werd het zaad gedurende twee uur in een bacterie-suspensie gelegd (afspoeling van 8 snijboonen agarbuizen van 5 dagen met 200 cc gesteriliseerd water), voordat het in de volle grond, (lichte zandgrond) eind Mei uitgezaaid werd. De contrôleboonen hadden twee uur in gesteriliseerd water gelegen.

Uitgezaaid werden voor iedere reeks ± 50 zaden stamdopboonen „Gele Citroen" en stamslaboonen „Fijne Trosprincesse" en stoksnijboonen „Verbeterde Vroege Veensche".

Op de besmette citroenboonen hadden de bacteriën terstond zeer sterk ingewerkt, daar bleek, dat slechts 4 na kieming zich verder ontwikkeld hadden, terwijl de andere tijdens of dadelijk na de kieming te gronde waren gegaan. Bij de contrôle waren 45 gekiemd en doorgegroeid.

„Trosprincesse" is een minder gevoelige soort; 38 van de besmette groeiden na kieming door en 50 van de contrôle.

Na twee maanden hadden bij de citroenboonen de contrôleplanten zich goed ontwikkeld met forsche bladeren zonder vlekken. De 4 geïnoculeerde planten vertoonden chlorotische vlekken op de bladeren en na peulvorming vetvlekken op de peulen; ze zagen er sterk aangetast uit.

Van de trosprincessen waren de contrôlen na

een paar maanden flink uitgegroeid. Een groot verschil vormden deze planten met de besmette, die slecht ontwikkeld waren en chlorotische bladeren en vlekken hadden.

Van „Verbeterde Vroege Veensche" waren na een maand in de besmette reeks 32 zaden gekiemd. 3 planten waren zeer klein en onuitgegroeid gebleven. Van de andere planten, die even groot uitgegroeid waren als de contrôleplanten, hadden 3 planten groote chlorotische vlekken op de bladeren en 5 planten zeer kleine, gele halo-vlekken.

Van de niet besmette contrôle waren 47 zaden gekiemd. De planten waren goed uitgegroeid, echter niet beter dan de meeste geïnoculeerde.

De aantasting was na een maand vrij gering geweest.

Na 2 maanden was de groei van de geïnoculeerde planten veel slechter geweest dan van de contrôleplanten. De lengte was veel minder, 75 cm—150 cm tegen 150 cm—250 cm. De geïnoculeerde planten hadden nog geen bloemen en zeer weinig blad, dat klein was met bruine en verdorde plekken. Op de stengels kwamen bruine streepvlekken voor.

De contrôleplanten hadden zoowel bloemen als vele groote bladeren; deze laatste waren echter bij verscheidene planten chlorotisch gevlekt, wat er op wijst, dat de contrôleplanten niet volkomen ziektekiemvrij waren. Daar de geïnoculeerde planten er echter veel slechter bij stonden dan de contrôleplanten, mag ik toch wel bij deze boonenvariëteit zeggen, dat de inoculatie positief verloopen is.

Zooals uit de proeven, en speciaal met „Gele Citroenboon", bleek, kan uitwendige besmetting van het zaad sterk vernietigend werken, zoodat zoowel tijdens de kieming de planten te gronde gaan, als gedurende het jonge stadium na het opkomen, terwijl de volgroeide in heftige mate aangetast worden.

§ 3. Inoculatie van zaad in cultuurbuizen in reincultuur.

In reincultuur werd door mij de inoculatie van boonenzaad nagegaan volgens de methode, die Brinkman vermeldt, n.m.l. het laten kiemen van boonenzaden in geïnfecteerde agarbuizen.

In buizen, 25 per reeks, werd 6 cc aardappelagar van pH6,8 gegoten; tijdens het hard worden van de agar werden deze buizen een weinig scheef gezet, daar op horizontale agar in een buis te weinig ruimte voor een kiemende boon was.

De pH van de agar was lager gesteld dan gewoonlijk voor bacteriegroei, omdat volgens 's Jacob pHJ7,0 te alcalisch is voor boonen planten en bij pH6,0—6,6 het groei-optimum ligt. Het milieu was dus gunstig voor de boon.

Op de agar werden de verschillende bacteriestammen geënt, wat bij de contrôlebuizen niet geschiedde; na 8 dagen in den thermostaat bij 25° C. gestaan te hebben, werden de buizen van een boonzaad voorzien en bij kamertemperatuur gezet.

Dit zaad, „Verbeterde Vroege Veensche", was gedurende 5 min. gedesinfecteerd in 4 % formaline en daarna gedurende 10 min. afgespoeld met gesteriliseerd water, dat eenige malen ververscht werd. Dit afspoelen is absoluut noodzakelijk; wanneer men niet afspoelt, groeien de wortels niet uit. Dit bleek, toen ik van tevoren naging, hoe lang ik zou moeten desinfecteeren en of naspoelen met water aan te raden was. Als desinfectans gebruikte ik 4 % formaline, daar de mogelijk achtergebleven resten hiervan op het zaad verdampen en geen schadelijke werking zullen uitoefenen op de bacteriën, wat bij andere desinfectiemiddelen wel het geval zou kunnen zijn.

Boonenzaden werden respectievelijk 5, 10 en 15

minuten in 4 % formol gedesinfecteerd en de eene helft werd voor het uitleggen op agar niêt en de andere helft wèl gedurende 5 minuten afgespoeld met gesteriliseerd water dat 2 × ververscht werd.

Van elke serie werden 10 zaden uitgelegd.

De zaden kiemden goed; bij 5 en 10 minuten desinfectie alle, bij 15 minuten desinfectie 9 zaden van de 10.

Bij de nagespoelde zaden groeiden de wortels goed uit, wat niet het geval was bij de niet afgespoelde, waarbij ze zeer kort en klein bleven en donker bruin gekleurd.

Van de inoculatieproeven in buizen met aardappelagar in reincultuur was het verloop als volgt. Na 12 dagen was de groei na kieming zooals in de tabel is aangegeven. In de geïnoculeerde buizen waren vele zaden wel gekiemd, maar niet verder ontwikkeld. Bij alle waren de wortels dik, opgezwollen, onuitgegroeid en bruin verkleurd. In de contrôlebuizen waren de wortels ook zeer zwak bruinachtig getint, wat altijd het geval is bij wortels op agar, maar verder mooi lang en goed uitgegroeid.

TABEL I.

12 dagen oude planten.

Bact. stam	Aantal zaden	Gekiemd	Niet verder ontwikkeld	Aantal planten met lengte:				
				+ 1 cm.	+ 3 cm.	+ 6 cm.	+ 9 cm.	+ 12 cm.
I.	25	24	17	6	0	0	0	0
II.	25	25	18	7	0	0	0	0
III.	25	25	23	0	2	0	0	0
IV.	25	25	17	6	2	0	0	0
V.	25	25	21	3	0	1	0	0
VI.	25	25	17	5	3	0	0	0
contrôle.....	25	24	7	4	3	3	1	6

Zooals in Tabel I te zien is, vertragen na sterke besmetting de bacteriën de groei van de kiemplanten sterk, daar de lengte van de niet geïnfecteerde contrôlen veel langer was.

Door de besmetting wordt de groei niet volkomen tegengehouden, want na langere tijd waren de kiemplanten in de besmette buizen uitgegroeid, echter wel wat minder dan in de onbesmette.

Na 20 dagen waren alle kiemplanten, zoowel de geïnoculeerde als de contrôle goed ontwikkeld en door de geheele buis gegroeid; bij de contrôle zelfs uit de buis.

Bij de geïnoculeerde waren op de cotylen vetvlekken te onderscheiden, die bij sommige rood gekleurd waren. Op de wortels waren lichtroodbruine vlekken, met meestal helderroode tot roodbruine vlekken op de stengelbasis, terwijl meer naar boven op de stengel de vlekken bruiner waren en kleiner met een neiging tot streepvorm. Zie Tabel II.

Bij de contrôle was niets van vlekken of strepen op wortels, stengels en cotylen te zien.

TABEL II.

20 dagen oude planten.

Bact. stam	Aantal zaden	Aantal planten met vlekken op wortels	Op stengelbasis	Op stengel	Op cotylen
I.	25	8	18	8	12
II.	25	15	15	7	12
III.	25	11	11	12	17
IV.	25	10	9	5	10
V.	25	7	1	9	13
VI.	25	9	10	3	13
contrôle ..	25	0	0	0	0

Bij deze proef had de bacterie een voorsprong op de boon gehad, daar zij eenige dagen op de agar, die bovendien een zeer goede voedingsbodem was, was geënt, voordat het boonenzaad in de buis gelegd werd en zich dus goed had kunnen vermeerderen.

Bij twee volgende proeven werden de omstandigheden eenigszins gewijzigd en voor de bacterie iets minder gunstig gemaakt.

Bij de tweede proef gebruikte ik uitgewasschen agar, waarin voor de bacterie zoowel als voor de boon weinig voedingsstoffen aanwezig zijn; ik bracht wat bacterie massa op de agar en op de boon, nadat de boon in de buis gedeponeerd was, zoodat het zaad niet, zooals bij de vorige proef dadelijk in een groote bacteriehoeveelheid kwam te liggen.

Bij de derde proef verbeterde ik de omstandigheden voor de boonenkiemplanten nog eenigszins door in plaats van uitgewasschen agar Knopagar (pH6,0) te nemen.

Bij de 2e en 3e proef werd zooals bij de 1ste 6 cc agar in de buizen gedaan (25 voor iedere reeks) en werden de zaden „Verb. Vroege Veensche" voor het gebruik 5 minuten in 4 % formol gedesinfecteerd en 10 minuten afgespoeld met gesteriliseerd water, dat eenige malen ververscht werd. De kieming geschiedde bij kamertemperatuur. Slechts met stam VI werden de 2e en 3e proef uitgevoerd en als contrôle 25 niet geïnfecteerde buizen.

2e proef met uitgewasschen agar.

De groei van de bacteriën op de agar was matig. Na 14 dagen waren bij de geïnfecteerde boonen alle zaden gekiemd, terwijl de meeste zeer klein waren gebleven. Bij 4 kiemplanten waren vetvlekken op de cotylen. Bij de pas gekiemde waren de wortels dik en kort en propperig, terwijl ze bij de grootere lang uitgegroeid waren en er vrij goed uitzagen.

Noch op de stengels, noch op de wortels waren roode vlekken te onderscheiden.

De lengte verliep van 12 tot 0,5 cm, zooals in Tabel III is aangegeven.

TABEL III.

14 dagen oude planten.

Bact. stam	Aantal zaden	Gekiemd	Niet verder ontwikkeld	Aantal planten met lengte :				
				1 cm.	3 cm.	6 cm.	9 cm.	12 cm.
I	25	25	1	8	3	4	7	2
contrôle.....	24	24	1	1	2	3	3	14

Bij de contrôleplanten waren alle zaden goed gekiemd en over het algemeen ook goed uitgegroeid. De wortels waren goed, lang en smal ontwikkeld.

Geen vlekken op cotylen, stengels of wortels. De lengte was van 12,5 tot 0,5 cm; ziet tabel.

Na 18 en 21 dagen waren bij de geïnoculeerde zaden nog geen vlekken op stengels en wortels te zien. Doordat de kiemplanten toen uit de buizen groeiden, moesten ze opgeruimd worden.

Bij de 3e proef op Knopagar was na 14 dagen in de geïnfecteerde buizen *é*en zaad niet gekiemd; de rest wel, die verder goed ontwikkeld was.

Het wortelstelsel was niet zooals bij de vorige proeven kort en gedrongen, maar normaal lang uitgegroeid, wel eenigszins bruinachtig.

Bij 9 kiemplanten waren vetvlekken op de cotylen, echter geen vlekken op stengels en wortels, die er noch na 18 noch na 21 dagen te zien waren.

De lengte van de kiemplanten varieerde tusschen 13 en 0,5 cm. Ziet tabel IV.

TABEL IV.

14 dagen oude planten.

Bact. stam.	Aantal zaden.	Gekiemd	Niet verder ontwikkeld	Aantal planten met lengte:				
				± 1 cm.	± 3 cm.	± 6 cm.	± 9 cm.	± 12 cm.
I	25	24	2	3	0	3	2	15
contrôle.....	25	23	5	0	3	2	2	13

Bij de contrôleplanten was de kieming iets slechter geweest, namelijk 2 niet gekiemd en bij 1 slechts een worteltje.

Bovendien waren er 5 niet uitgegroeid. De rest zag er goed uit met een mooi, lang uitgegroeid wortelstelsel en totaal geen vlekken op cotylen, stengels en wortels, die ook na lange tijd niet optraden.

De lengte varieerde tusschen 13 en 0,5 cm; zie tabel IV.

Zooals blijkt waren bij de 2e en 3e proef de kiemplantjes wel door de bacterie aangetast, maar in mindere mate dan bij de 1ste.

Deze 3 proeven-series werden op dezelfde wijze met variëteit „Gele Citroen" herhaald.

Alleen was er dit verschil, dat de reeksen grooter waren (55 buizen per reeks) en de zaden gedurende 1 uur in 4 % formol gedesinfecteerd werden met naspoeling gedurende 20 minuten met eenige malen ververscht gesteriliseerd water. Deze twee veranderingen waren noodzakelijk, daar het zaad eenigszins besmet was met saprophytische bacteriën en schimmels.

1*e proef*. In cultuurbuizen met aardappelagar werden de bacteriën (stam VI) geënt; na 8 dagen in de thermostaat bij 25° C. gestaan te hebben, werden de buizen met een gedesinfecteerd zaad voorzien en bij kamertemperatuur gezet.

Na 20 dagen was bij de geïnoculeerde zaden de groei na de kieming zooals in de tabel no. V is aangegeven:

TABEL V.

20 dagen oude planten.

Bact. stam	Aantal zaden	Gekiemd	Door schimmel en bacteriën verontreinigd	Niet verder ontwikkeld	Aantal planten met lengte:				
					± 1 cm.	± 3 cm.	± 6 cm.	± 9 cm.	± 12 cm.
VI	55	55	4	34	6	6	5	0	0
contrôle..	55	51	7	18	5	9	11	2	3

De meeste zaden waren na de kieming niet uitgegroeid.

De wortels waren bij de juist ontkiemde zaden kort en gezwollen, bij de andere normaal en lang, maar zeer bruin verkleurd. Het geheel zag er vrij slecht uit.

Zie voor de groei na 30 dagen de tabel no. VI.

TABEL VI.

30 dagen oude planten.

Bact. stam	Aantal zaden	Gekiemd	Door schimmel en bacteriën verontreinigd	Niet verder ontwikkeld	Aantal planten met lengte:				
					± 1 cm.	± 3 cm.	± 6 cm.	± 9 cm.	± 12 cm.
VI	55	55	4	4	18	19	6	4	0
contrôle..	55	51	7	6	12	5	4	4	17

Bij de geïnoculeerde waren de wortels over het algemeen klein, bruin en verslijmend. Bij 16 kiemplanten waren vetvlekken op de cotylen en bij 17 een groote, bruinachtige, verrotte, natte vlek op de stengel.

Bij de klein gebleven planten, kleiner dan 3 cm, waren de cotylen binnen de zaadhuid gebleven, zoodat

niet te onderscheiden was, of er wel of geen vlekken op de cotylen waren.

Het aantal planten, dat dus in aanmerking kwam voor vetvlekken op de cotylen was 29. Vele van de kleinere planten zagen er verrot en verslijmd uit en het geheel maakte een zeer aangetaste indruk.

De niet geïnoculeerde zaden vertoonden een groei na 20 en 30 dagen, zooals in de tabellen V en VI is te zien.

De wortels waren over het algemeen ook bruinachtig en vrij slecht ontwikkeld, maar toch beter dan bij de geïnoculeerde.

Op geen van de kiemplanten waren vetvlekken op de cotylen of vlekken op de stengels te onderscheiden. De groei was bij de niet geïnoculeerde sneller dan bij de geïnoculeerde.

2e proef. Cultuurbuizen met uitgewasschen agar, waarin het gedesinfecteerde zaad gelegd werd, dat met wat bacteriemassa besmet werd.

De groei verliep bij geïnoculeerde en niet geïnoculeerde zaden na 18 en 26 dagen zooals in de tabellen VII en VIII is aangegeven.

TABEL VII.

18 dagen oude planten.

Bact. stam	Aantal zaden	Gekiemd	Door schimmel of bacteriën verontreinigd	Niet verder ontwikkeld	Aantal planten met lengte: ± 1 cm.	± 3 cm.	± 6 cm.	± 9 cm.	± 12 cm.
VI	55	51	9	8	18	20	0	0	0
contrôle..	55	53	4	7	13	16	15	0	0

TABEL VIII.

26 dagen oude planten.

Bact. stam	Aantal zaden	Gekiemd	Door schimmel of bacteriën verontreinigd	Niet verder ontwikkeld	Aantal planten met lengte:				
					1 cm. +	3 cm. +	6 cm. +	9 cm. +	12 cm. +
VI	55	51	10	2	7	8	10	16	2
contrôle..	55	53	4	2	8	4	6	22	9

Na 18 dagen was er, behalve in de lengte (de niet geïnoculeerde waren veel langer dan de geinoculeerde) niet veel verschil te zien tusschen besmette en niet besmette zaden.

De wortels waren goed ontwikkeld, room wit.

Na 26 dagen hadden, van de geïnoculeerde planten, alle die langer waren dan 1 cm en zichtbare cotylen hadden, vetvlekken op de cotylen; 15 planten hadden een bruine, verrotte plek op de stengel.

3e proef. Cultuurbuizen met Knop-agar, waarin het gedesinfecteerde zaad gelegd werd, dat met wat bacteriemassa besmet werd.

Na 18 en 26 dagen verliep de groei zooals in de tabellen IX en X is aangegeven; ook hierbij snellere groei bij de niet geïnoculeerde dan bij de geïnoculeerde.

TABEL IX.

18 dagen oude planten.

Bact. stam	Aantal zaden	Gekiemd	Door schimmel of bacteriën verontreinigd	Niet verder ontwikkeld	Aantal planten met lengte:				
					1 cm. +	3 cm. +	6 cm. +	9 cm. +	12 cm. +
VI	55	54	4	5	14	14	11	7	0
contrôle..	55	55	2	4	7	15	16	11	0

TABEL X.

26 dagen oude planten.

Bact. stam	Aantal zaden	Gekiemd	Door schimmel of bacteriën verontreinigd	Niet verder ontwikkeld	Aantal planten met lengte: ± 1 cm.	± 3 cm.	± 6 cm.	± 9 cm.	± 12 cm.
VI	55	54	4	3	2	0	2	13	31
contrôle..	55	55	2	0	4	1	3	3	42

De wortels zagen er in alle buizen goed uit.

Na 26 dagen vertoonden bij de geïnoculeerde zaden 46 planten van de 49 die langer waren dan 1 cm, vetvlekken op de cotylen en 11 een bruine, verrotte plek op de stengels.

Wanneer wij de resultaten van de 1e, 2e en 3e proefserie met „Gele Citroen" met elkaar vergelijken, zien wij dat, evenals met „Verbeterde Vroege Veensche" de kiemplantjes steeds door de bacterie aangetast werden, en wel in dier voege, dat de aantasting bij de eerste serie (buizen met aardappelagar waarop de bacterie 8 dagen, voordat het zaad gelegd werd, geënt werd), het heftigst was, bij de tweede (buizen met uitgewasschen agar, waarop bacterie en zaad tegelijkertijd gebracht werden) iets minder en bij de derde (buizen met Knopagar waarop bacterie en zaad tegelijkertijd gebracht werden) nog minder.

§ 4. Inoculatie van grond in potten.

Met de vierde inoculatieproef werd nagegaan of boonenplanten ziek worden na in besmette grond gezaaid te zijn.

Hierbij heb ik steeds bladaarde geïnfecteerd in gewone, roode, poreuze bloempotten; de infecties verrichtte ik op verschillende wijzen.

Ten eerste gebruikte ik zoowel gesteriliseerde als niet gesteriliseerde aarde, daar dit op de infecties invloed kan hebben, zooals o.a. WENT vermeldt, die bij haar onderzoek over *Fusarium*ziekte van erwten geen infectie verkreeg van planten, die in gesteriliseerde besmette klei waren geplant.

Ten tweede varieerde ik het tijdstip van het zaaien van de boonen in de potten na de infectie van de aarde. Zoowel dadelijk nadat de aarde besmet was, werd het zaad uitgelegd, als eenige dagen later.

Bij het laatste kunnen de bacteriën zich in de aarde vermeerderd en verspreid hebben en daardoor de planten sterker aantasten, terwijl anderzijds ook mogelijk is, dat ze in niet gesteriliseerde aarde door de antagonistische werking van grondorganismen minder invloed hebben op de planten.

Ten derde infecteerde ik de aarde op twee verschillende manieren, n.l. met een (Reeks H-F) bacteriesuspensie, verkregen door afspoelen met water van een 2—4 dagen oude boonenagarcultuurbuis en (Reeks S-L), met een bacteriecultuur in snijboonenextract van 3 dagen oud.

Per pot werd de aarde geïnfecteerd met een afspoeling van 3 boonenagarbuizen of 8 snijboonenextractcultures met inhoud van 7 cc per buis en na de infectie werd de aarde omgewerkt, zoodat de bacteriën goed door de aarde gemengd waren.

Met de contrôlen inbegrepen, waarbij de aarde niet geïnfecteerd was, waren er dus 12 reeksen A-L, die ieder bestonden uit 24 planten in 8 potten.

Het zaad (Gele Citroen) werd voor het uitleggen, dat bij reeks A-F op 11-6-'34 en bij reeks G-L op 22-6-'34 geschiedde, gedurende ½ uur in $^1/_8$ % Ceresanoplossing gedesinfecteerd en daarna aan de lucht gedroogd.

Deze proeven werden in de open lucht in een met

glas overdekte kraam uitgevoerd in de maanden Juni—Juli.

De reeksen werden ± 1 maand na het zaaien gecontroleerd met het volgend resultaat.

Eerst zal ik de reeksen A-F, bij welke, behoudens de contrôlen, de infectie door middel van een suspensie geschiedde, behandelen.

Reeks A. Niet gesteriliseerde aarde begoten met een bacteriesuspensie in water, na 4 dagen het zaad uitgelegd.

21 planten waren opgekomen, waarvan 4 zeer klein waren gebleven, de andere goed ontwikkeld. 6 planten vertoonden chlorotische vlekken op de bladeren en 10 bruine vlekken op de stengels.

Reeks B. Niet gesteriliseerde aarde begoten met een bacteriesuspensie en dadelijk daarna het zaad uitgelegd.

Gekiemd waren 17 planten, waarvan 4 na een paar dagen waren afgestorven en 8 zeer klein bleven. De 13 in leven gebleven planten hadden chlorotische bladeren en waren sterk aangetast door de ziekte.

Reeks C. In niet gesteriliseerde, niet geïnfecteerde aarde het zaad uitgelegd. Slechts 10 zaden waren gekiemd, wat voor een contrôle, niet geïnfecteerde reeks een zeer slechte opkomst was. 1 plant bleef klein, maar de andere ontwikkelden zich goed.

Reeks D. Gesteriliseerde aarde begoten met een bacteriesuspensie en na 4 dagen het zaad uitgelegd. 15 zaden waren gekiemd; 4 planten bleven klein en 11 groeiden goed uit. 5 planten hadden chlorotische vlekken op de bladeren en eveneens 5 vlekken op de stengels.

Reeks E. Gesteriliseerde aarde begoten met een bacteriesuspensie, dadelijk daarna het zaad uitgelegd. Van de 24 zaden was de helft gekiemd, waarvan slechts 3 zich verder ontwikkelden.

5 waren dadelijk te gronde gegaan en 4 waren klein

gebleven. De 7 overgebleven planten vertoonden chlorotische bladvlekken en bruine vlekken op de stengels.

Reeks F. In gesteriliseerde, niet geïnfecteerde aarde het zaad uitgelegd. De helft was gekiemd en deze waren alle goed uitgegroeid.

TABEL XI.

Reeks	Aantal zaden	Gekiemd	Aantal met chl. vlekken	Klein gebleven	Opmerkingen
A niet gester.; geïnf. met susp.; na 4 dagen gezaaid.	24	21	6	4	
B niet gester.; geïnf. met susp.; dadelijk gezaaid.	24	17	13	8	4 snel te gronde.
C niet gester.; niet geïnf.; dadelijk gezaaid.	24	10	0	1	
D gester.; geïnf. met susp.; na 4 dagen gezaaid.	24	15	5	4	
E gester.; geïnf. met susp.; dadelijk gezaaid.	24	12	7	4	5 snel te gronde.
F gester.; niet geïnf.; dadelijk gezaaid.	24	12	0	0	

Zooals uit de tabel No. XI en uit de beschrijving hierboven blijkt, verliep de kieming van het zaad zeer slecht en daardoor werd het aantal planten, dat met elkaar vergeleken werd, zeer klein.

Volgens de verkregen resultaten maakte het, globaal

gesproken, bij besmetting geen verschil uit of men gesteriliseerde of niet gesteriliseerde aarde gebruikte, daar in beide gevallen de infectie ± even sterk was.

Wel was de aantasting van de planten door de bacterie heviger, wanneer men terstond na besmetting de zaden uitlegde, daar in dat geval de uitslag van de infectie 100 % was, terwijl die veel minder was, wanneer het zaad eenige dagen na de besmetting uitgelegd was.

In de nu volgende reeksen (G-L) had de infectie plaats door een bacteriecultuur.

Reeks G. Niet gesteriliseerde aarde begoten met een bacteriecultuur in snijboonenextract, na 3 dagen het zaad uitgelegd.

11 zaden waren gekiemd. 10 planten, waarvan 6 klein waren gebleven, vertoonden chlorotische bladvlekken.

Reeks H. Niet gesteriliseerde aarde begoten met een bacteriecultuur in snijboonenextract, dadelijk daarop het zaad uitgelegd.

Slechts 6 zaden waren gekiemd, wat een zeer laag percentage is. 1 plant was zeer snel te gronde gegaan en 4 hadden chlorotische bladvlekken.

Reeks I. In niet gesteriliseerde, niet geïnfecteerde aarde zaad uitgelegd.

14 planten waren gekiemd, die alle goed ontwikkeld waren.

Reeks J. Gesteriliseerde aarde begoten met een bacteriecultuur in snijboonenextract en na 3 dagen het zaad uitgelegd. Gekiemd waren 12 planten, waarvan 2 spoedig verlepten en te gronde gingen. 6 planten vertoonden chlorotische vlekken op de bladeren.

Reeks K. Gesteriliseerde aarde begoten met een bacteriecultuur in snijboonenextract en dadelijk daarop het zaad uitgelegd.

12 planten waren gekiemd en 6 hiervan waren

spoedig verlept en afgestorven. 5 planten hadden chlorotische vlekken op de bladeren.

Reeks L. In gesteriliseerde, niet geïnfecteerde aarde het zaad uitgelegd.

16 planten waren gekiemd en goed uitgegroeid.

TABEL XII.

Reeks	Aantal zaden	Gekiemd	Aantal pl. m. chl. vlekken	Klein gebleven	Opmerkingen
G niet gester.; geïnf. met cult.; na 3 dagen gezaaid.	24	11	10	6	
H niet gester.; geïnf. met cult.; dadelijk gezaaid.	24	6	4	0	1 snel te gronde.
I niet gester.; niet geïnf.; dadelijk gezaaid.	24	14	0	0	
J gester.; geïnf. met cult.; na 3 dagen gezaaid.	24	12	6	2	deze 2 slecht en verlept.
K gester.; geïnf. met cult.; dadelijk gezaaid.	24	12	5	6	deze 6 slecht en verlept.
L gester.; niet geïnf.; dadelijk gezaaid.	24	18	0	0	

Uit de hierboven gegeven beschrijving en uit Tabel XII blijkt, dat bij deze reeksen eveneens de kieming zeer slecht was verloopen en daardoor het aantal planten klein gebleven.

Bij besmette grond bleek weer, dat het geen verschil

maakte of men gesteriliseerde of niet gesteriliseerde aarde gebruikte; daartegen was evenals bij de vorige proefreeksen de infectie sterker, wanneer men terstond in de besmette aarde het zaad uitlegde.

Wanneer men beide proefreeksen met elkaar vergelijkt, kan men geen onderscheid zien tusschen het infecteeren met een bacteriesuspensie in water of een bacteriecultuur in snijboonenextract.

De invloed van besmette grond op zaad en planten ging ik op dezelfde wijze na op stamslaboonen, Fijne Trosprincessen, een boonensoort, die minder gevoelig is voor de hier behandelde ziekte dan de citroenboon.

12 potten met gesteriliseerde bladaarde werden per pot begoten met een suspensie van 5 boonen agarbuizen van 4 dagen oud en terstond na het infecteeren van de grond werd het zaad gelegd.

Met 4 bacteriestammen werd geïnfecteerd, n.l. stam I, III, V, VI en per stam 3 potten, d.i. 9 planten.

Ter vergelijking 12 potten met niet geïnfecteerde gesteriliseerde aarde.

Bij contrôle na 4 weken bleek, dat bij de geïnfecteerde aarde 34 planten gekiemd waren, waarvan 4 klein en slecht waren gebleven en de andere zich goed ontwikkeld hadden; 28 planten hadden groote chlorotische bladvlekken.

Bij de 36 contrôleplanten waren alle gekiemd en goed ontwikkeld en vertoonden geen vlekken op de bladeren.

Zooals uit de hierboven beschreven proeven blijkt, is infectie door de grond mogelijk.

In een volgend jaar werden deze proeven op eenigszins dezelfde wijze uitgevoerd met „Gele Citroen" en „Verbeterde Vroege Veensche", echter met

dit verschil, dat ik de bloempotten niet in een met glas overdekte kraam liet staan, maar ingegraven in de grond in de open lucht, opdat de aarde in de potten minder aan ongelijkmatige uitdroging bloot zou staan.

Bij de geïnoculeerde reeksen werd gesteriliseerde en niet gesteriliseerde bladaarde begoten met een afspoeling van 3 boonenagarcultuurbuizen met een 2—4 dagen oude bacteriecultuur.

Per reeks 24 zaden, die dadelijk na infectie van de aarde in 8 potten uitgelegd werden.

Bij de reeksen M, N, O, P werd de variëteit „Gele Citroen" en bij de reeksen Q, R, S, T, werd de variëteit „Verbeterde Vroege Veensche" geïnoculeerd.

Reeks M. Niet gesteriliseerde aarde begoten met een bacteriesuspensie in water.

Na 24 dagen waren 15 zaden gekiemd. 9 planten waren zeer klein gebleven en zeer slecht uitgegroeid met chlorotische bladeren, terwijl enkele bladeren verdord en verlept waren. De 6 andere planten vertoonden chlorotische en waterdoordrenkte vlekken op de bladeren.

Na 60 dagen waren slechts 2 planten overgebleven, die weinig uitgegroeid waren. De andere planten waren te gronde gegaan. De overgebleven planten hadden chlorotische vlekken op de bladeren en roode streepvlekken op de stengels. De aantasting was zeer heftig geweest.

Reeks N. Gesteriliseerde aarde begoten met een bacteriesuspensie.

Na 24 dagen waren 14 zaden gekiemd. De planten waren zeer klein met chlorotische en waterdoordrenkte vlekken op de bladeren.

Na 60 dagen waren 12 planten verdord en verlept en niet verder gegroeid. De 2 overgebleven planten waren weinig uitgegroeid; ze hadden chlorotische

vlekken op de bladeren en roode streepvlekken op stengels en bladstelen.

Bij deze reeks was de aantasting eveneens zeer heftig geweest.

Reeks O. Niet gesteriliseerde aarde, niet geïnfecteerd.

Na 24 dagen waren 16 zaden gekiemd. De planten waren goed opgegroeid met mooie, normale bladeren zonder vlekken.

Na 60 dagen waren alle planten mooi sterk uitgegroeid met forsche bladeren. Geen vlekken.

Reeks P. Na 24 dagen waren 21 zaden gekiemd. De planten stonden er goed bij, met goed gevormde bladeren zonder vlekken.

Na 60 dagen kwamen evenmin vlekken voor op de goed uitgegroeide planten, noch op de bladeren, noch op de stengels.

Bij deze reeksen met „Gele Citroen" was de aantasting in zeer heftige mate verloopen; tusschen geïnoculeerde en niet geïnoculeerde planten was het verschil buitengewoon groot. Het gebruik van gesteriliseerde en niet gesteriliseerde aarde gaf geen verschil; bij beide was de aantasting gelijk. Bij niet-inoculatie was het aantal gekiemde zaden in niet gesteriliseerde aarde kleiner dan in gesteriliseerde aarde.

Reeks Q. Niet gesteriliseerde aarde begoten met een bacteriesuspensie.

Na 24 dagen waren 22 zaden gekiemd. 11 planten hadden chlorotische of halo-vlekken op de bladeren; 3 planten hadden slechts zeer kleine, gele vlekjes op de bladeren; op 8 planten waren geen vlekken te bekennen.

Na 60 dagen waren alle planten hoog en mooi opgegroeid met mooie, groote bladeren. Slechts bij 3 planten kwamen roode streepvlekken op de stengels en chlorotische vlekken op de bladeren voor. De aantasting was zeer gering geweest.

Reeks R. Gesteriliseerde aarde begoten met een bacteriesuspensie.

Na 24 dagen waren 23 zaden gekiemd. 2 planten waren slecht uitgegroeid en klein gebleven met chlorotisch gevlekte bladeren. 10 planten hadden geheel of gedeeltelijk chlorotisch getinte bladeren en 11 planten hadden slechts zeer kleine halo-vlekjes op de bladeren. Alle planten waren op dat tijdstip aangetast, alhoewel de meeste slechts in een zeer lichte graad.

Na 60 dagen waren de planten hoog opgegroeid met forsche, mooie bladeren. 8 planten hadden roode streepvlekken op de stengels, terwijl bij enkele planten chlorotische bladeren voorkwamen. De aantasting was matig geweest.

Reeks S. Niet gesteriliseerde aarde, niet geïnfecteerd.

Na 24 dagen waren 20 zaden gekiemd. Geen van de planten vertoonden vlekken op de bladeren. Alle planten waren goed opgegroeid, echter niet hooger of grooter dan de geïnoculeerde reeks.

Na 60 dagen waren de planten mooi hoog opgegroeid, echter niet beter dan de geïnoculeerde, zonder blad- en stengelvlekken.

Reeks T. Gesteriliseerde aarde, niet geïnfecteerd.

Na 24 dagen waren 24 zaden gekiemd. 1 plantje zag er zeer slecht uit met een verdroogd pluimpje. De andere planten waren goed, zonder vlekken, met mooie bladeren.

Na 60 dagen waren de planten mooi en hoog opgegroeid, echter niet beter dan de geïnoculeerde reeks. Geen vlekken op de stengels en geen chlorotische bladeren.

Wanneer we deze reeksen, waarbij „Verbeterde Vroege Veensche" gebruikt werd, nagaan, dan valt op, dat deze boonenvariëteit veel minder aangetast werd dan „Gele Citroen". Bij gebruik van geïn-

fecteerde, gesteriliseerde aarde had geringe aantasting plaats, die bij gebruik van geïnfecteerde, niet gesteriliseerde aarde nog geringer was.

In gesteriliseerde, niet geïnfecteerde aarde verliep, evenals bij „Gele Citroen", de kieming iets beter dan in niet gesteriliseerde, niet geïnfecteerde aarde.

Recepten van uitgewasschen agar en Knopagar.

Uitgewasschen agar:

1000 cc aqua dest.
15 gr. agar (in kleine stukjes geknipt).

De agar wordt in het water een week bij kamertemperatuur gezet. Daarna flink uitwasschen en de agar wegen en vullen tot 1 kg. Dan oplossen, opkoken en filtreeren. Steriliseeren 15 min. op 120° C.

Knop-agar:

1000 cc Knop-oplossing.
15 gr. agar.

Oplossen, opkoken. Steriliseeren 15 min. bij 120° C.

Knop-oplossing:

1000 cc aqua dest.
10 gr. calciumnitraat.
0,12 gr. kaliumchloride.
0,25 gr. kaliumfosfaat (KH_2PO_4).
0,25 gr. magnesiumsulfaat.
spoor ijzerchloride ($FeCl_3$).

HOOFDSTUK V.

ONDERZOEK NAAR HET BINNENDRINGEN EN HET VOORKOMEN VAN DE BACTERIE IN HET ZAAD.

Zooals ik in een voorgaand hoofdstuk beschreven heb, heeft de verspreiding van de bacterieziekte voornamelijk door het zaad plaats.

Het leek mij wenschelijk na te gaan, hoe de bacterie in het zaad kan binnendringen, n.l. of dit door de aanhechtingsplaats van het zaad aan de peul geschiedt en in welk weefsel van het zaad de bacterie dan zou kunnen voorkomen.

Hiertoe werden van kunstmatig geïnfecteerd, gefixeerd materiaal hand- en microtoomcoupes gemaakt, op welke een bacteriekleuring werd toegepast.

Volkomen gezonde snijboonpeulen, die even gedesinfecteerd waren in 4 % formaline en daarna 10 minuten afgespoeld met eenige malen ververscht, gesteriliseerd water, infecteerde ik met de bacterie. Na eenige dagen, toen er duidelijke, waterdoordrenkte vlekken op de peulen ontstaan waren met roode verkleuringen langs de naad, werden de peulen in stukken gesneden. Deze stukken werden gedurende 48 uur in ZENKER's vloeistof gefixeerd.

Zenker's vloeistof:

sublimaat 5 g.
kaliumbichromaat 2,5 g.
natriumsulfaat 1,0 g.
ijsazijn 1 cc
water 100 cc

Vervolgens werden de stukken in stroomend leidingwater gedurende 24 uur uitgewasschen en daarna door alcoholreeksen in alcohol 96 % overgebracht. De alcoholtrappen waren 30 %, 60 %, 80 %, waarin ik de stukken respectievelijk 2 uur liet liggen.

De handcoupes werden van het 96 % alcoholmateriaal gesneden en gekleurd volgens de methode van STOUGHTON met wijzigingen van RAWLINS.

Om microtoomcoupes te verkrijgen werd 96 % alcoholmateriaal door 100 % alcohol-benzol in paraffine overgevoerd en daarin ingesmolten.

Hiervan werden met een koolzuurbevriezingsmicrotoom van SARTORIUS te Göttingen (zonder bevriezen!) coupes van 10 μ gesneden, die na behandeling met xylol en alcohol gekleurd werden volgens STOUGHTON.

Het overbrengen van het materiaal in paraffine voor de microtoomcoupes en het kleuren van de handcoupes en de microtoomcoupes geschiedde op de volgende wijze:

Overbrengen van 96 % alcohol materiaal in paraffine over alcohol 100 %-benzol.

Gedurende 2 uur in alcohol 100 %, eenige malen ververscht.

Gedurende 1½ uur in een mengsel van 3 deelen alcohol 100 % en 1 deel benzol.

Gedurende 1½ uur in een mengsel van 2 deelen alcohol 100 % en 2 deelen benzol.

Gedurende 1½ uur in een mengsel van 1 deel alcohol 100 % en 3 deelen benzol.

Gedurende 18 uur in benzol, eenige malen ververscht.

Vervolgens werd voorzichtig op het benzol gesmolten paraffine (smeltpunt 48°—52° C.) geschonken en het geheel op een thermostaat met een temperatuur van 54° C. gezet.

Na 24 uur werden de stukken materiaal in gesmolten paraffine (zelfde smeltpunt) overgebracht en in de thermostaat gezet; de paraffine werd om de 24 uur ververscht, wat 5 maal geschiedde, waarna de stukken in de paraffine werden ingesmolten.

Kleuring van de handcoupes.

Coupes gedurende ½—1 uur in water.

Gedurende 1 uur in thionine (0,1 % thionine in 5 % phenol-oplossing in gedestilleerd water).

10—15 minuten in water.

5 minuten in alcohol 100 %.

Differentieer in oranje G-oplossing (verzadigde oplossing van oranje G in alcohol 100 %).

Wasch uit in alcohol 100 %.

5 minuten in xylol.

Sluit in balsem in.

Kleuring van de microtoomcoupes.

10 minuten in xylol, 1 verandering.

10 minuten in alcohol 100 %, 1 verandering.

5 minuten in alcohol 96 %.

5 minuten in alcohol 60 %.

15 minuten in gedestilleerd water, 3 veranderingen.

1 uur in thionine oplossing (0,1 g thionine,

5 cc phenol, 100 cc gedestilleerd water).

5 minuten in gedestilleerd water.

5 minuten in alcohol 60 %.

5 minuten in alcohol 96 %.

5 minuten in alcohol 100 %.

Differentieer in een oragnje G-oplossing (verzadigde oplossing van oranje G in alcohol 100 %).

Wasch even uit in alcohol 100 %.

5 minuten in xylol-alcohol 100 % mengsel.

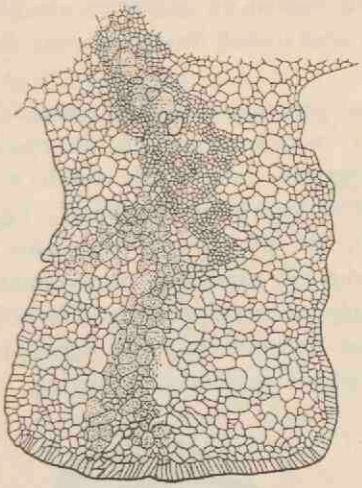
5 minuten in xylol.

Sluit in balsem in.

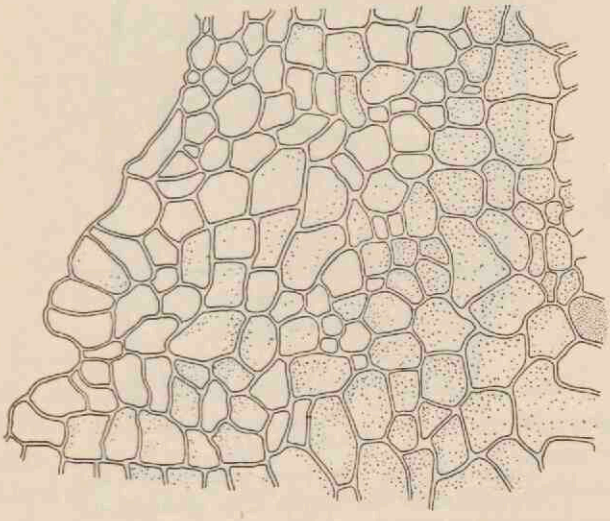
Na deze kleuring is de bacterie paarsblauw getint, de cellulosewanden geel en de kernen blauw.

Bij het bekijken van de coupes zag ik, dat de bacteriën in de aanhechtingsplaats van peul en zaad voorkomen. Zie teekening 2 en 3.

De verspreiding is, zooals volgens verscheidene coupes bleek, onregelmatig door de geheele aanhechtingsplaats (funiculus).



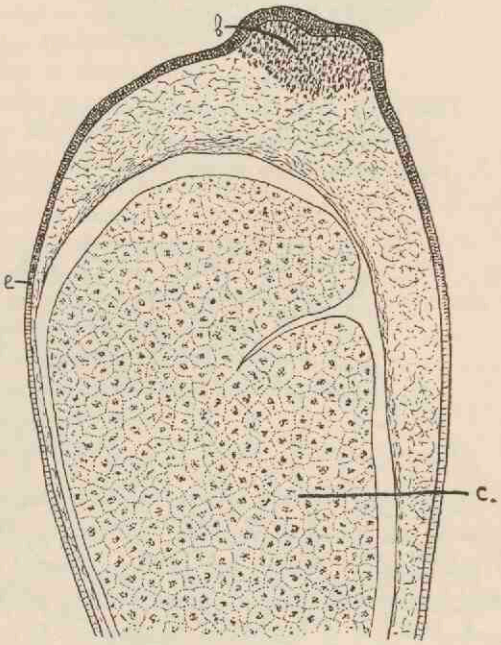
TEEKENING 2.
Doorsnede door de funiculus van een, met Pseudomonas medicaginis f. sp. phaseolicola Burk. geïnfecteerde peul.



TEEKENING 3.
Vergrooting van een gedeelte van teekening 2.

In het zaad komen de bacteriën slechts in de zaadhuid voor en niet in het inwendige van het zaad, bijv. de cotylen.

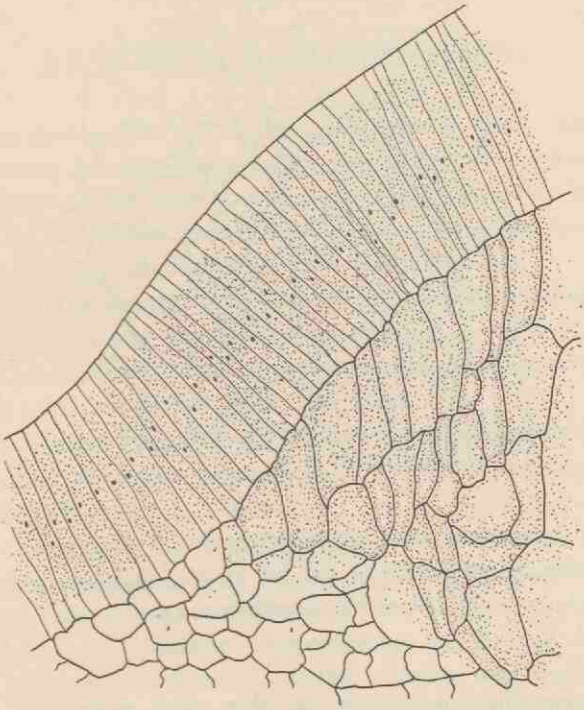
De cellagen van de zaadhuid, waarin hoofdzakelijk de bacteriën voorkomen, zijn de epidermis en de daaronder liggende cellen. De epidermislaag wordt gevormd door langgerekte, regelmatig liggende cellen. De cellen van het integument, die onder de epidermis liggen zijn over het algemeen onregelmatig van vorm en onregelmatig van verspreiding. De cellen van deze laag, die tegen de epidermis aan liggen, hebben echter ook een eenigszins regelmatige ligging.



TEEKENING 4.

Doorsnede door een zaad, geïnfecteerd met Pseudomonas medicaginis f. sp. phaseolicola Burk. b. bacteriën bij het hilum; e. epidermis; c. cotyl.

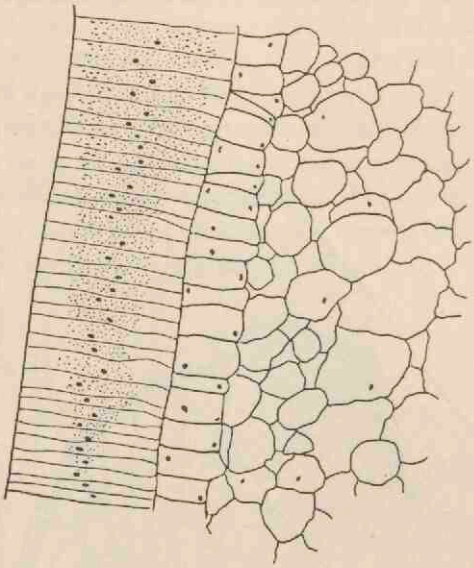
Bij het hilum, van waar af de verspreiding van de bacterie door de zaadhuid gaat, komen de meeste bacteriën voor. In teekening 4 heb ik het geval geteekend, waarbij de bacteriën in de onregelmatige cellaag



TEEKENING 5.
Vergrooting van het gedeelte bij b. in teekening 4. Bacteriën in epidermislaag en in daar onder liggende cellen.

alleen bij het hilum voorkomen. De bacteriën zijn echter in het zaadintegument in de geheele onregelmatige cellaag verspreid. Verder van het hilum verwijderd alleen in een zeer klein aantal. In de epidermis, waarin de bacteriën o.a. bij het hilum in grooten getale voorkomen, dringen de bacteriën verder door dan in

de onregelmatige cellen, Zooals in teekening 6 aangegeven is, ziet men dan de bacteriën nog wel in de epidermis, maar niet in de aangrenzende cellagen.



TEEKENING 6.
Vergrooting van het gedeelte bij e. in teekening 4.
Bacteriën in epidermislaag.

Door dit onderzoek is dus met zekerheid het voorkomen van de bacterie in het zaad aangetoond.

HOOFDSTUK VI.

BESTRIJDINGSMETHODEN.

Aangezien de vetvlekkenziekte in vele landen algemeen is, zijn daar reeds talrijke onderzoekingen verricht op het punt van de bestrijding ervan en heeft men de hieronder volgende methoden mogelijk bevonden, die ik volledigheidshalve vermelden wil.

Zooals ik in een vorig hoofdstuk vermelde, wordt de verspreiding van de bacterie van plant tot plant op het veld grootendeels door regen en wind veroorzaakt en verder hoofdzakelijk door het zaad.

De verspreiding op het veld kan tegengegaan worden:

1°. door de zieke planten te verwijderen en te verbranden.

Hieraan moet geregeld de hand gehouden worden; speciaal moet bij de kiemplanten nagekeken worden of er voorkomen, die een ziekte-symptoom, bijv. de typische chlorotische en bruine bladvlekken, vertoonen, welke planten terstond uitgetrokken moeten worden, opdat de schadelijke infectiebron zoo spoedig mogelijk uit de weg geruimd is.

2°. Door de planten te besproeien met koperhoudende middelen.

Böning vermeldt de goede resultaten, die het bespuiten met koperhoudende middelen geeft. Bespoten werd de zeer gevoelige variëteit Harzer Flageolet met vier verschillende koperhoudende middelen. Het zaad, dat uitgelegd werd op perceelen van 10 qm, was geoogst van aangetaste

velden en de uit dat zaad gekiemde planten vertoonden duidelijke bladvlekken. De bespuiting geschiedde eenige malen van het kiemingstijdstip af tot de bloei.

Bepaald werd het gewicht van de rijpe peulen, die 2 of 3 maal geoogst werden en op aantasting nagekeken. Hieronder volgen de resultaten door BÖNING in 1934 en 1935 verkregen.

RESULTATEN DER BESPUITING MET KOPERHOUDENDE MIDDELEN, DOOR BÖNING.

Behandeling			% ziekte aantasting der vruchten			
Middel	concentratie	Aantal malen	Oogst 1	Oogst 2	Oogst 3	Totaal
Onderzoek 1934						
Onbehandeld.....			2,3	17,8	geen oogst	8,4 ± 1,2
Bordeauxsche pap.	1 %	3 ×	1,2	0,9	3,6	1,4 ± 0,2
Koperkalk Wacker	2 %	3 ×	1,4	1,3	2,0	1,4 ± 0,1
Cusisa	st.	3 ×	1,5	0,7	3,1	1,4 ± 0,5
Koperstof Wacker	st.	2 ×	1,9	3,1	3,1	2,6 ± 1,1
Onderzoek 1935						
Onbehandeld.....			43	23		34 ± 9,5
Bordeauxsche pap.	1 %	2 ×	3	6		4 ± 3
Koperkalk Wacker	2 %	2 ×	5	6		5 ± 3
Cusisa	st.	2 ×	2	3		2,5 ± 0,8
Koperstof Wacker	st.	2 ×	9	10		9,5 ± 1

De goede invloed van de bespuiting is uit de tabellen duidelijk te zien.

In de onbehandelde perceelen werden de planten zwaar ziek en gingen ze voortijdig te gronde, terwijl in de behandelde perceelen de ziekte spoedig

tot staan werd gebracht en zich verder een normaal gewas ontwikkelde.

De oogst van de behandelde perceelen was in 1934 $^2/_3$ grooter dan die van de onbespoten en in 1935 $^1/_5$ grooter, terwijl de opbrengst aan gezonde peulen van het bespoten perceel in beide jaren $^4/_5$ grooter was dan van het onbehandelde.

De werkzaamheid van de verschillende koperhoudende middelen was, zooals blijkt, zoowat gelijk; tusschen stuif- en sproei-preparaten was geen verschil te zien.

Volgens Böning is 2 × bespuiten van de planten voldoende.

In de practijk geeft 1 bespuiting ook goede resultaten als men van tevoren de zeer zieke planten verwijderd en vernietigd heeft.

Daar het mogelijk is, dat de ziekteverwekker in den grond overwintert, is het

3°. zeer aan te raden wisselbouw toe te passen.

Ter verkrijging van een beter gewas en daardoor van een betere oogst is het altijd gewenscht vruchtwisseling te bedrijven, daar de in de grond achtergebleven parasietên geen nieuw voedingsobject zullen vinden en spoediger te gronde zullen gaan.

De methoden om te trachten de verspreiding door het zaad tegen te gaan zijn als volgt.

1°. Het winnen van zaad van volkomen gezonde planten zonder vlekken op bladeren, stengels of peulen.

2°. Desinfecteeren van het zaad.

Böning heeft o.a. de volgende methoden toegepast.

Ceresan nat $^1/_8$ %, gedurende $^1/_2$ uur.

De zaden ½ uur onderdompelen in $^1/_8$ % Ceresanoplossing in water. De vloeistof moet ongeveer een handbreed boven het zaad blijven staan.

Na ½ uur onderdompelen het zaad uit de vloeistof

nemen en daarna zoo dun mogelijk uitspreiden op een vooraf met de oplossing ontsmette plaats. Voor een goede vlugge droging het zaad eenige malen omscheppen.

Ceresan droog, 0,5 gr op 1 kg zaad.

In een droog ontsmettingsapparat wordt het te ontsmetten zaaizaad te zamen met de benoodigde hoeveelheid Ceresan (in dit geval 0,5 gr op 1 kg zaad) langzaam vermengd.

Hierdoor wordt iedere zaadkorrel bedekt met een stofvormig droog ontsmettingspoeder Ceresan. Het ontsmettingspreparaat mag voor niet meer dan $^2/_3$ gedeelte worden gevuld.

Alle ontsmettingspreparaten moeten bij het gebruik droog zijn.

Warm water van 45° C. gedurende 30 min.

Warm water van 50° C. gedurende 10 min.

Bij de warmwaterbehandeling, welke in een gewone thermosflesch kan uitgevoerd worden, ligt het zaad gedurende de aangegeven tijd in het water van de aangegeven temperatuur ondergedompeld.

Resultaten van Böning.

Methode.	Aantal zieken.
Onbehandeld	79 %
Ceresan nat	41 %
Ceresan droog	53 %
Water 45° C. 30 min.	36 %
Water 50° C. 10 min.	34 %

Een volledig succes kan dus met geen dezer methoden geboekt worden en men moet aan de beitsing op zich zelf geen al te groote waarde toekennen; wel echter in samenhang met het verwijderen van zieke kiemplanten en het bespuiten van de planten met koperhoudende middelen.

Veelbelovende resultaten bij voorloopige onderzoekingen met warmwater beitsing (52° C. gedurende 15—30 min.) verkregen Bremer en Hähne.

Tenslotte noem ik de methode, waarmee men het beste het optreden van de vetvlekkenziekte zou kunnen voorkomen, n.l. door het kweeken van ongevoelige boonenvariëteiten.

De moeilijkheid hierbij is, dat over het algemeen de sla- en snijboonen vrij gevoelig zijn (onderzoek van STAPP, ZALESKI, in Frankrijk).

Heeft men een niet- of zeer weinig gevoelige soort gevonden, dan is natuurlijk noodig, dat zij ook aan de eigenschappen, die door het publiek aan een consumptieboon gesteld worden, voldoet.

STAPP heeft in 1934 aangetoond, dat stamboonvariëteiten gevoeliger waren dan stokboonen en dat van ± 75 stamboon-variëteiten slechts ± 4 volkomen ongevoelig waren. In 1935 ging hij de gevoeligheid na van 250 stamboon- en 11 stokboonvariëteiten en kwam hij tot de conclusie, dat 36 stamboonen volkomen resistent, 32 bijna resistent, 96 sterk tot zeer sterk gevoelig en 86 matig tot meer gevoelig waren en dat 7 stokboonvariëteiten bijna of volkomen resistent waren.

Volgens ZALESKI waren van 140 boonenvariëteiten 3 immuun en 18 zeer resistent en de rest matig tot zeer gevoelig.

In Frankrijk waren van 234 boonenvariëteiten slechts een paar ongevoelig.

WIERINGA zag verschil in gevoeligheid tusschen witbloeiende en violetbloeiende variëteiten van de bruine boon, welke laatste volgens hem vatbaarder zijn; deze meening wordt echter niet gedeeld door STAPP, ZALESKI, BURKHOLDER.

In het algemeen zal het wenschelijk blijken, verschillende bestrijdingsmiddelen met elkaar te combineeren.

Resumeerend wat men moet doen om de ziekte zooveel mogelijk tegen te gaan hebben wij dus:

1. zaad van gezonde planten gebruiken.
2. zaad desinfecteeren (warm water van 50° C. gedurende 10 min.).
3. zoo mogelijk ongevoelige of zeer weinig gevoelige soorten aanplanten.
4. zieke planten verwijderen en verbranden en na de oogst het loof verbranden.
5. planten besproeien met koperhoudende middelen (Bordeauxsche pap).
6. vruchtwisseling toepassen.

SUMMARY.

During the last few years in the bean-fields (*Phaseolus vulgaris* L.) of the province of Noord Holland the crop was badly affected by a disease which a.o. was called the "stippelstreep", which might be translated by "streak-disease", of which the characteristic symptoms were brown lesions on the stems and yellowish-green discoloured leaves with a mosaic pattern.

The cause of the disease was unknown here; it proved to be the bacterium *Pseudomonas medicaginus f. sp. phaseolicola* BURK, the originator of the "vetvlekken-ziekte" (halo-blight).

So the "stippelstreep" (streak-disease) and the "vetvlekken-ziekte" (halo-blight) proved to be identical; this disease is at present the most prominent bean-disease in the province of Noord Holland.

Though the disease is well-known in U. S. A. and some European countries, it was nevertheless of importance to make a detailed determination of the vastly varying symptoms occurring in this disease for the bean-varieties grown in the Netherlands.

The characters of the bacteria, that have now been isolated in the Netherlands, were compared with descriptions of those in other countries.

In order to determine the course of life of the bacteria on the plant, our knowledge of which is as yet imperfect, different methods of inoculation were tried and also a study was made of the occurrence of the bacteria in the seed.

The symptoms of the disease, which I studied in Netherlands varieties were already noticeable in seedlings, as infected plants are conspicuous by their stunted form. The plumula is often brown and wilted, the first leaves show fantastic forms. On the stems contrasting little red spots show on the white neck of the root.

In older plants, especially in the month of July, the symptoms of disease are most noticeable. The bad growth of the plant and the ragged appearance of the crop are very striking. The plants that have remained small have strongly mottled leaves with a discoloured yellowish-green mosaic pattern, brown spots with yellow margin, watersoaked spots, the halo-spots or necrotic spots, that may have a puckered or crinkled surface. On the back of the leaves brown discoloured nerves occur; on the stems and petioles, the latter of which are sometimes brittle and very fragile, the brown, more or less longitudinal lesions, strike the eye. On the pods I found round, red-discoloured, water-soaked spots only with inoculated plants. Seed had no characteristic discolourations.

The bacteria, isolated by me, which inoculation-experiments had shown to be pathogenic and which caused the symptoms of disease described above, after determination-experiments proved to be indentical with *Phytomonas (Pseudomonas) medicaginis var. phaseolicola* BURK.

Only in some slight respects I noticed a difference: for instance in the number of cilia, where BURKHOLDER mentions one, while I could point out 1—3; with glucose- and saccharose- fermentation BURKHOLDER mentions a passing production of acid while with me the fluid in the fermentation-apparatus became more alkaline.

These differences are so small however that in

my opinion they are due to a difference in technique. However I do not consider the name of *Phytomonas medicoginis var. phaseolicola* quite the right one and it seems desirable to me to alter it a little and call the bacterium, according to the present use in Phytopathology, *Pseudomonas medicaginis f. sp. phaseolicola* BURK.

With the isolated bacteria inoculation-experiments were made in four different ways, chiefly on two varieties of beans, namely on „Verbeterde Vroege Veensche" and on „Gele Citroen". On seedlings (in pots), on seed (afterwards sown in open ground), on seed (sown in tubes), on soil in pots. In the case of the inoculations of seedlings, which were made in a greenhouse, I applied the method which STAPP indicates. The inoculations with both bean-varieties had positive results. The symptoms of disease of the two varieties did not fully agree in these experiments; it must however be taken into consideration, that owing to different years, the outward circumstances were not quite the same. The infection by two different strains of bacteria was not the same either. „Verbeterde Vroege Veensche" was more strongly affected by the strain of bacteria VI than by strain V while just the reverse was the case with „Gele Citroen".

For the inoculation of the seed, that was sown in open ground, „Verbeterde Vroege Veensche" „Gele Citroen" and „Fijne Trosprincesse" were used.

With all three varieties the inoculations had positive results; in „Gele Citroen", the infection was strong, in „Verbeterde Vroege Veensche" and Fijne Trosprincesse" a little weaker however.

For the inoculation of seed in culture tubes „Verbeterde Vroege Veensche" as well as „Gele Citroen" were equally strong affected by the bacteria.

In the first series (tubes with potato-agar which were inoculated with the bacteria 8 days before the seed was put in) the infection was strongest, in the second (tubes with washed-out agar on which bacteria and seed were put simultaneously) the infection was less strong and in the third series (tubes with Knop-agar on which bacteria and seed were put simultaneously) even less.

In the case of inoculation of soil in pots, it did not make any difference with „Gele Citroen" whether sterilised or non-sterilised humus was used.

There was neither any difference to be noticed with „Gele Citroen" after infection with a bacterial suspension in water or a bacterial culture in extract of French beans.

However the infection of the plants was more virulent when the seeds were laid out directly after the infection and not a few days hence.

„Verbeterde Vroege Veensche" was much less affected than „Gele Citroen". When infected, sterilised soil was used, the plants were slightly affected, while in infected, non-sterilised soil, the effect was even less.

The seed which is largely the distributor of the bacteria, is infected by the bacteria via the suture with the pod.

In the seed the bacteria only occur in the seed-coat; it generally penetrates however several layers of this integument and is not restricted to the intercellular spaces.

LITERATUURLIJST.

ATANASOFF, D., DODOFF, D. N., KOVACEVSKI, I., MARTINOFF, S., TRIFONOVA, V., CHRISTOFF, A., Parasitic fungi new to Bulgaria.
1932. Yearbook University of Sofia. Fac. of Agric. 10. ref: Review Appl. Mycol. XI 1932.

BARRUS, MORTIER, F., Bean Anthracnose.
1921. Memoir 42. Cornell University.

BEHRENS, W., Tabellen zum Gebrauch bei Mikroskopischen Arbeiten.
1908. Vierte Auflage. Berlin.

BERGEY, D. H., Manual of Determinative Bacteriology.
1934. Baltimore.

BERRIDGE, E. M., The influence of hydrogen-ion concentration on the growth of certain bacterial plant parasites and saprophytes.
1924. Ann. of Appl. Biology 11.

BÖNING, K., Die Fettfleckenkrankheit der Bohnen.
1934. Flugblätter für Pflanzenbau und Pflanzenschutz. 64.

BÖNING, K., Versuche zur Bekämpfung der Fettfleckenkrankheit der Bohnen.
1935—1936. Praktische Blätter für Pflanzenbau und Pflanzenschutz. 13. Hft 9/10.

BREMER, H., Die Fettfleckenkrankheit der Bohnen.
1930. Obst- und Gemüsebau. 76. p. 10. ref: Rev. Appl. Myc. X 1931.

BREMER, H. und HÄHNE, H., Heisswasserbeize zur Bekämpfung der Fettfleckenkrankheit der Bohnen.
1932. Nachrichtenblatt Deutsch. Pflanzenschutzd. 12. p. 5. ref.: Rev. Appl. Myc. XI. 1932.

BRINKMAN, A., De roodneuzenziekte van *Phaseolus vulgaris* L., veroorzaakt door *Pleospora herbarum* (PERS.) RHB.
1931. Diss. Utrecht.

BRIQUET, J., International Rules of Botanical Nomenclature.
1935. Adopted by the international Botanical Congresses of Vienna, 1905 and Brussels, 1910. Revised by the intern. Bot. Congress of Cambridge 1930.

BURKHOLDER, W. H., The dry root-rot of the bean.
1919. Memoir 26. Cornell University.

BURKHOLDER, W. H., The bacterial blight of the bean, a systemic disease.
1921. Phytopath. 11. Vol. 6. p. 1.

BURKHOLDER, W. H. and CROSBY, C. R., Diseases, and insect and other pests of the field bean in New-York.
1923. Extension Bulletin 58. Cornell University.

BURKHOLDER, W. H., A new bacterial disease of the bean.
1926. Phytopathology. 16. p. 915.

BURKHOLDER, W. H., The genus *Phytomonas*.
1930. Phytopathology. 20. p. 1.

BURKHOLDER, W. H., The bacterial diseases of the bean.
1930. Memoir 127. Cornell University.

BURKHOLDER, W. H., Carbohydrate fermentation by certain closely related species in the genus *Phytomonas*.
1932. Phytopath. 22.

BURKHOLDER, W. H. and ZALESKI, K., Varietal susceptibility of beans to an American and an European strain of *Phytomonas medicaginis var. phaseolicola*, and a comparision of the strains in culture.
1932. Phytopath. 22. p. 85.

BURRI, R., Die Bakteriënvegetation auf der Oberfläche normal entwickelter Pflanzen.
1903. Centralblatt f. B., P. und I. Abt. 2. 10.

CHRISTOW, A., Einige Versuche über die Bakteriënkrankheit bei Bohnen.
1934. Phytop. Zeitschrift 7.

CLAYTON, E. E., Spraying experiments with bush lima beans.
1928. Bulletin 558. New York State Agr. Exp. Stat. Geneva.

CLARA, F. M., A comparative study of the green-fluorescent bacterial plant pathogens.
1934. Memoir 159. Cornell University.

DEFOREST HEALD, F., Manual of Plant Diseases. New-York. 1926.

DOWSON, W. J., Notes on some bacterial plant diseases in Tasmania.
1932. Journ. Pomol. and Hort. Science 10. p. 4. ref: Rev. Appl. Mycol. XII. 1933.

DOYER, L. C., De gezondheidstoestand der zaaizaden.
1923. Verslagen v. landbouwkundige onderzoekingen d. Rijkslandbouwproefstations 28.

DOYER, L. C., Over het ontsmetten van boonen.
1924. De Veldbode. 1102.

DOYER, L. C., Infecties van zaaizaden in verschillende jaren.
1925. Verslagen v. landbouwkundige onderzoekingen der Rijkslandbouwproefstations. 30.

DOYER, L. C., Iets over de gezondheidstoestand der zaaizaden in verschillende jaren.
1930. Tijdschr. over Plantenziekten 36.

DÜGGELI, M., Die Bakteriënflora gesunder Samen und daraus gezogener Keimpflänzchen.
1904. Centralblatt f. B., P. und I. Abt. 2. Bd. 12. en 13.

DWIGHT, BUCHANAN., A bacterial disease of beans transmitted by *Heliothrips femoralis* RENT.
1932. Journ. Econ. Ent. 25. p. 1. ref: Biol. Abstr. 8. 1934.

ELLIOTT, CH., Manual of Bacterial Plant Pathogens.
1930. London.

FAJARDO, F. G., Studies on the mosaic disease of the bean (*Phaseolus vulgaris* L.).
1930. Phytopath. 20.

FRANCK, W. J., Het kiemvermogen en de gezondheidstoestand van erwten en boonen.
1926. De Veldbode. 1206.

FRANCK, W. J., Het niet opkomen van zaaiboonen.
1932. De Veldbode. 1513.

FRANCK, W. J., Moderne wijze van kiemkrachtsbeoordeeling en de invloed daarvan op de waarde van het onderzoek voor de praktijk.
1932. Verslagen van landbouwkundige onderzoekingen. Dep. van Landbouw. 38. D. Rijksproefst. v. Zaadcontrole. Wageningen.

FRUWIRTH, C., Handbuch des Hülsenfruchterbaues. Berlin. 1921.

GASZNER, G., Die Feststellung der Schädigung des Saatgutes durch Beizmittel.
1926. Zeitschr. f. Pflanzenkr. und Pflanzenschutz. Bd. 36. p. 25.

GEORGIA, F. R. and POE, C. F., Study of bacterial fluorescense in various media. I. Inorganic substances necessary for bacterial fluorescense.
1931. Journ. of Bacteriology. Vol. 22.

GILTNER, W., Laboratory Manual in General Microbiology. 1926.

GLOYER, W. O., The effect of late planting on the bacterial blight of beans.
1924. Phytopath. 14.

VAN HALL, C. J. J., Bijdragen tot de kennis der bakterieele Plantenziekten. Amsterdam.
1902. Diss.

HEDGES, FL., Bacterial halo-spot of kudzu.
1927. Phytopath. 17.

HEDGES, FL., Bacterial halo-spot of kudzu caused by *Bacterium puerariae* HEDGES.
1928. Journ. of Agr. Res. 36.

HEDGES, FL., Bacterial diseases of beans in some western commercial seed-growing and canning areas and southern trucking sections in 1927—1928.
1928. Plant Disease Reporter 12. p. 11. ref: Rev. Appl. Myc. VIII. 1929.

HEDGES, FL., The relationship of *Bact. med. var. phas.* and *Bact. puerariae.*
1930. Phytopath. 20.

HIGGINS, B. B., Halo-spot of beans and Kudzu.
1930. Bulletin 161. Georgia Exper. Stat. ref: Rev. Appl. Myc. X, 1931.

'S JACOB, J. C., Anorganische beschadigingen bij *Pisum sativum* L. en *Phaseolus vulgaris* L.
1927. Diss. Utrecht.

JOHNSON, J., The influence of heated soils on seed germination and plant growth.
1919. Soil Science. 7.

KERLING, L. C. P., De anatomische bouw van bladvlekken.
1928. Diss. Utrecht.

KINGMA BOLTJES, T. Y., Onderzoekingen over nitrificeerende bacteriën.
1934. Diss. Delft.

KOTTE, W., Zur Kenntnis der „Fettfleckenkrankheit" der Bohne.
1931. Zeitschr. für Pflanzenkr. und Pflanzensch. 41.

LABROUSSE, F., Observations sur quelques maladies des plantes maraîchères.
1931. Rev. Path. Vég. et Ent. Agr. 18. p. 8—9. ref: Rev. Appl. Myc. XI. 1931.

LACEY, M. S., Studies in bacteriosis. XXI. An investigation of marsh spot of peas.
1934. Annals of Appl. Biology. 21. 4.

LEHMANN und NEUMANN., Bakteriologische Diagnostik. Aufl. 7.
1927.

LEVINE, M. and SCHOENLEIN, H. W., A compilation of Culture Media for the cultivation of microorganisms. Baltimore.
1930.

LÖHNIS, F., Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie.
1910.

MAC DONALD, J.,
1933. Annual Report of the Senior Mycologist for 1932. Ann. Rep. Dept. of Agric. Kenya for the year 1932. ref: Rev. Appl. Myc. XIII. 1934.

MAC MILLAN, H. G., Sunscald of beans.
1918. Journ. Agr. Res. 13.

MANDELSON, L. F., Haloblight, a bacterial disease of beans.
1932. Queensland Agr. Journ. 37. ref: Biol. Abstracts 7. 1933.

Mededeelingen van de Rijks Hoogere Land-, Tuin-, en Boschbouwschool.
1912. Deel V. Instituut voor Phytopath. te Wageningen. Verslag over 1909 en 1910.
1913. Deel VI. Instituut voor Phytopath. te Wageningen. Verslag over 1911.
1914. Deel VII. Instituut voor Phytopath. te Wageningen. Verslag over 1912.

MERKEL, L., Beiträge zur Kenntnis der Mosaïkkrankheit der Familie der Papilionaceen.
1929. Zeitschr. für Pflanzenkrank. 39. Hft. 8/9.

MEURS, A., Wortelrot, veroorzaakt door schimmels uit de geslachten *Pythium* PRINGSHEIM en *Aphanomyces* DE BARY.
1928. Diss. Utrecht.

MUNCIE, J. H., A girdling of bean stems caused by *Bact. phaseoli.*
1917. Science 46.

MUNCIE, J. H., Experiments on the control of bean anthracnose and bean blight.
1919. Technical Bulletin 38. Exp. Stat. State board of agr. Michigan.

OGILVIE, L. and MULLIGAN, B. O.,
1931. Progress rep. on vegetable diseases. Ann. Rep. Agr. and Hort. Res. Stat. Long Ashton. Bristol for 1930. Ref: Rev. Appl. Mycol. XI. 1932.

OGILVIE, L. and MULLIGAN, B. O.,
1932. Progress report on vegetable diseases. Ann. Rep. Agr. and Hort. Stat. Long Ashton. Bristol for 1931. ref: Rev. Appl. Myc. XI. 1932.
1933. Progress report on vegetable diseases. Ann. Rep. Agr. and Hort. Stat. Long Ashton. Bristol for 1932—1933. ref.: Rev. Appl. Myc. XIII. 1934.

ORTON, C. R., Seed-borne parasites, a general consideration of the problem.
1924. Science 59.

ORTON, C. R. and HENRY, W. D., An internal necrosis of bean seeds.
1935. Phytopath. 25. 7.

PAINE, S. G., An epitome of bacterial diseases of plants in Gr. Britain and Ireland.
1918—1919. Annals of Appl. Biology. 5.

PIERCE, W. H., Viroses of the bean.
1934. Phytopath. 24.

PITTMAN, H. A., Bacterial blight of beans. Disease-free seed and disease-free soil essential for control.
1932. Journ. Dep. Agr. Western Australia. 2nd. Ser. 9. ref: Rev. Appl. Myc. XI. 1932.

Plantesygdommer i Danmark 1932.
1933. Oversigt, samlet vel Statensplantepatologiske Forsøg. Tidskr. for Planteavl. 39. 3. ref: Rev. Appl. Myc. XIII 1934.

VAN POETEREN, N., Ziekten van groentengewassen.
1918.

RAHN, O., Statistische Studiën über die Systeme der Bakterien.
1916. Centralblatt f. B. P. und I. Abt. 2. Bd. 46.

Rapports sommaires sur les travaux accomplis dans les laboratoires en 1932.
1933. Ann. des Epiphyties 19. ref: Rev. Appl. Myc. XIII. 1934.

RANDS, R. D. and BROTHERTON Jr., W., Bean varietal tests for disease resistance.
1925. Journ. of Agr. Res. 31.

RAWLINS, T. E., Phytopathological and Botanical Research Methodes. 1933. London.

Records. New or interesting phytopath. records for the year 1930.
1931. Internat. Bull. of Plant Protect. 5. 2. England and Wales. ref: Rev. Appl. Myc. X. 1931.

REDDICK, D. and STEWART, V. B., Bean mosaic.
1917. Phytopath. 7.

REDDICK, D. and STEWART, V. B., Transmission of the virus of bean mosaic in seed and observations on thermal death-point of seed and virus.
1919. Phytopath. 9.

REID, W. D., A bacterial wilt disease of beans. Occurrence in Marlborough and measures for control.
1931. New Zealand Journ. of Agr. 43. 6. ref: Rev. Appl. Myc. XI. 1932.

REINDERS, G., Handboek voor den Nederlandschen Landbouw en de Veeteelt. Groningen.
1901.

Report. Forty-second Ann. Rept. Georgia Agric. Exper. Stat. for the year 1929—1930. ref: Rev. Appl. Myc. IX. 1930.
1930.

RITZEMA BOS, J., Phytopath. Lab. W. Commelin Scholten. Verslag over onderzoekingen gedaan in-, en over inlichtingen gegeven vanwege bovengenoemd Lab. in het jaar 1901.
1902. Tijdschr. over Plantenziekten. 8. Phytopath. Lab. W. C. Scholten. Verslag over 1902.
1903. Tijdschr. over Plantenz. 9. Phytopath. Lab. W. C. Scholten. Verslag over 1903.
1904. Tijdschr. over Plantenz. 10.

ROMEIS, B., Taschenbuch der Mikroskopischen Technik.
1928.

ROODENBURG, J. W. M., Zuurstofgebrek in den grond in verband met wortelrot.
1927. Diss. Utrecht.

SACKETT, W. G., A bacterial disease of alfalfa.
1910. Bulletin 158. Colorado Agr. Exp. Stat.

SAFFORD, C. E. and FLEISCHER, M.S.,
1931. Stain Technology. Vol. 7. 2. p. 43.

SAMUEL, G., Summary of plant disease records in South Australia.
1931. for the two years ending June 30th. 1930. Journ. Dept. Agric. South Australia 34. ref: Rev. Appl. Mycol. X. 1931.
1932. Journ. Dept. Agric. South Australia. 36. ref: Rev. Appl. Mycol. XII. 1933.

SCHENK, P. J., Roest- en vlekziekte van snij- en princesseboonen
1917. Tijdschr. over Plantenziekten. 23.

SLOEP, A. C., Onderzoekingen over pertinestoffen en hare enzymatische ontleding.
1928. Diss. Delft.

SMITH, E. F., Bacteria in Relation to Plant Diseases. Washington.
1905.

SMITH, E. F., An introduction to Bacterial Diseases of Plants
1920. Philadelphia and London.

SMITH, K. M., Recent advances in the study of plant viruses.
1933.

SMITH, O., Some changes in the relations of plants and soil caused by sterilisation of soil with steam.
1925. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 22. ref: Biol. Abstr. 1. 1. 1. 1926.

Society of American Bacteriologists. Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria.

STAPP, G., *Schizomycetes.*
1928. Handbuch der Pflanzenkrankheiten van Sorauer. Bd. 2. Deel 1. 5de druk.

STAPP, C. und KOTTE, W., Die Fettfleckenkrankheit der Bohne, eine für Deutschland neue, durch Bakteriën hervorgerufene Pflanzenkrankheit.
1929. Nachrichtenblatt für den Deutschen Pflanzenschutzdienst. 5.

STAPP, C., Verfahren zur Prüfung von Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) auf Resistenz gegen *Pseudomonas med. var. phas.* BURK., den Erreger der Fettfleckenkrankheit.
1933. Angewandte Botanik 15. Hft. 3.

STAPP, C., Prüfungen von Busch- und Stangenbohnen auf Widerstandsfähigkeit gegen den bakteriellen Erreger der Fettfleckenkrankheit.
1934. Angewandte Botanik 16. Hft. 2.

STAPP, C., Fortgeführhrte Untersuchungen über die Resistenzverschiedenheiten von Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) gegen *Pseudomonas med. var. phas.* BURK.
1935. Angewandte Botanik 17. Hft. 1.

STAPP, C., Contemporary understanding of bacterial plant diseases and their causal organisms.
1935. Botanical Review. 1. p. 405.

STAPP, C., und HÄHNE, H., Zur Frage der Resistenz von Buschbohnen sorten gegen den Erreger der Fettfleckenkrankheit, *Pseudomonao med. var. phas.* BURK.
1936. Angewandte Botanik 18. Hft. 3.

STIELTJES, D., Ziekten en beschadigingen der cultuurgewassen. I.
1935. Landbouwgewassen. Serie B. No. 16. Leiddraad voor het land- en tuinbouwonderwijs.

STOUGHTON, R. H., Thionin and orange G for the differential staining of bacteria and fungi in plant tissues.
1930. Ann. of Appl. Biology 17.

TIDDENS, B. A., Wortelrot van *Primula obconica,* veroorzaakt door *Thielaviopsis basicola* (BERK. et BR.) FERRARIS.
1933. Diss. Utrecht.

TRAPPMANN, W., Schädlings Bekämpfung. Chemie und Technik der Gegenwart. Leipzig.
1927.

Verslagen en Mededeelingen van den Plantenziektenkundigen Dienst te Wageningen.
1920. No. 12. Verslag over 1919.
1922. No. 27. Verslag over 1920 en 1921.
1923. No. 31. Verslag over 1922.
1924. No. 34. Verslag over 1923.
1925. No. 41. Verslag over 1924.
1926. No. 44. Verslag over 1925.
1928. No. 51. Verslag over 1926.
1929. No. 55. Verslag over 1927.
1929. No. 58. Verslag over 1928.
1930. No. 62. Verslag over 1929.
1931. No. 64. Verslag over 1930.
1932. No. 66. Verslag over 1931.
1935. No. 11. Plantenziekten, waarmede rekening moet gehouden worden bij de keuring te velde van landbouwgewassen.
1935. No. 80. Verslag over 1934.

Verslag en Mededeelingen van de Directie van den Landbouw.
1935. No. 5. Verslag van het Rijksproefstation voor Zaadcontrole te Wageningen. (1 Juni '34—1 Juni '35).

WEIMER, J. L. and HARTER, L. L., Root not of the bean in California caused by *Fusarium martii phaseoli* BURK. and *Fusarium aduncisporum N. Sp.*
1926. Journ. Agric. Res. 32.

WENT, J. C., *Fusarium* aantastingen van erwten.
1934. Diss. Utrecht.

WIERINGA, K. T., De vetvlekkenziekte, een voor Nederland nieuwe ziekte bij bruine boonenn (*Phaseolus vulgaris*).
1930. Tijdschr. over Plantenziekten 36.

WITTMACK, L., Landwirtschaftliche Samenkunde. Berlin.
1922.

VON WOLZOGEN KÜHR, C. A. H., Onderzoekingen aangaande de mikroflora aanwezig in normaal en serehziek suikerriet.
1923. Diss. Delft.

ZALESKI K., Relative resistance to halo-blight of bean varieites grown in Poland.
1933. Polish Agric. and Forest Ann. Poznan 30. ref: Rev. Appl. Mycol. XII. 1933.

ZAUMEYER, W. J., Seed infection by *Bacterium phaseoli*.
1929. Phytopath. 19.

ZAUMEYER, W. J., Comparative histology of three bacterial blights of beans in the seedling stage.
1931. Phytopath. 21.

ZAUMEYER, W. J., Bean diseases in western United States in 1930.
1930. Plant Disease Reporter 14. ref: Rev. Appl. Myc. X. 1931.

ZAUMYER, W. J. and WADE, B. L., The relationship of certain legume mosaics to bean.
1935. Journ. Agric. Res. 51.

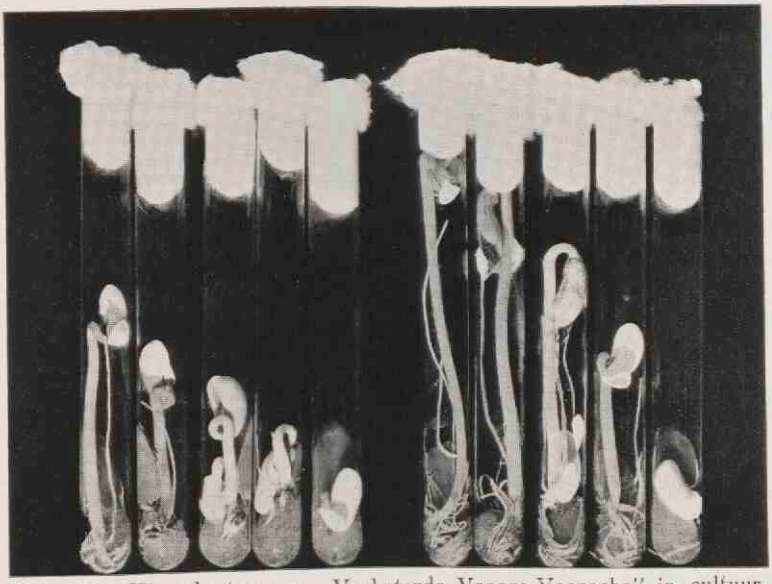


Foto A1: Kiemplanten van „Verbeterde Vroege Veensche" in cultuurbuizen op snijboonenagar. Links: Geïnoculeerd; vertraagde groei; korte, stompe, bruinverkleurde wortels. Rechts: Niet geïnoculeerd; lang uitgegroeide wortels.

Foto A2: Aangetaste kiemplanten van „Dubbele Slaboonen Zonder Draad". Roode of roodbruine vlekken op de stengelbasis; slecht ontwikkelde pluim en bruine vlekken op de bladeren.

Foto B1: Planten van „Gele Citroen". Links: Contrôle, niet geïnoculeerd; zonder vlekken. Midden en rechts: Geïnoculeerd volgens methode van Stapp. Midden: Met bacteriestam VI; bladeren met donkerbruin, verdorde vlekken, die eerst waterdoordrenkt getint waren. Rechts: Met bacteriestam V; verlepte bladeren.

Foto B2: Planten van „Verbeterde Vroege Veensche". Links: Contrôle, niet geïnoculeerd; zonder vlekken. Rechts: Geïnoculeerd volgens methode Stapp, met chlorotische bladeren.

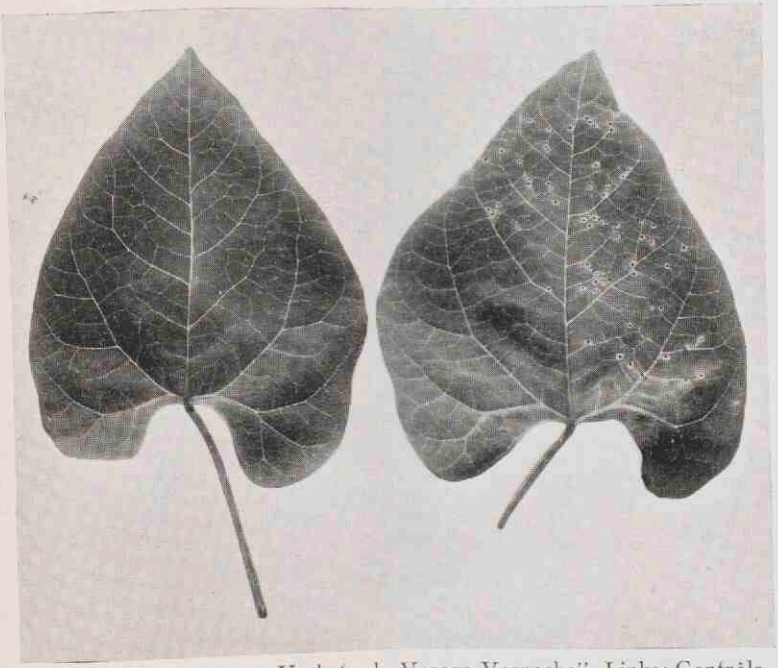


Foto C1: Bladeren van „Verbeterde Vroege Veensche". Links: Contrôle, niet geïnoculeerd, zonder vlekken. Rechts: Geïnoculeerd. Bruine vlekken met lichte, gele rand (halo-vlekken).

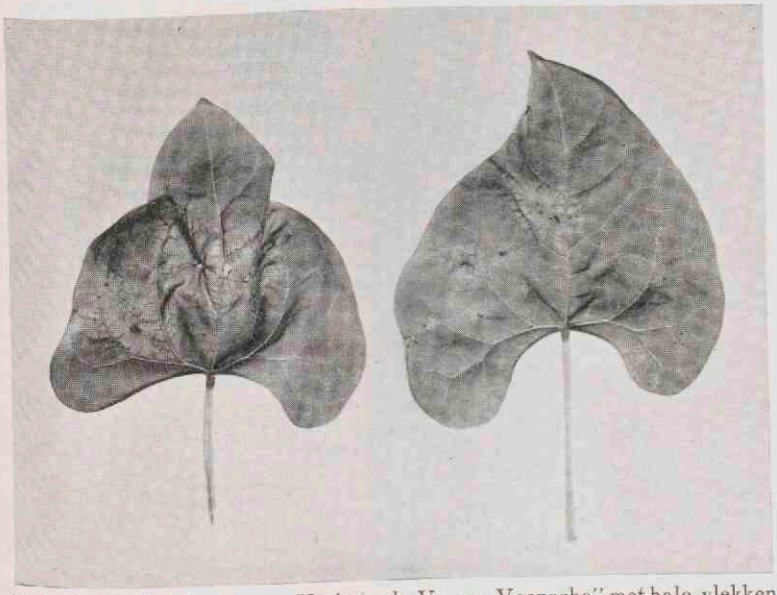


Foto C2(c): Bladeren van „Verbeterde Vroege Veensche" met halo-vlekken en chlorotische vlekken.

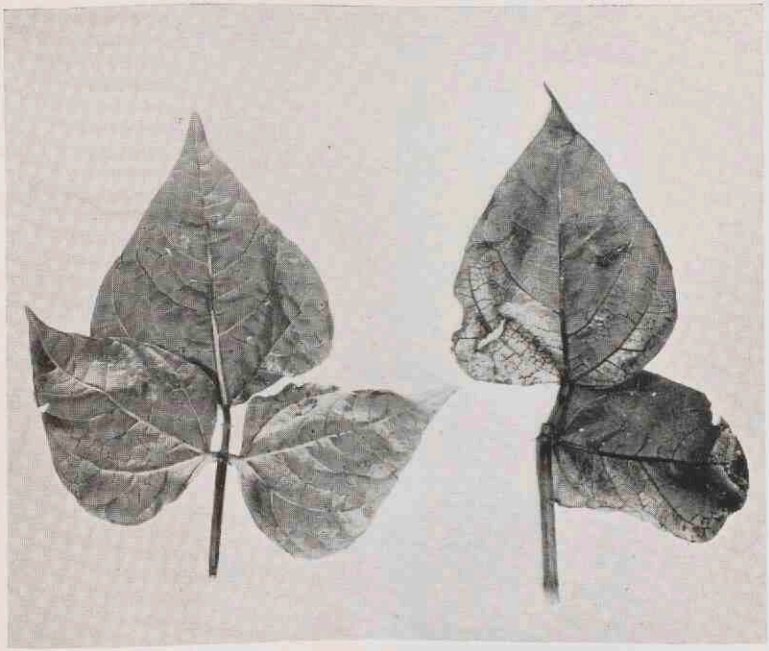


Foto D1: Bladeren van „Dubbele Slaboonen Zonder Draad" met roodverkleurde nerven aan de achterzijde.

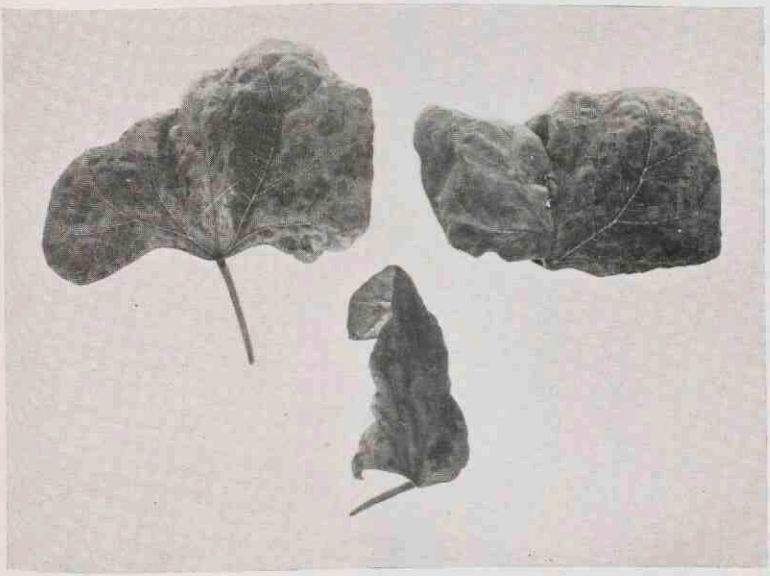


Foto D2: Bladeren van „Verbeterde Vroege Veensche", aangetast ouder stadium; gevlekt; met een bobbelig oppervlak.

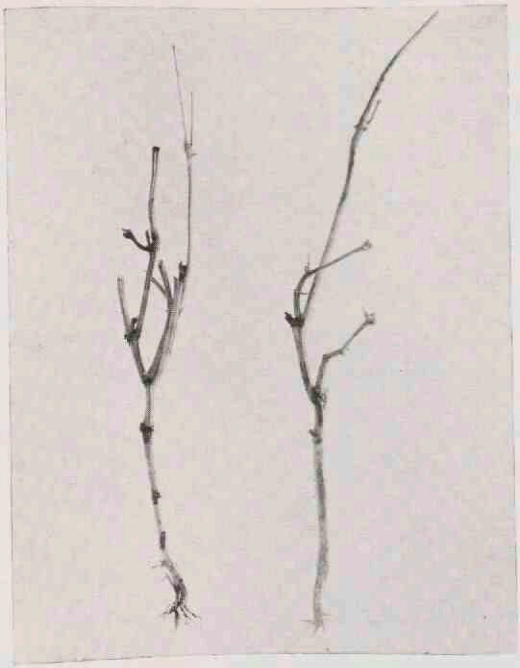


Foto E1: Stengels van „Gele Citroen" met roodbruine tot donkerbruine streepvlekken.

Foto E2: Peulen van „Gele Citroen" met waterdoordrenkte, roodverkleurde vlekken (vetvlekken).

STELLINGEN.

I.

De methode van Gg. Schweitzer tot sterilisatie van grond is niet bruikbaar.

(Planta 16, 1932.)

II.

De opvatting van Grégoire, dat de deelen van de bloem niet homoloog zijn met bladeren, is onjuist.

III.

Mycorrhiza schimmels zijn parasieten, die in hun ontwikkeling onderdrukt worden door de reactie van de cellen der voedsterplanten.

IV.

E. Schlottke heeft niet bewezen, dat de proteïnase van *Limulus* een trypsine-achtig enzym is.

(Ztschrft. f. Verg. Phys. 22, 1935.)

V.

De meening van N. VITA, dat kiemende Leguminosenzaden elementaire stikstof kunnen binden, is onjuist.

(Biochem. Ztschr. 245, 252 en 255, 1932.)

VI.

Bij physiologische onderzoekingen met Leguminosenplanten is het gewenscht de grond- en watercultures te besmetten met *Rhizobium*.