

INSTITUUT VOOR PHYTOPATHOLOGIE.

VREEMDE LICHAAMPJES IN ZIEKE
SPINAZIEWORTELS

DOOR

T. A. C. SCHOEVERS,

PHYTOPATHOLOOG AAN HET INSTITUUT VOOR PHYTOPATHOLOGIE.

(MET EÉN PLAAT).

Ongeveer half Maart ontving het Instituut voor Phytopathologie uit Warfum zieke spinazieplantjes ter onderzoek, waarvan de wortels sterk deden denken aan die van bietenplantjes, welke aan z.g. „wortelbrand” leden. De penwortel was voor een grooter of kleiner deel van zijn lengte duidelijk ingeschrompeld, dus veel dunner dan het normale gedeelte, en daarbij bruin tot zwart van kleur; bij sommige wortels liep a. h. w. een zwarte streng in de lengte door het midden, terwijl de omringende cellen een glazig uiterlijk hadden en eenigszins week waren geworden; de afscheiding tusschen het zieke en het gezonde gedeelte was meestal vrij scherp, en soms, behalve door het plotselinge verschil in dikte, gekenteekend door een bruinen ring. Zijwortels ontbraken aan het zieke gedeelte of vertoonden, indien zij aanwezig waren, dezelfde verschijnselen als de hoofdwortel. Van vele wortels was het ondereind ziek, bij andere bevond zich een ziek stuk van één of enkele centimeters lengte meer in het midden, zoodat de wortelspits nog gezond was. Enkele plantjes toonden neiging tot herstel door het vormen van nieuwe zijwortels; geschiedde dit aan het gedeelte boven de zieke zône, dan bestond kans op doorgroeien van het plantje; bij sommige exemplaren echter waren wel nieuwe wortels aanwezig, doch nabij den wortelspits, zoodat het door de nieuwe wortels opgenomen water met daarin opgeloste voedingsstoffen het zieke gedeelte

2052075

zou moeten passeeren, waar de passage zool niet geheel onmogelijk, dan toch ernstig belemmerd was, tengevolge waarvan zulke plantjes moesten blijven kwijnen. De planten, die het niet tot het maken van nieuwe wortels konden brengen, staakten hunnen groei natuurlijk geheel. De ziekte kwam te Warfum voor in een druivenkas, waarin ieder jaar spinazie werd geteeld. De teelt gelukte vroeger zeer goed, maar in de laatste jaren wilde de spinazie pleksge wijze niet best meer groeien; de plantjes waren niet gezond groen, maar eenigszins geel van kleur, terwijl de zaadlobben veelal wat gekromd waren; de meeste planten werden slechts een paar centimeters hoog en stierven dan af.

Ik verwachtte stellig, bij mikroskopisch onderzoek in de zieke wortels zwamdraden te zullen vinden, b.v. van de bekende parasiet *Pythium de Baryanum* Hesse, die zoo vaak onder allerlei jonge plantjes groote verwoestingen aanricht. In bijna geen enkel der plantjes, die ik onderzocht, vond ik evenwel mycelium; in elke coupe, zonder uitzondering, trof ik echter in groote hoeveelheid v.n.l. in de parenchymcellen, lichaampjes aan, die ik niet kon thuis brengen, ofschoon het niet de eerste maal was, dat ik ze zag. Ik had n.l. in den zomer van 1917 in wortels van boonen uit Spakenburg, die eveneens onder bruin wording en verschrompeling waren afgestorven, precies dezelfde voorwerpjes gevonden. Sommige cellen waren er letterlijk mee volgestopt, in andere bevonden de lichaampjes zich in onregelmatig geordende rijen langs de wanden. (Zie fig. 1, pl. X). Overal waar het weefsel ziek was, waren zij aanwezig; op de grens van het zieke en het gezonde deel waren in de, blijkens de bruinachtige kleur van den wand reeds zieke cellen, enkele weinige exemplaren te vinden, in de gezonde, daar vlak aangrenzende cellen evenwel ontbraken zij ten eenenmale. Ook in de vaatbundels, die gewoonlijk donkerder waren gekleurd dan het omringende parenchym, vond ik ze gewoonlijk niet, ook niet, als die aangrenzende endodermis- en parenchymcellen stampvol er mede zaten; er waren echter enkele wortels, waarvan ook de vaatbundels een buitengewoon groot aantal dier lichaampjes herbergden. De wanden der cellen schenen steeds volkomen intact; eerst later, als zij afgestorven waren, trad natuurlijk rotting in. Ik heb minstens 40 of 50 worteltjes onderzocht en van

elk daarvan meerdere dwars - en lengtedoorsneden gemaakt; mochten al eens in enkele coupes de bewuste voorwerpjes ontbreken. dan trof ik ze bij snijden op een andere plaats toch telkens weer aan. In praeparaten, waarin zich wortelharen bevonden, zag ik in zeer enkele gevallen deze wortelharen over hunne geheele lengte gevuld met de vreemde lichaampjes, die er juist in pasten en dus alle vlak achter elkaar lagen. De mikrofotografie, gereproduceerd op pl. X, fig. 1, laat eenige van deze wortelharen zien.

De vorm der lichaampjes (zie pl. X, fig. 4) was onregelmatig ovaal, min of meer spoelvormig, dikwijls met een platten kant en een iets toegespitsen punt; de gemiddelde lengte bedroeg 12—15 mikron, de dikte 5 mikron, met geringe afwijkingen. De kleur scheen soms iets naar het zeer licht blauwe te zweemen; dikwijls waren de lichaampjes voorzien van talrijke, grootere of kleinere sterk lichtbrekende korreltjes of bolletjes; soms ook was de inhoud van meer granuleuzen aard; bij reactie met osmiumzuur werden deze lichtbrekende bolletjes zwart, zoodat het vetdroppeltjes schenen te zijn. Bij enkele individuen meende ik terzijde van het lichaam een soort van instulping of insnijding te zien. Een kern kon ik niet waarnemen; het optreden van plasmolyse heb ik bij meerdere exemplaren kunnen vaststellen.

Werd mijn belangstelling reeds sterk gewekt door deze mij onbekende voorwerpen, die ik wegens hun geregelde aanwezigheid in de zieke wortels, in verband met de behoudens enkele uitzonderingen voortdurende afwezigheid van schimmels en van bacteriën in eenigzins belangrijk aantal, wel er van verdenken moest iets met de ziekte te maken te hebben, deze belangstelling steeg ten top, toen ik enkele individuën zich zeer duidelijk zag bewegen! Ofschoon ik dit slechts hoogst zelden waarnam, is hier toch geen misverstand of gezichtsbedrog mogelijk; bijna alle heeren aan het Instituut, en ook nog enkele anderen, die toevallig op mijn laboratorium kwamen, terwijl ik met deze praeparaten bezig was, kon ik exemplaren in beweging laten zien. In één geval zag ik zeer duidelijk, dat een voorwerp langs den wand van een cel gleed, om daarna over den wand heen in een aangrenzende cel te kruipen, daarin dook, om het zoo maar eens te zeggen, en een

oogenblik later zich weer terug begaf naar de eerste cel. Anderen zag ik om hun eigen as draaien, terwijl ik een paar malen kon constateeren, dat een exemplaar, dat zich in een bepaalden hoek van een cel bevond, zich langzaam naar een anderen hoek begaf. Dergelijke bewegingen zijn niet te verklaren door aan te nemen, dat wij hier met de gewone Brown'sche beweging te doen hadden; ook zijn de onbekende lichaampjes daarvoor wel wat groot. Ik zag de bewegende voorwerpen gewoonlijk in cellen bij de grens van het gezonde gedeelte, waarin er zich nog slechts enkele bevonden; wanneer de cellen zeer vol er mede waren, zag ik ze niet bewegen; ook exemplaren, die vrij onder het dekglas, dus buiten het weefsel lagen, bewogen zich niet. Indien het geen beweging uit eigen kracht was, die de lichaampjes vertoonden, kan ik dit bewegingsverschijnsel alleen verklaren door aan te nemen, dat het veroorzaakt werd door zeer beweeglijke staafjesvormige bacteriën, die ik inderdaad herhaaldelijk in de nabijheid zag. Deze bacteriëen moeten dan de bewegende exemplaren voortgeduwd hebben, hetgeen nu wel niet heel waarschijnlijk is, maar toch ook niet geheel onmogelijk.

Het is mij nimmer gelukt, waar te nemen, op welke wijze de beweging plaats had; eenig orgaan daarvoor kon ik niet te zien krijgen, ook niet bij verschillende kleuringen om eventueel aanwezige ciliën zichtbaar te maken. Ook door het uitsteken van pseudopodiën, zooals amoeben dat doen, geschiedt de beweging stellig niet; de vorm blijft steeds onveranderd.

Van welken aard zijn nu de beschreven voorwerpjes? Ik moet verklaren het absoluut niet te weten.

Naar mijne meening zijn het vreemde organismen, die in de plant zijn binnengedrongen en zich waarschijnlijk op een of andere wijze in de cellen hebben vermeerderd, zoodat deze er ten slotte vol mede raakten. Het in de cellen aanwezige plasma zou dan verbruikt zijn voor den opbouw dezer organismen, als gevolg waarvan de cellen afsterven; ik kan op geen andere wijze de enorm groote hoeveelheid dezer organismen verklaren in cellen, waarvan de wanden nog onbeschadigd zijn.

Het is mij zeer wel bekend, dat ik mij hier op glad ijs begeef, omdat herhaaldelijk onderzoekers beweerd heb-

ben, nieuwe organismen, gewoonlijk slijmzwammen, in zieke planten te hebben ontdekt, welke organismen later bleken slechts vervormingsprodukten van het plasma te zijn; hen, die misschien mochten meenen, dat ook ik mij aan deze fout schuldig maak, wil ik gaarne mijne praeparaten laten zien; ik ben er van overtuigd, dat zij dan mijne meening zullen deelen. Ook de bij dit artikel gevoegde afbeeldingen maken m. i. deze stelling reeds onhoudbaar; de rijen der lichaampjes in de wortelharen b.v. (pl. X, fig. 3) kunnen toch bezwaarlijk bestaan uit vervormingsprodukten van zoo regelmatigen vorm, als de door mij gevonden organismen hebben. Het optreden van plasmolyse wijst trouwens uit, dat de inhoud uit levend plasma bestaat.

Aangenomen dus, dat het organismen zijn, tot welke groep moeten zij dan worden gebracht? Zijn het dieren of planten? Toen ik voor het eerst de boven beschreven bewegingen zag, meende ik met protozoën, met ééncellige dieren dus, te doen te hebben. Indien protozoën zich bewegen, geschiedt dit gewoonlijk door middel van zweepdraden, die dan echter wel zoo dik zijn, dat zij zelfs zonder kleuring zichtbaar zijn. Ik heb echter reeds medegedeeld, dat ik nooit dergelijke draden heb gezien; er schijnen evenwel ook wel protozoën te zijn, die zich zonder deze organen bewegen. Ik heb in de literatuur nergens iets kunnen vinden over protozoën als oorzaak van plantenziekten; wel vond ik eene mededeeling over het voorkomen van een protozoe in het melksap van *Euphorbia pilulifera*, maar op deze *Leptomonas*-soort lijken mijn organismen niet in het minst.

Een tweede veronderstelling was, dat ik met algen te doen had; inderdaad bestaan er ontwikkelingsvormen van algen, die in uiterlijk wel overeenkomen met de onbekende lichaampjes; zoo lijkt b.v. fig. 2, pl. X, veel op een ontwikkelingsvorm van *Prototheca Krügeri*, door BEYERINCK in zijn werk „Mutation bei Mikroben” (Folio Microbiologica, 1912) op Tafel III, fig. 7 afgebeeld. Ook bestaan er een aantal in planten parasiteerende wieren, die echter geen uiterlijke overeenkomst vertoonen met de vreemde voorwerpen. Wanneer deze organismen echter inderdaad ontwikkelingsvormen van algen zouden zijn, is het wel te verwonderen, dat ik nimmer eenige andere ont-

wikkelingstoestand aantrof in een der vele praeparaten, die ik onderzocht.

Ik heb getracht de organismen buiten de plant te kweken; daarvoor heb ik worteltjes, die er blijkens mikroskopisch onderzoek stampvol mede zaten, doorgesneden en het snijvlak gestreken over agarplaten met spinaziesap, al en niet met toevoeging van een weinig krijt; er trad echter alleen eenige bakteriegroei op; ook liet ik stukjes van zieke wortels, na uitwendige sterilisatie met een uitgegloeide schaar geknipt, op dezelfde voedingsbodems vallen met hetzelfde resultaat. Verder heb ik een aantal der lichaampjes gebracht in druppels zeer verdund mout-extract in van Tieghemsche kamers; de eenige verandering, die ik zag optreden, was, dat de wand zich wat verdikte of wat duidelijker zichtbaar werd (pl. X, fig. 2). Prof. Dr. N. SÖHNGEN, wien ik de lichaampjes vertoonde en die mij welwillend van advies diende, is er evenmin in geslaagd ze buiten de plant te kweken.

Is het mij dus ten eenenmale mislukt, eenige zekerheid te krijgen over den aard dezer X-organismen, zooals ik ze voorloopig wil noemen, evenmin ben ik er in geslaagd aan te toonen, dat zij werkelijk de beschreven ziekteverschijnselen bij spinazie veroorzaken. Ik heb op de volgende wijze gepoogd dit bewijs te leveren. De heer G. Zeldenrust te Warfum, de eigenaar der zieke planten, was op mijn verzoek zoo vriendelijk mij een groot aantal zieke planten, met een kistje grond, waarin die plantjes gegroeid waren, toe te zenden, benevens wat zaad van dezelfde partij, waarmede de grond in de druivenkas bezaaid was geworden.

Met dit materiaal nam ik nu de volgende proeven: de helft van den grond werd gekookt; de gekookte aarde werd weder over twee potten verdeeld, en in de eene dier potten spinaziezaad uit Warfum, in de andere spinaziezaad, in voorraad aan het Instituut, gezaaid; met den ongekookten grond, dien ik voor besmet hield, geschiedde hetzelfde. Een deel van het spinaziezaad uit Warfum werd ontsmet door indompeling gedurende een uur in $\frac{1}{10}$ % sublimaat oplossing; dit ontsmette zaad werd in een pot met grond van de terreinen van het Instituut uitgezaaid; ter vergelijking zaaide ik in een pot met denzelfden grond niet ontsmet

zaad uit Warfum. Een groot aantal zieke worteltjes werd fijngesneden en de snippers vermengd met grond van het terrein van het Instituut, waarin vervolgens zaad uit onzen voorraad werd gezaaid. Ten slotte begoot ik een pot met Wageningschen grond en dito zaad, toen de plantjes waren opgekomen, met water, waarin meerdere dagen lang zieke plantjes hadden gelegen, die er ten deele in verrot waren, terwijl natuurlijk ook ter controle in een pot met Wageningschen grond Wageningsch zaad zonder eenige verdere behandeling werd uitgezaaid. Ik kreeg dus de volgende serie potten:

- I. Zieke grond; Warfumsch, dus misschien besmet zaad.
- II. " " ; Wageningsch zaad.
- III. Gekookte zieke grond; Warfumsch zaad.
- IV. " " " ; Wageningsch zaad.
- V. Wageningsche grond; ontsmet Warfumsch zaad.
- VI. " " ; niet ontsmet Warfumsch zaad.
- VII. " " ; Wageningsch zaad; besmet met versnipperde zieke planten.
- VIII. " " ; Wageningsch zaad; besmet met aftreksel van zieke planten.
- IX. " " ; Wageningsch zaad; controle.

Door die serie proeven was het dus mogelijk uit te maken, of de ziekte met het zaad overging, wat hoogst onwaarschijnlijk is, of wel, wat ik voor zeker houd, in den grond zit. In het eerste geval zou dan tevens blijken, of ontsmetting van het zaad helpt, in het tweede of sterilisatie van den grond door koking de ziektekiemen doodt. Ten slotte zou kunnen blijken, of de ziekte met zieke plantjes of met besmet water kan worden overgebracht. Tot mijn grooten spijt hebben deze proeven echter niet het minste resultaat gegeven; in geen der potten trad de ziekte op; wel stierven in verschillende potten een paar plantjes, aan een ziekte in de wortels, waarbij ongeveer gelijksoortige verschijnselen optraden, maar in al deze planten werd bij mikroskopisch onderzoek de zwam *Pythium de Baryanum* als oorzaak gevonden.

Deze proeven hebben mij dus niets wijzer gemaakt. Noch het parasitisme noch de besmettelijkheid zijn bewezen. Prof. Dr. M. W. BEJERINCK, die zoo vriendelijk was mijn

materiaal te onderzoeken, is er evenmin in geslaagd bij infectie-proeven resultaten te verkrijgen.

Om te weten te komen, of soortgelijke ziekteverschijnselen bij spinazie meer voorkwamen, heb ik in het begin van April een rondschrjven gericht aan alle Rijksland- en tuinbouwleeraren en controleurs van den Phytopathologischen dienst met het verzoek eens te willen informeeren, of zich in hunne omgeving een dergelijke ziekte had geopenbaard, en zoo ja, mij eenig materiaal ter onderzoek te willen toezenden. Verschillende dezer heeren voldeden met groote welwillendheid aan dit verzoek: echter vond ik in slechts ééne zending, uit Hoorn, de X-organismen terug.

Ofschoon ik dus niet kan zeggen, of de X-organismen inderdaad plantenziekte-veroorzakende protozoën zijn, het geen een novum in de phytopathologie zou beteekenen, nosh, of zij tot een of andere groep uit het plantenrijk behooren, wilde ik toch deze mededeeling niet in de pen houden. Vooreerst hoop ik, dat in het a.s. voorjaar mij als gevolg daarvan uit meerdere plaatsen zieke spinazieplanten met bovenbeschreven verschijnselen zullen worden toegezonden, zoodat ik de proeven kan herhalen, en ten tweede koester ik de flauwe hoop, dat misschien een lezer mij op weg kan helpen om uit te maken, wat de X-organismen eigenlijk zijn. Groot is die hoop niet, daar verschillende microbiologen, botanici en phytopathologen, die ze in mijne praeparaten zagen, ze evenmin thuis konden brengen als ik. Gaarne ben ik bereid aan belangstellenden, die het mochten wenschen, praeparaten en spiritusmateriaal te demonstreeren.

Wageningen, October 1918.

SHORT REFERATE.

UNKNOWN CORPUSCULES IN DISEASED SPINACH-ROOTS.

BY

T. A. C. SCHOEVERS,

PHYTOPATHOLOGIST IN THE INSTITUTE FOR PHYTOPATHOLOGY
AT WAGENINGEN.

The main roots of diseased plants were to some extent shrivelled up and black or brown; the smaller rootlets were absent or diseased in the same manner. In the discoloured areas no mycelium could be found, except in one or two cases out of forty or fifty. In each case however the author found in the cells of the root parenchyma small, somewhat spindle-shaped, more or less oval bodies with smaller and larger fatdrops inside; the size was about $15 \times 5 \mu$. Some cells were literally filled up with them, as was also the case with some root hairs. See Plate X, fig. 1, 3 and 4. In the vascular bundles the corpuscules were seldom found. The walls of the cells seemed quite intact; only after death they began to rot away. The author has distinctly seen some of these bodies moving; one of them passed from one cell into another and back again; several other persons also saw the queer little things slowly moving. This movement was only very seldom to be seen; the author was unable to see any organs which could bring it about. Although he thinks the bodies moved by their own force, he yet admits the possibility of this movement being caused by strongly moving bacteria, which sometimes were to be seen near the unknown bodies and pushed them from one place to another.

The strange things were shown to several biologists and botanists; till now their true nature could not be determined. Endeavors to cultivate them in artificial media outside the plant were quite unsuccessful; only a small increase in the thickness of the walls could be seen (pl. X, fig. 2). Experiments to prove their parasitism and infectiousness met with no better results.

Although it is by no means proved, the author is inclined to think, that these newly discovered X-organisms, as he proposes to call them for the present, are a form of not yet described protozoa. He would be grateful, if anybody could point out to him with certainty the true nature of these X-organisms, which for the first time were found by him in 1917 in the roots of similarly diseased beans.



