

wondparasiet te zijn, die na binnendringen oude bladeren snel doet afsterven, maar die zich in jonge bladeren niet sterk kan uitbreiden.

SUMMARY

Two fungi were isolated from diseased leaves of *Rhododendron ponticum*: *Botryosphaeria foliorum* (Sacc.) v. ARX et MÜLL en *Chaetapiozpora rhododendri* (TENGW.) v. ARX. With the latter inoculation-experiments were performed. It became clear that this fungus can only invade the leaves of *Rhododendron ponticum* through wounds, causing dead areas. These spots enlarged quickly when the leaves were detached from the branches. Perithecia developed in the dead tissues.

LITERATUUR

- ARX, J. A. VON, - 1952. Über einige Ascomycetengattungen mit ungleich zweizelligen Sporen. Berichte der Schweiz. Bot. Gesellschaft 62:340-362.
MÜLLER, E. & ARX, J. A. VON, - 1955. Einige Beiträge zur Systematik und Synonymie der Pilze. Phytopathologische Zeitschrift 24:353-372.
TENGWALL, T. Å., - 1924. Über einige parasitische Pilze auf kultivierten Rhododendren. Meded. Phytopath. Laboratorium „Willie Commelin Scholten“, Baarn, 6:58-61.

T. Pl.ziekten 63 (1957): 192-194

HET TOETSEN VAN STAMMEN VAN *NECTRIA CINNABARINA* (TODE) FR. OP LEVENDE TAKKEN IN VITRO¹⁾

*With a summary: The testing of strains of Nectria cinnabarina (Tode) Fr.
on living branches in vitro*

DOOR

M. A. A. SCHIPPER en H. M. HEYBROEK

Phytopathologisch Laboratorium „Willie Commelin Scholten“, Baarn

Bij het selecteren van iepen resistent tegen de iepenziekte, veroorzaakt door *Ophiostoma ulmi* (BUISMAN) NANNF., bleken sommige resistente typen, o.a. de CHRISTINE BUISMAN-iep, een Spaanse zaailing, vatbaar te zijn voor *Nectria cinnabarina* (TODE) FR. Deze schimmel, die gewoonlijk als een saprophyt op dood hout te vinden is, treedt hier als een parasiet op. Vanuit dode zijtakjes of wonden breidt de infectie zich uit in het omringende weefsel. Vanuit het hout wordt de bast aangetast, waardoor donkere ingezonken plekken ontstaan, z.g. bastbranden. Als een tak door een brand geheel omringd wordt, sterft het erboven gelegen gedeelte af. Vaak komt de uitbreiding tot staan.

Nu is gebleken, dat er verschil in pathogeniteit bestaat tussen *Nectria cinnabarina*-isolaties. Om iepen-hybriden op hun vatbaarheid voor *Nectria* te kunnen toetsen moet men over virulente stammen beschikken. Deze virulentie gaat echter verloren bij stammen, die lang in cultuur gehouden worden. Het is

¹⁾ Aangenomen voor publikatie 1-5-1957.

daarom nodig steeds nieuwe wilde stammen te isoleren en te toetsen op virulentie. Dit kan gebeuren door takken van iepen met de schimmel te inoculeren. Gebeurt dit tijdens de gevoelige periode van de boom, dan kan men na 3 tot 6 weken al resultaten verwachten. Maar na inoculatie in andere perioden duurt het langer voor er zichtbare reacties optreden of de reacties kunnen geheel uitblijven, zelfs bij gebruik van virulente stammen. Het is dan ook geen wonder dat men gezocht heeft naar een methode om de virulentie op andere wijze vast te stellen.

Men kan zich afvragen of er misschien een correlatie bestaat tussen de groeisnelheid van het mycelium en de virulentie. Bepalingen van de groeisnelheid van verschillende stammen bij verschillende temperatuur op kunstmatige media konden een dergelijke correlatie echter niet aantonen (VAN VLOTEN 1943, KOBEL 1952 en eigen waarnemingen).

Een andere methode om de virulentie van *Nectria*-stammen te toetsen is gebaseerd op de toxische werking van het cultuurfiltraat. Men kan hiervoor echter geen iepen-takken als toetsobject gebruiken, daar deze na afsnijden onmiddellijk verwelken. KOBEL gebruikte dan ook *Ribes*-takken voor het bepalen van de toxische werking, terwijl URI (1948) de groei van mycelium van *Pythium debaryanum* als maatstaf daarvoor aannam.

De gedachte kwam nu naar voren, de mate van pathogeniteit te toetsen op ander levend materiaal, zoals op aardappel, appel, peer, aardpeer of uien of op levende afgesneden takjes door dit materiaal met schimmelstammen te inoculeren. Het was te verwachten, dat virulente stammen levende weefsels makkelijker zouden kunnen aantasten dan isolaties met een meer saprophytisch karakter. Voor dit onderzoek werden drie *Nectria*-stammen gebruikt, resp. zeer virulent, matig en niet virulent, zoals na inoculaties van iepen gebleken was. De aardappels, appels, peren en aardperen werden uitwendig gedesinfecteerd, in schijven gesneden en geïnoculeerd met mycelium. Bij de uien werd mycelium gebracht op steriele, gave bolrokken. Dit alles leverde echter geen of niet reproduceerbare resultaten op en daarom werden de proeven alleen met takjes van esdoorn en iep voortgezet. Takjes met een doorsnede van $\frac{1}{2}$ tot $\frac{3}{4}$ cm van esdoorn en van de CHRISTINE BUISMAN-iep werden ontsmet. Volgens de methode aangegeven door MOREL (1948) werden de beste resultaten bereikt. Na afborstelen werden de takken gedurende ongeveer 15 seconden geschud in alcohol 96% en vervolgens zonder spoelen in 7% calciumhypochloriet overgebracht, waarin de takjes gedurende 30 minuten geschud werden. Daarna werden zij 2 maal gespoeld in steriel water. De uiteinden werden vervolgens afgeknipt om te voorkomen, dat via het snijvlak binnengedrongen desinfectiemiddelen schadelijk zouden werken. Na deze behandeling werden de takjes in steriele buizen gebracht met een vochtige wattenprop op de bodem. Uit een groot gedeelte van de takken groeide soms reeds na enkele dagen mycelium van verschillende fungi ondanks de zorgvuldige desinfectie. Er ontwikkelden zich o.a. vaak pycnidiën van een *Phomopsis* sp. en later ook rijkelijk peritheciën, waaruit bleek, dat men met een *Diaporthe*, waarschijnlijk *D. eres* NIT. te maken had. Opmerkelijk is, dat bij vele tientallen cultures met verschillende stammen van deze schimmel op gesteriliseerde takjes nooit peritheciën tot ontwikkeling kwamen, hetgeen op levende iepetakjes wel het geval was. Vooral de schors bleek vaak met de schimmel besmet te zijn zonder dat er uitwendig iets aan de takjes te zien was geweest. Zelfs na 3 weken kon een dergelijke latente

infectie nog tot uiting komen. Als na het desinfecteren van de takjes de oppervlakkige schorslagen verwijderd werden, bleef meer dan 90 % van de exemplaren steriel. Op de wondvlakken ontwikkelde zich bij de iepentakken rijkelijk callus, waaruit bebladerde spruitjes ontstonden.

Vele inoculaties werden verricht, waarbij blokjes agar met mycelium van de 3 *Nectria*-stammen tegen de zijanten van de steriel gebleven takjes aangelegd werden. Eén der vele proefseries werd begin oktober ingezet. Esdoorn-takjes, telkens met één der 3 stammen geïnoculeerd, vertoonden na 3 weken duidelijke verschillen. De virulente stam overgroeide en doodde de takjes snel in tegenstelling tot de minder en niet virulente stammen, die daartoe niet in staat waren. De laatste vormden slechts weinig ijl mycelium op de takjes. Ongeveer hetzelfde resultaat werd met geschilde en met ongeschilde iepen-takjes bereikt.

Deze methode opent misschien perspectieven voor het bestuderen in vitro van het parasitisme van organismen pathogeen voor bomen. Hierbij is het mogelijk de omstandigheden constant te houden of naar keuze te variëren, hetgeen bij proeven met bomen slechts zelden mogelijk is.

SUMMARY

Some types of elm hybrids resistant to the Dutch elm disease turned out to be susceptible to *Nectria cinnabarina* (TODE) FR. This fungus may behave as a parasite, killing branches. Virulent and non-virulent strains are known. A method is described for cultivating *Nectria*-strains in vitro on living disinfected branches of *Acer* and of *Ulmus*. Three weeks after inoculation with a virulent strain the branches were killed. They were covered all over by a thick layer of mycelium. The mycelium of non-virulent strains could not kill the branches. It developed only sparsely. By this method it will be possible to select the most virulent strains out of a collection of isolates in order to use them for testing elm hybrids on their resistance to *Nectria cinnabarina*.

LITERATUUR

- KOBEL, F., - 1952. Untersuchungen über toxische Stoffwechselprodukte von *Nectria cinnabarina*. Phytopathologische Zeitschr. 18:157-195.
MOREL, G., - 1948. Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. Annales des Epiphyties 14:123-234.
URI, J., - 1948. Het parasitisme van *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr. T. Pl.ziekten 55:29-74.
VLOTEN, H. VAN, - 1943. Verschillen in virulentie bij *Nectria cinnabarina*. T. Pl.ziekten 49:163-171.