



Beheersing van *Phytophthora ramorum*

Eindrapportage PT-11685

G. Kessel, F. van Kuik, P. Bonants, P. van den Boogert, S. Breeuwsma & E. Verstappen





Beheersing van *Phytophthora ramorum*

Eindrapportage PT-11685

G. Kessel¹, F. van Kuik², P. Bonants¹, P. van den Boogert¹, S. Breeuwsma² & E. Verstappen¹

¹ Plant Research International

² Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, business unit bloembollen en bomen

© 2006 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Plant Research International B.V.

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 - 47 70 00
Fax : 0317 - 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	1
1. Inleiding	3
2. Materiaal en methoden	5
Resistentie	5
Verspreiding	6
Detectie	7
3. Resultaten	9
Resistentie	9
Verspreiding	10
Detectie	13
4. Conclusies en Discussie	15
5. Referenties	17
Bijlage I.	1 p.
Bijlage II.	2 pp.

Samenvatting

Phytophthora ramorum is een plant pathogene oomyceet met quarantaine status en een uitgebreide waardplantreeks waaronder vele bomen en struiken. In het Nederlandse kwekerij assortiment worden met name problemen gemeld op Rhododendron en Viburnum. In de Verenigde Staten is deze pseudoschimmel verantwoordelijk voor massale sterfte onder met name laurier en eik (sudden oak death). Tot op heden worden twee geografisch gescheiden *P. ramorum* populaties onderscheiden, de Europese populatie (paringstype A1) en de Amerikaanse populatie (paringstype A2). Contact tussen beide populaties is ongewenst omdat verwacht wordt dat recombinatie van eigenschappen uit beide populaties de problemen met *P. ramorum* potentieel zal doen toenemen.

In dit onderzoeksproject is gezocht naar praktische handvatten om *P. ramorum* problemen beter beheersbaar te maken.

Het specifiek aantonen van het pathogeen is de eerste stap tot beheersing van het probleem. Binnen dit project zijn nieuwe, snelle, *P. ramorum* specifieke detectiemethoden gebaseerd op (taqman) PCR voor gebruik in plantmateriaal en water gevalideerd en beschikbaar gemaakt. Daarnaast zijn extra methoden beschikbaar gekomen waarmee de Europese populatie van de Amerikaanse populatie onderscheiden kan worden. De genetische variatie zoals zoals die nu gevonden is tussen en binnen beide populaties is naar alle waarschijnlijkheid te klein om 'tracking en tracing' mogelijk te maken.

Resistentie is van oudsher de uitgelezen oplossing voor problemen met plant pathogenen. Absolute resistentie tegen *P. ramorum* is binnen Rhododendron echter nooit gevonden. Daarom is in dit project gekeken naar de verschillende niveaus van partiële resistentie die in het huidige assortiment Rhododendron cultivars beschikbaar zijn. Hoge niveaus van partiële resistentie zijn eveneens zeer bruikbaar in preventieve *P. ramorum* beheersingsstrategieën. Rhododendron cultivars Wilgens surprise en Impeditum bleken zeer resistent (maar niet immuun) tegen infectie door *P. ramorum*. Cultivars Catawbiense grandiflorum en Ferrugineum bleken zeer vatbaar en zouden dus bij voorkeur vermeden moeten worden. Daarnaast werd een grote groep intermediair vatbare cultivars geïdentificeerd met o.a. Cunninghams white, Wilgens ruby en Roseum elegans. Er werden geen aanwijzingen gevonden voor compatibiliteits- of agressiviteitsverschillen tussen de Europese en de Amerikaanse populatie met de hier getoetste waardplantreeks en isolaten.

Als laatste werden de huidige beheersmaatregelen zoals die worden toegepast bij bedrijven met *P. ramorum* problemen geëvalueerd. Door het uitblijven van een redelijk aantal gemelde bedrijven met *P. ramorum* problemen is deze analyse gebaseerd op data afkomstig van slechts één bedrijf. Er werden geen aanwijzingen gevonden die aanpassing van de huidige set maatregelen noodzakelijk maken.

1. Inleiding

Phytophthora ramorum is een Q-pathogene pseudoschimmel die in Nederland is aangetroffen op Rhododendron en Viburnum. Sinds 1993 wordt scheutinsterving en bladvlekken bij Rhododendron, alsmede basisrot bij Viburnum aangetroffen. In Californië (Verenigde Staten) veroorzaakt de pseudoschimmel massale sterfte onder loofbomen, met name eik en laurier, en struiken in de groene ruimte evenals problemen in de opkweek van potplanten en boomkwekerijgewassen.

Tot op heden worden twee, geografisch gescheiden, populaties van *P. ramorum* onderscheiden. Isolaten met paringstype A1 worden vrijwel uitsluitend in Europa aangetroffen terwijl isolaten met paringstype A2 vrijwel uitsluitend in de Verenigde Staten worden gevonden. Contact tussen beide paringstypen treedt vooralsnog niet op waardoor (nog) geen sprake is van een functionele sexuele cyclus. Het optreden van een functionele seksuele cyclus heeft bij *P. infestans* in aardappel voor significante additionele problemen gezorgd in de bestrijdingsstrategie. Het is daarom belangrijk contact tussen beide paringstypen en uitwisseling van isolaten tussen beide geografische domeinen te vermijden. Naast het paringstype is daarom tegenwoordig een aantal moleculaire technieken beschikbaar om beide populaties van elkaar te onderscheiden.

Om verdere verspreiding van het pathogeen tegen te gaan zijn door de EU verplichte maatregelen opgesteld voor zowel commerciële teelten als natuur en openbaar groen. De maatregelen betreffen verwijdering van de besmettingsbron en omliggende vatbare planten.

In het algemeen kan gesteld worden dat *P. ramorum* een zeer brede waardplantreeks heeft. Voor waardplanten van *P. ramorum* wordt onderscheid gemaakt tussen bewezen waarden (postulaten van koch voltooid), waardplanten geassocieerd met *P. ramorum* (symptoomontwikkeling in een natuurlijke omgeving, *P. ramorum* aangetoond maar postulaten van koch (nog) niet voltooid) en experimentele waarden (geïnfecteerd onder experimentele omstandigheden). Daarnaast wordt voor epidemiologische doeleinden onderscheid gemaakt tussen sporulatiewaarden en niet-sporulatiewaarden. Sporulatiewaarden zijn soorten die na aantasting grote hoeveelheden sporen produceren en daarmee een epidemie in hun omgeving op gang brengen. Rhododendron en Laurier (*Umbellularia californica*) zijn twee sporulatiewaarden. In Californië is het de combinatie van een massaal aanwezige sporulatiewaard in de ondergroei van bossen (*Umbellularia californica*) in combinatie met enkele zeer gevoelige boomsoorten (eik) die de dramatische symptomen van 'sudden oak death' veroorzaakt. De levenscyclus van *P. ramorum* (Bijlage I) is complex door de verschillende habitats waarin de ziekte wordt waargenomen, de grote diversiteit binnen de waardplantreeks en de verschillende reacties van waardplanten op infectie. Waardplantlijsten zijn continu in ontwikkeling en worden uitgebreid naarmate meer onderzoeksresultaten beschikbaar komen. Twee waardplantlijsten zijn o.a. te vinden op de website van het EU project RAPRA (rapra.csl.gov.uk) en op de site van het 'United States Department of Agriculture': www.aphis.usda.gov/ppq/ispm/pramorom/pdf_files/usdaprlist.pdf

Bij aanvang van dit project was niet bekend of de Europese populatie in Europa dezelfde bedreiging vormt voor de Europese sector/openbaargroen/natuur als de Amerikaanse populatie in de VS. Over de Europese populatie was relatief weinig biologische en ecologische kennis beschikbaar. Voor risicoanalyse en effectieve beheersmaatregelen was daarom met name meer kennis nodig over de Europese populatie met betrekking tot waardreeks, verspreiding en overleving van de pseudoschimmel onder Europese en Nederlandse omstandigheden en de specifieke gevolgen van mogelijke kruising tussen Amerikaanse en Europese populaties.

Doel van dit project was onderzoek te doen naar praktische handvatten voor preventieve maatregelen en beheersing/bestrijding van *P. ramorum* op bedrijfsniveau in drie thema's:

- Resistentie: opsporen van gewassen met relatief lage vatbaarheid tegen *P. ramorum* (EU en VS populatie) binnen het voor de handel belangrijkste Nederlandse boomkwekerijsortiment. Door gewaskeuze te koppelen aan resistentieniveau kan de sector preventief inspelen op verdere verspreiding van (kruisingen van) Europese en Amerikaanse populaties.

- Verspreiding: maatregelen ter voorkoming van verspreiding door instellen plantvrije zones en wachttijden; het bepalen van potentiële verspreidingsroutes op bedrijfsniveau; bepalen effectiviteit van bestaande fungiciden tegen verspreiding van *P. ramorum*.
- Detectie: het valideren van een snelle detectiemethode (PCR-test) voor *P. ramorum*; testen van de bruikbaarheid van 'on site' PCR-test op bedrijfsniveau van productie en handel; het valideren van specifieke detectiemethode voor Amerikaanse en Europese populaties ('track & trace').

2. Materiaal en methoden

Resistentie

Een lijst te toetsen soorten en cultivars is opgesteld in 2004. In 2005 is deze lijst herzien en toegespitst op Rhododendron na het verschijnen van een Amerikaanse gepubliceerde waardplantlijst en afstemming met het Belgische Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek in Merelbeke. Uit deze lijst (Bijlage 1) is vervolgens in overleg met de begeleidingscommissie een selectie getoetst in een serie *in vitro* toetsen. Selectiecriteria waren 'economisch belang van het cultivar' en 'morfologische karakteristieken' van het cultivar in relatie tot infectie. Voor het laatste kenmerk werd onderscheid gemaakt in lepidote (geschubde) en elepidote (ongeschubde) cultivars en de aanwezigheid van een indumentum (viltige beharing doorgaans aan de onderzijde van de bladeren).

Omdat alle te toetsen Rhododendron cultivars in principe vatbaar zijn is gekozen het partieel niveau van resistentie te bepalen. Deze methode laat toe intermediaire vormen van resistentie te kwantificeren. Als maat voor de infectie-resistentie werd de infectie efficiëntie (IE) bepaald. Als maat voor de doorgroeiresistentie in blad werd de radiale lesiegroeisnelheid (LGR) bepaald in *in vitro* bladtoetsen op afgesneden blad. De IE geeft de infectiekans voor 1 zoospore weer terwijl de LGR de radiale uitbreidingsnelheid van bladvlekken (mm/dag) weergeeft. Beide parameters zijn belangrijke componenten in de infectiecyclus van *P. ramorum*.

Infectie efficiëntie

De infectie efficiëntie werd bepaald door druppelinoculatie met een zoosporensusensie aan de onderzijde van het blad (vergelijk Figuur 1). Bladeren werden geplukt en in petrischalen gelegd op 1% wateragar. Elk experiment bevatte zes bladeren met 10 inoculumdruppels (20 μ l, 10000 zoosporen/ml) elk. Na inoculatie werden de bladeren overnacht in het donker bij 20 °C geïncubeerd, vervolgens werd het heersende dag/nacht van de kas gevolgd. Het aantal succesvolle inoculaties werd geteld.

In totaal werden 3 experimenten uitgevoerd met het VS isolaat (P1403) en 2 experimenten met het EU isolaat (P1577) op tien Rhododendron cultivars. De infectie efficiëntie werd berekend volgens Swallow (1987).

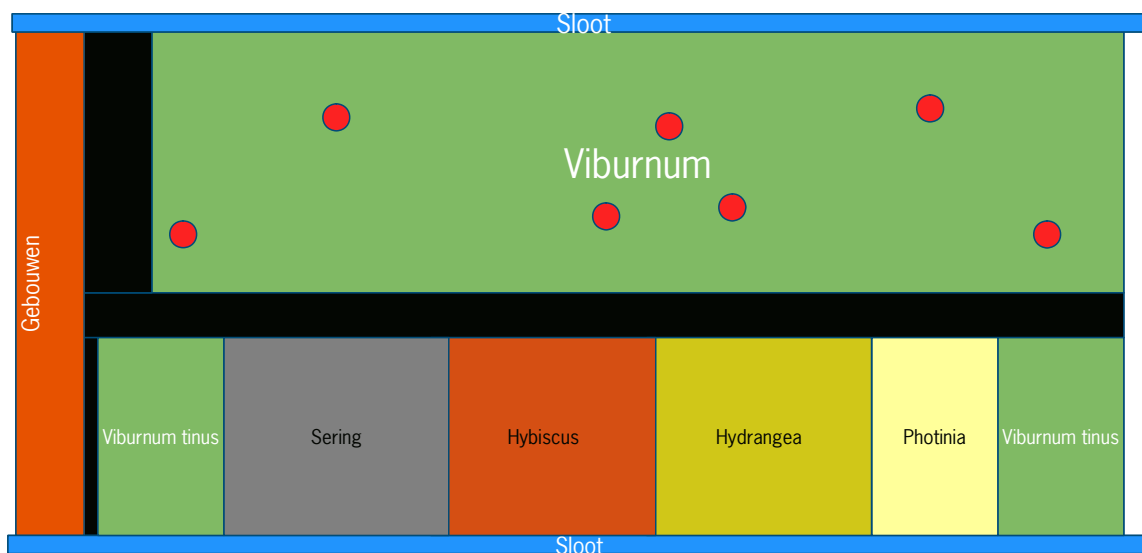
Radiale lesiegroeisnelheid

De radiale lesiegroeisnelheid werd bepaald in een *in vitro* toets door op de onderzijde van vier bladeren per proef een druppel sporensuspensie (20 μ l, 2×10^5 – 3×10^5 zoosporen/ml, 2 druppels per blad, Figuur 1) aan te brengen.

Verder werd de proef uitgevoerd zoals beschreven onder 'infectie efficiëntie'. Na het verstrijken van de latente periode werd de diameter van de ontstane lesie verschillende keren opgemeten in de tijd. Uit de metingen werd de radiale lesiegroeisnelheid (mm/dag) berekend.



Figuur 1. Druppelinoculatie van Rhododendron blad zoals gebruikt in de *in vitro* resistentietoetsen.



*Figuur 2. Schematische weergave van de situatie op bedrijf 3. Twee plantblokken gescheiden door paden en onder en boven gelegen aan sloten. *P. ramorum* aantasting (bolletjes) werd verspreid in een groot blok *Viburnum bodnantense* 'Dawn' aangetroffen. Zieke en gezonde planten uit de directe omgeving van de zieke planten werden overgebracht naar een quarantaine kas bij PPO in Lisse voor verdere observatie. Bladmonsters uit de diverse soorten in het onderste plantblok werden overgebracht naar PRI voor PCR analyse. Naast het grote *Viburnum* blok stond nog een blok *Raphiolepis* (rechts boven, niet afgebeeld) wat ook bemonsterd is.*

Opgenomen *Rhododendron* cultivars waren: Nova Zembla, Cunninghams White, Morgenrot, Catawbiense grandiflorum, Wilgens surprise, Ferrugineum (alleen IE), Impeditum (alleen IE), Wilgens Ruby, Dora Amateis en Roseum elegans. Opgenomen *P. ramorum* isolaten waren: P1577 (EU) en P1403 (VS).

Verspreiding

Maatregelen ter voorkoming van verspreiding door instellen plantvrije zones en wachttijden; het bepalen van potentiële verspreidingsroutes op bedrijfsniveau; bepalen effectiviteit van bestaande fungiciden tegen verspreiding van *P. ramorum*.

Bedrijfsbezoeken

Onderzoek bij bedrijven met *P. ramorum* infecties was bedoeld om onder praktijkomstandigheden inzicht te verwerven in verspreidingsroutes en verspreiding en de effectiviteit van maatregelen gebaseerd op plantvrije zones en wachttijden. Gebaseerd op een enquête onder 80 bedrijven met *P. ramorum* problemen in 2002 en 2003 zou deze benadering additionele praktische informatie opleveren m.b.t. verspreiding en beheersing van *P. ramorum*. In tegenstelling tot 2002 en 2003 werden slechts vier bedrijven met *P. ramorum* problemen gemeld. Na melding bleek medewerking van de teler, om begrijpelijke redenen, niet vanzelfsprekend.

- Bedrijf 1: *Rhododendron* in potten, geruimd voorafgaand aan bezoek. Monsters van een mogelijke 2e infectie op dit bedrijf bleken negatief voor *P. ramorum* na een *P. ramorum* specifieke PCR analyse.
- Bedrijf 2: *Viburnum* in de volle grond, planten waren geruimd voorafgaand aan bezoek. Geen monsters meer genomen bij gebrek aan verdacht plantmateriaal.
- Bedrijf 3: In de herfst van 2004 werd een aantasting aangetroffen in een groot blok *Viburnum bodnantense* 'Dawn'

- planten. Deze planten waren oorspronkelijk opgekweekt op een ander perceel op hetzelfde bedrijf. Enige tijd na het verplaatsen werd een *P. ramorum* aantasting verspreid in een groot blok *V. tinus* gevonden (Figuur 2). Zieke planten en symptoomloze (gezonde?) planten uit hun directe omgeving werden voor analyse en observatie naar een quarantainekas van PPO in Lisse vervoerd. Bladmonsters uit de plantblokken met diverse soorten gelegen naast het aangetaste *Viburnum* blok en aan de andere kant van het pad werden samen met watermonsters uit sloot en put naar PRI in Wageningen vervoerd voor PCR analyse. Drainwater wordt op dit bedrijf afgevoerd naar de put die op zijn beurt een overloop heeft naar de sloot. Submonsters van de watermonsters werden geconcentreerd op 0.22µm millipore filters. Bladmonsters werden afgespoeld en het spoelwater werd wederom geconcentreerd op 0.22µm millipore filters. Het bladmateriaal zelf werd vervolgens geïncubeerd waarbij na incubatie symptomatisch bladmateriaal nogmaals werd afgespoeld en het spoelwater geconcentreerd op 0.22µm millipore filters. Na DNA extractie op de filters waren de monsters geschikt voor kwantitatieve (TaqMan) PCR analyse.
- Bedrijf 4: *P. ramorum* is aangetroffen in *Viburnum* in containers. Aanvankelijk verleende de teler medewerking maar kwam op zijn besluit terug en medewerking aan het onderzoek werd geannuleerd.
- In 2005 zijn geen meldingen van *P. ramorum* problemen in bedrijven binnengekomen. Naar later tijdens een bijeenkomst van de begeleidingscommissie bleek zijn er wel enkele gevallen opgetreden maar deze zijn niet gemeld.

Symptoomontwikkeling

Latente periode

Onderzoek naar latentie en latente periodes is onderdeel van het EU project RAPRA en als zodanig nog niet afgerond. Voorlopige resultaten zijn gebaseerd op laboratorium experimenten met afgesneden bladmateriaal zoals beschreven onder 'resistentie' en informatie uit de internationale literatuur.

Lesiegroeisnelheid

Naast de latente periode is de lesiegroeisnelheid de parameter die de snelheid van symptoomontwikkeling uitdrukt. Het effect van temperatuur op de snelheid van lesiegroei is onderzocht in een tweetal proeven met zeven *Rhododendron* cultivars en twee *P. ramorum* isolaten afkomstig uit de EU en de VS. Bladmateriaal van *Rhododendron* cultivars Cunningham's white, Dora amateis, Morgenrot, Ponticum 'Nijmegen', Roseum elegans, Wilgen surprise en Wilgen's ruby werd geplukt en in petrischalen op wateragar gelegd. De onderkant van het blad werd geïnoculeerd met twee druppeltjes inoculum suspensie (Figuur 1). Na ontwikkeling van de eerste symptomen werd al het bladmateriaal bij de gewenste temperatuur geplaatst en werd na een overgangperiode van 1 dag de lesieontwikkeling gemonitored door dagelijks de diameter van elk lesie in 2 richtingen op te meten.

Sporulatie

Onderzoek naar sporulatie volgend op symptoomontwikkeling is onderdeel van het EU project RAPRA en als zodanig niet afgerond. Voorlopige resultaten zijn gebaseerd op laboratorium experimenten met afgesneden bladmateriaal aangevuld met data uit Engels en Amerikaans onderzoek waar op plaatsen in Californie onderzoek naar sporulatie in de natuurlijke omgeving is gedaan.

Detectie

Doel van dit onderdeel was het valideren van een snelle detectiemethode (PCR-test) voor *P. ramorum* waarmee in tweede instantie de besmettings- en verspreidingsroutes binnen en tussen bedrijven kunnen worden nagegaan. Daarnaast het testen van de bruikbaarheid van een 'on site' PCR-test op bedrijfsniveau van productie en handel en het valideren van specifieke detectiemethoden voor Amerikaanse en Europese populaties ('track & trace').

DNA extractie en detectiemethoden:

DNA extractie en specifieke detectie *P. ramorum*

DNA extractiemethoden voor *P. ramorum* bevattend plantweefsel en voor *P. ramorum* sporen op millipore filters t.b.v. detectie in (was)watermonsters worden geoptimaliseerd en beschikbaar gemaakt.

P. ramorum specifieke PCR detectiemethoden (Taqman PCR) worden beschikbaar en toepasbaar gemaakt voor plant- en watermonsters na filtratie. De (TaqMan) PCR, specifiek voor *P. ramorum*, zal worden geïmplementeerd en uitgetest op verdunningsreeksen van zoosporen en zoosporangia in kraan- en drainwater om de detectiegrens te bepalen. Hiertoe wordt water, waaraan bekende aantallen zoosporen/zoosporangia zijn toegevoegd, gefiltreerd. DNA extracten van het filter zullen worden geanalyseerd met de TaqMan PCR. Met behulp van deze techniek zal het mogelijk worden eenduidig uit te wijzen of een watermonster of een zieke plant met *P. ramorum* geïnfecteerd is. Voor de watermonsters zal het daarnaast mogelijk worden de besmettingsgraad te bepalen.

Identificatie

M.b.v. AFLP analyses van honderden *P. ramorum* isolaten is aangetoond dat er hoofdzakelijk twee genotypen voorkomen, een EU en een VS genotype. M.b.v. een puntmutatie in het Cox 1 gen werd een PCR-RFLP methode ontwikkeld om onderscheid tussen deze twee populaties te maken (Kroon *et al.*, 2004). Omdat mating type gekoppeld was aan het EU of VS genotype was dit tevens een onderscheid tussen A1 en A2 mating type isolaten. Slechts één Belgisch isolaat week af en vertoonde ondanks een EU genotype (PCR-RFLP) een A2 mating type in een kruisingsexperiment. Andere methodieken (ISSR en microsatellieten) leverden hetzelfde resultaat.

Om een op mating-type gebaseerde test te ontwikkelen, worden op basis van de sequentie van een Bac clone van *P. infestans*, waarop mating type gerelateerde genen worden vermoed, en de inmiddels bekende *P. ramorum* genoom sequentie, PCR primers ontwikkeld, die zowel in *P. infestans* als ook in *P. ramorum* een amplicon geven. Sequentie-analyse van deze amplicons zal moeten uitwijzen of verschil tussen het A1 en A2 mating type aangetoond kan worden.

Sequentie analyses van andere genen (β -tubiline, NADH, Cyt c-oxidase, Translatie elongatie factor α) zal worden uitgevoerd om additionele methodieken beschikbaar te maken om

1. isolaten uit de EU en USA populatie te onderscheiden en om
2. de mogelijkheden voor tracking en tracing van individuele isolaten te evalueren

3. Resultaten

Resistentie

De resultaten van de *in vitro* resistentietoetsen zijn weergegeven in Tabel 1. Met zowel het EU als het VS *P. ramorum* isolaat wordt grotendeels dezelfde volgorde voor resistentie van de cultivars verkregen. Hetzelfde is waar voor beide parameters (IE en LGR) waar de rangnummering op gebaseerd is. Voor de praktijk betekent dit dat de gebruikte methode betrouwbaar resistentieverschillen tussen cultivars in beeld brengt. Daarnaast is het resultaat grotendeels ongevoelig voor het gebruikte isolaat. Dit duidt op de afwezigheid van compatibiliteitsverschillen tussen de hier getoetste cultivars en isolaten. Er werden geen aanwijzingen gevonden dat schubben (lepidote versus elepidote rhododendrons) een rol spelen m.b.t. het niveau van resistentie.

Een interessante observatie werd gedaan op *R. ponticum* na natuurlijk infectie in Nijmegen. Één plant bleek niet ziek temidden van vele zieke soortgenoten. Deze specifieke *R. ponticum* 'Nijmegen' bleek tot de meest resistente cultivars te behoren terwijl *R. ponticum* algemeen als vatbaar te boek staat ().

Tabel 1. *Samenvatting van de resultaten van de resistentietoetsen op 10 Rhododendron cultivars. Uit een serie in vitro experimenten is de gemiddelde radiale lesiegroeisnelheid (LGR in mm/dag) en de gemiddelde infectie efficiëntie (IE, infectiekans per zoospore) berekend. Vervolgens zijn de cultivars gerangnummerd op LGR en IE voor beide P. ramorum isolaten afzonderlijk.*

Rhododendron Cultivar	Gemiddelde LGR		Gemiddelde IE		Rangnummer (LGR)		Rangnummer (IE)	
	P1577 (EU)	P1403 (VS)	P1577 (EU)	P1403 (VS)	P1577 (EU)	P1403 (VS)	P1577 (EU)	P1403 (VS)
Wilgens surprise	0.00	0.00	0.0000	0.0000	1	1	1	1
Impeditum (L ³)	nd	Nd	0.0003	0.0003	*	*	*2	*2
Cunninghams white (E ³)	0.30	0.23	0.0012	0.0023	2	3	2	4
Nova zembla (E)	0.32	0.22	0.0052	0.0022	3	2	7	3
Morgenrot	0.38	0.56	0.0015	0.0014	4	5	4	2
Wilgens ruby (E)	0.86	0.50	0.0015	0.0054	5	4	3	6
Dora amateis (L)	0.89	0.63	0.0017	0.0066	6	6	5	7
Roseum elegans	0.98	0.94	0.0039	0.0169	7	7	6	8
Catawbiense grandiflorum (E)	1.10	1.19	0.0082	0.0046	8	8	8	5
Ferrugineum (L)	nd	nd	1 ¹	1 ¹	*	*	*1	*1

¹: *Alle inoculaties geslaagd, de echte waarde voor van de IE is hoog (en hoger dan de IE van de andere cultivars in deze experimenten) maar kan volgens Swallow (1987) niet berekend worden omdat daarvoor een intermediair slagingspercentage nodig is. R. ferrugineum is het meest vatbare cultivar in de getoetste set cultivars.*

²: *Om de analogie met de resultaten m.b.t. rangnummering op LGR te behouden zijn de resultaten m.b.t. IE R. impeditum niet meegenomen in deze rangnummering. Als dat wel gedaan zou zijn zou dit cultivar na Wilgens surprise het 2^e meest resistente cultivar zijn.*

³: *Cultivar behoort tot de Lepidote (L) dan wel Elepidote (E) Rhododendrons.*

nd : *Blaadjes van dit cultivar zijn te klein om lesiegroeisnelheid te bepalen.*



Figuur 3. Lesievorming na druppelinoculatie op R. catawbiense en R. ponticum (Nijmegen). Foto's links en rechts geven de boven en onderkant van dezelfde bladeren weer. Het onderste blad is R. ponticum, het bovenste blad R. catawbiense. Lesies groeien niet of nauwelijks op deze R. ponticum (Nijmegen).

Verspreiding

Algemeen

Onderzoek in het verenigd Koninkrijk (DEFRA 2004) heeft geen sporenverspreiding via de lucht aan kunnen tonen tijdens monitoring van uitbraken in kwekerijen in het zuiden van Engeland. In regenwater werd slechts op 1 lokatie gedurende de maanden Maart- April consistent *P. ramorum* in regenwater aangetroffen. Regenwater verzameld op andere lokaties was consequent negatief voor *P. ramorum*. Als vectoren bleken alleen gewervelden efficiënte verspreiders van *P. ramorum*. Verspreiding via insecten werd niet aangetoond. Overdracht via snoeigereedschap werd wel aangetoond maar infecties als gevolg van deze overdracht werden niet gevonden.

Bedrijfsbezoeken

Analyse en observatie van geïnfecteerd materiaal van bedrijf 3 in de quarantaine kas van PPO in Lisse. Opvallend was dat de aangetroffen infectie in het *Viburnum* blok verspreid redelijk leek voor tekomen. In april 2005 zijn 38 overgebleven *Viburnum* planten die ter observatie in de quarantaine kas in Lisse stonden na uitlopen beoordeeld op symptomen van *P. ramorum* aantasting. Planten zijn beoordeeld op groene of dode blaadjes, aanwezigheid van verdroogde bloemen, *P. ramorum* aantasting en *Fusarium* aantasting. Bij aantasting door *P. ramorum* was de buitenkant van de lage stam bruin verkleurd. Meestal liepen deze symptomen door tot hoog in de stam. Bij een enkele plant bleef de aantasting lokaal. De stam was vaak erg verdroogd en deze planten hadden weinig wortels. 24 *Viburnum* planten liepen niet meer uit. 9 planten vertoonden verdroogde bloemen, 14 planten een verdroogde stam. Op basis van symptomen werden 26 planten positief bevonden voor *P. ramorum*, 10 planten waren positief voor *Fusarium*. *P. ramorum* en *Fusarium* aantasting in 9 gevallen beide aangetroffen op dezelfde plant.

Analyse van blad- en watermonsters afkomstig van bedrijf 3 bij PRI.

Bladmonsters van planten gelegen aan de andere kant van het pad tegenover het geïnfecteerde *Viburnum* blok en de *Rhaphiolepis* gelegen naast het *Viburnum* blok (Figuur 2) zijn samen met watermonsters uit sloot en put geanalyseerd op aanwezigheid van *P. ramorum* m.b.v. Taqman PCR. Bladmateriaal is na binnenkomst afgespoeld, geïncubeerd en na incubatie zijn symptomatische bladeren nogmaals afgespoeld. Spoelmonsters zijn evenals de watermonsters uit sloot en put geconcentreerd op millipore filters waarop na DNA extractie de PCR is uitgevoerd.

In totaal zijn 110 monsters geanalyseerd waaronder 1 watermonster uit de sloot, 1 watermonster uit de put, 14 *Hibiscus* bladmonster, 14 *Hydrangea* bladmonsters, 23 *Photinia* bladmonsters, 16 *Sering* bladmonsters, 26 bladmonster van *Viburnum* en 12 bladmonsters van *Rhaphiolepis* afkomstig uit een blok naast het grote *Viburnum* blok (Figuur 2).

Het putwater werd 5x getest. Twee van de vijf bepalingen waren marginaal positief, 3 negatief. Slootwater werd 6x getest en altijd negatief bevonden. Spoelwater van bladmonsters werd in alle gevallen 2x getest, soms 3x. Een monster werd positief beoordeeld als het 2 keer of meer duidelijk positief uit de test naar voren kwam. In totaal werden 6 positieve bladmonsters gevonden: 1 Hibiscus bladmonster, 2 Hydrangea bladmonsters, 2 Photinia bladmonsters en 1 bladmonster van Viburnum. Het betrof hier zonder uitzondering symptoomloos, gezond ogend bladmateriaal.

Bladmateriaal wat na incubatie, volgend op de eerste keer afspoelen, symptomen vertoonde is nogmaals afgespoeld waarna het spoelwater aan PCR analyse onderworpen is. Deze spoelmonsters waren in alle gevallen negatief voor *P. ramorum*.

Symptoomontwikkeling

Latente periode

De latente periode, gedefinieerd als de tijd van inoculatie tot symptoomontwikkeling, in de lab experimenten bedroeg gemiddeld 4 – 5 dagen zoals geïllustreerd met data uit het lesiegroeisnelheids experiment bij 20 °C (Tabel 2). Van cultivar – of isolaat effecten lijkt in dit experiment geen sprake.

Tabel 2. Gemiddelde latente periode bij 20 °C op 7 *Rhododendron* cultivars in een laboratorium experiment op afgesneden blad met druppelinoculatie.

Temp (°C)	Cultivar	<i>P. ramorum</i> isolate	
		P1403 (VS)	P1577 (EU)
20	Cunningham's white	4.0	4.0
	Dora Amateis	4.0	4.0
	Morgenrot	4.0	4.0
	Nijmegen	4.0	4.0
	Roseum Elegans	4.3	4.0
	Wilgen Surprise	* ¹	5.0
	Wilgen's Ruby	*	*

¹ Geen symptoomontwikkeling

Desondanks worden in praktijk situaties met enige regelmaat partijen plantmateriaal ontdekt die na transport symptomen vertonen van infectie door *P. ramorum* ondanks het feit dat ze bij vertrek vrij waren van aantasting. Dit fenomeen heeft naar alle waarschijnlijkheid een complexe achtergrond waarover onderzoek slechts moeizaam en zeer beperkt gegevens beschikbaar heeft verkregen. Factoren die een rol kunnen spelen zijn o.a.:

1. Vertraging van symptoomontwikkeling door lage temperaturen (verlenging van de latente periode), de lengte van de latente periode is temperatuursafhankelijk (DEFRA 2004) waarbij toenemende temperaturen (0 °C – 25 °C) resulteren in kortere latente periodes. Bij 0 °C werd een latente periode van ongeveer 12 dagen gemeten, bij 25 °C was dit ongeveer 2 dagen. In het algemeen bleken 25 – 50 graad-dagen nodig voor symptoomontwikkeling na inoculatie (DEFRA 2004).
2. het latent (niet zichtbaar) of slapend ('quiescent') aanwezig zijn van infecties die na een stress periode voor de plant de kans krijgen tot symptoomontwikkeling te komen. Onderzoek in het Verenigd Koninkrijk heeft echter geen aanwijzingen opgeleverd voor vertraging van symptoomontwikkeling onder praktijkomstandigheden.
3. besmetting van de plant met propagules van het pathogeen (mycelium, sporangia, zoosporen, of chlamydosporen) die tijdens of kort na transport de mogelijkheid krijgen te infecteren en symptomen te ontwikkelen. Garbelotto *et al.*, (2003) vonden dat *P. ramorum* een bladnatperiode van 9 – 12 uur nodig heeft voor infectie bij 18 – 22 °C op laurier (*U. californica*). Voor infectie van Rhododendronblad bleken huidmondjes niet noodzakelijk (Lewis & Parke, 2005). Infectie van wortels is eveneens aangetoond voor Rhododendron (Lewis & Parke, 2005).

Van sommige fungiciden is bekend dat ze symptoomontwikkeling kunnen onderdrukken. Turner *et al.*, (2005) hebben dit aangetoond voor Metalaxyl-M, azoxystrobin en fenamidone/mancozeb.

Detectie van symptoomloze/ slapende infecties is zeer moeilijk omdat het vaak gaat om een kleine, zeer lokale aanwezigheid van het pathogeen. Bemonsteringstechnieken schieten te kort om dit type infecties betrouwbaar op te sporen.

Lesiegroeisnelheid

Voor reïnculturen op agar is aangetoond dat *P. ramorum* een groei optimum heeft bij 20 °C (Werres *et al.*, 2001).

Voor 1 VS isolaat is aangetoond dat het groei optimum op 25 °C lag. Bij lage temperaturen (-1 °C – 0 °C) werd nog steeds groei gemeten tot maximaal 1/10 van de groeisnelheid van de optimumtemperatuur.

De resultaten van de experimenten naar het effect van temperatuur op de lesiegroeisnelheid (symptoomontwikkeling) zijn weergegeven in Tabel 3. Uit de resultaten blijkt dat *P. ramorum* bladplekken groeien onder alle getoetste, praktijkrelevante, temperaturen (5 – 25 °C). De optimum temperatuur lijkt, in overeenstemming met gepubliceerde resultaten, te liggen rond 20 °C. Lesiegroei op de meeste getoetste cultivars reageert soortgelijk op de toegepaste temperatuursrange ofschoon Cunningham's white een hoger temperatuuroptimum lijkt te hebben voor lesiegroei.

Tabel 3. De invloed van temperatuur op lesuitbreiding (uitgedrukt als de radiale lesiegroeisnelheid, LGR, in mm/dag) voor zeven *Rhododendron* cultivars en 5 temperaturen.

Gemiddelde LGR (mm/dag)	<i>P. ramorum</i> Isolaat	Temperatuur (°C)				
		5	10	15	20	25
Cultivar						
Cunningham's white	P1403 (VS)	0.31	0.28	0.97	0.93	1.65
	P1577 (EU)	0.10	0.19	0.13	0.07	1.51
Dora amateis	P1403 (VS)	0.09	0.17	0.21	0.34	0.32
	P1577 (EU)	0.08	0.23	0.36	0.18	0.12
Morgenrot	P1403 (VS)	0.03	0.16	0.12	0.13	0.00
	P1577 (EU)	0.13	0.10	0.24	0.26	0.00
Ponticum 'Nijmegen'	P1403 (VS)	0.10	0.13	0.36	0.04	0.01
	P1577 (EU)	0.06	0.20	0.03	0.03	0.01
Roseum elegans	P1403 (VS)	0.09	0.34	0.46	0.52	0.01
	P1577 (EU)	0.10	0.27	0.57	0.80	0.04
Wilgen surprise	P1403 (VS)	0.25	* ¹	*	*	1.27
	P1577 (EU)	*	*	0.01	0.10	0.00
Wilgen's ruby	P1403 (VS)	0.08	0.15	0.06	*	*
	P1577 (EU)	0.20	0.22	0.08	*	*

¹ Geen symptoomontwikkeling

Sporulatie

Onderzoek naar sporulatie wordt uitgevoerd in het kader van het EU project RAPRA en is als zodanig nog niet afgerond. Voorlopige en gepubliceerde resultaten laten zien dat sporulatie en sporenproductie (kwantitatief) voornamelijk waardplantafhankelijk is. In de literatuur wordt onderscheid gemaakt tussen sporulatiewaarden (o.a. *Rhododendron*, *Syringa vulgaris*, *Umbellularia californica*, *Pieris japonica*, *Camellia japonica* en *Rosa canina*) en niet sporulatiewaarden. Ofschoon lesiegrootte niet gekoppeld bleek met sporenproductie werden op Sering de grootste lesie en de meeste sporen gevormd.

In Amerikaans onderzoek is gevonden dat sporulatie pas op gang komt na herhaalde regenbuien tijdens het Californische regenseizoen. Geïsoleerde regenbuien tijdens de Californische zomer resulteerden niet in sporenvorming op *U. californica* (Davidson *et al.*, 2005).

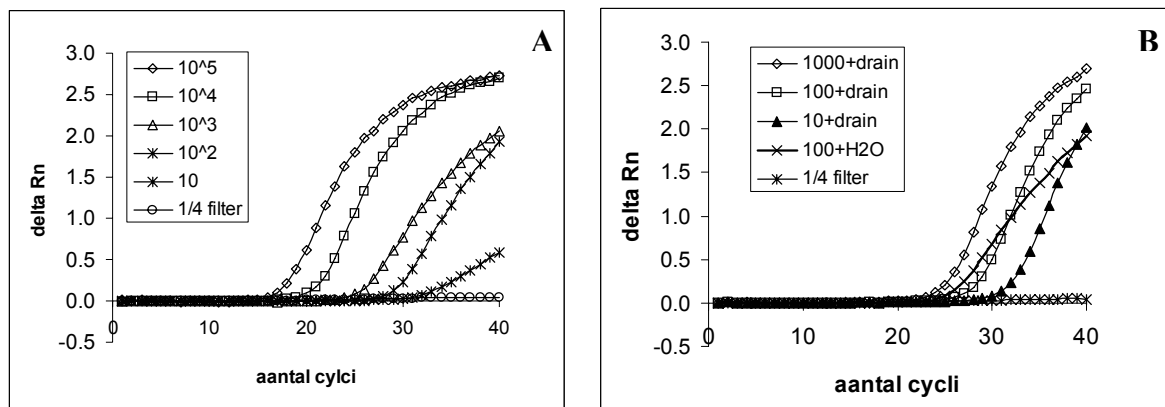
Chlamydosporenproductie leek ook waardplantafhankelijk met uitbundige productie op Sering en Umbellaria californica en in mindere mate op Viburnum en Rhododendron.

Detectie

DNA extractie en specifieke detectie *P. ramorum*

DNA extractiemethoden zijn geoptimaliseerd voor gebruik met *P. ramorum* verdacht materiaal. Protocollen voor DNA extractie uit plantmateriaal en vanaf 0.22 μm millipore filters zijn beschikbaar en gebruikt voor het in dit rapport beschreven onderzoek.

In ziek plantmateriaal kan *P. ramorum* eenduidig en specifiek worden aangetoond m.b.v. een specifieke (Taqman) PCR (Hayden *et al.*, 2004). Watermonsters (monsters uit sloot, put, drains, .. etc. of spoelmonsters van verdacht geïnfecteerd plantmateriaal) worden gefiltreerd over een 0.22 μm millipore filter. Micro-organismen en organische componenten blijven achter op het filter. Na DNA extractie op het filter kan m.b.v. een Taqman PCR *P. ramorum* in deze monsters kwantitatief worden aangetoond. De detectiegrens werd bepaald op 1 zoosporangium of 5 zoosporen per filter of deel daarvan. Een illustratie van het kwantitatief detecteren van *P. ramorum* in kraanwater en drainwater is gegeven in Figuur 4 waar *P. ramorum* aangetoond wordt in een verdunningsreeks van een sporensuspensie in kraanwater (zoosporen) en drainwater (zoosporangia). Des te meer *P. ramorum* DNA in het monster aanwezig is des te eerder zal de curve gaan stijgen zoals duidelijk te zien is in Figuur 4A. Dat *P. ramorum* ook zeer gevoelig in (potentieel vervuild) drain water aangetoond kan worden is geïllustreerd in Figuur 4B en vergeleken met detectie in kraanwater (100 + H₂O).



Figuur 4. Kwantitatieve detectie van *P. ramorum* in water. Detectie van een verdunningsreeks *P. ramorum* zoosporen in kraanwater (A) en zoosporangia in drainwater (B).

Identificatie

Zoals gezegd was het bij de start van dit project reeds mogelijk m.b.v. een puntmutatie in het Cox 1 gen middels PCR-RFLP onderscheid te maken tussen de twee populaties (EU & VS) te maken (Kroon *et al.*, 2004). Één Belgisch isolaat week af en vertoonde ondanks een EU genotype (PCR-RFLP) een A2 mating type. Daarnaast is inmiddels het EU genotype enkele keren in de VS aangetroffen en is er sprake van een mogelijk 3^e genotype met isolaat WA 692 gevonden in de VS. Inmiddels zijn diverse methoden (AFLP (Ivors *et al.*, 2004), ISSR, PCR-RFLP, SSR) beschikbaar gekomen om onderscheid te maken tussen de EU en de VS populatie van *P. ramorum*.

Met behulp van microsatelieten (SSR's) zijn daarnaast 7 verschillende EU genotypen en 4 verschillende VS genotypen geïdentificeerd. In het algemeen blijft echter de genotypische - en fenotypische variatie binnen - en tussen de populaties naar alle waarschijnlijkheid te klein om tracking en tracing mogelijk te maken.

Pogingen om een op mating-type gebaseerde test te ontwikkelen op basis van de sequentie van een Bac clone van *P. infestans* waarop mating type gerelateerde genen worden vermoed en de inmiddels bekende *P. ramorum* genoom sequentie waren niet succesvol. De ontwikkelde PCR primers gaven zowel in *P. infestans* als ook in *P. ramorum* een amplicon maar na sequentie-analyse van deze amplicons bleek geen correlatie met mating type.

4. Conclusies en Discussie

Resistentie

Doel van het onderzoek naar resistentie binnen het voor de handel belangrijkste Nederlandse boomkwekerijsortiment was het opsporen van gewassen en cultivars met een relatief hoge resistentie tegen *P. ramorum* (EU en VS populatie). Door gewaskeuze te koppelen aan resistentieniveau kan de sector preventief inspelen op verdere verspreiding van (kruisingen van) Europese en Amerikaanse populaties. In overleg met de begeleidingscommissie is het te toetsen assortiment versmald tot de Rhododendron cultivars zoals vermeld in dit verslag. Omdat Rhododendron algemeen als vatbaar te boek staat is als toetsmethode gekozen het partieel resistentieniveau van de Rhododendron cultivars te bepalen middels twee parameters: de infectie-efficiëntie (IE) als maat voor infectieresistentie en de lesiegroeisnelheid (LGR) als maat voor symptoomontwikkeling en uitbreiding van aantasting. Voor praktische doeleinden (voorkomen van aantasting) is slechts de infectieresistentie, uitgedrukt als IE, van belang. Gewassen/cultivars met een hoge infectieresistentie (lage IE) hebben een kleinere kans geïnfecteerd te worden.

Binnen het assortiment Rhododendron cultivars bleken grote verschillen in gevoeligheid voor *P. ramorum* infectie en symptoomontwikkeling/uitbreiding van symptomen. Binnen het getoetste assortiment bleken met name R. Wilgens surprise en R. impeditum resistentier dan de andere Rhododendron cultivars. Cunninghams white, Nova zembra, Morgenrot, Wilgens ruby, Dora amateis, Roseum elegans, Catawbiense grandiflorum, Ferrugineum zijn in toenemende mate vatbaar voor *P. ramorum* waarbij de laatste twee als zeer vatbaar moeten worden gezien. Er werden geen aanwijzingen gevonden voor een functionele rol van schubben (lepidote versus elepidote rhododendrons) of indumentum op het resistentieniveau. In de omgeving van Nijmegen werd een interessante waarneming gedaan waar 1 plant R. ponticum niet ziek bleek te midden van vele zieke soortgenoten. Deze R. ponticum 'Nijmegen' bleek ook in laboratorium toetsen hoog resistent wat duidt op aanmerkelijke genetische variatie voor *P. ramorum* resistentie binnen deze soort.

Als beheersingsstrategie voor *P. ramorum* verdient het aanbeveling zoveel mogelijk hoog resistente cultivars op te nemen in het assortiment. Vatbare en zeer vatbare cultivars kunnen beter vermeden worden. Voor toekomstige doeleinden is met de binnen dit project geoptimaliseerde toetsmethode een snelle en betrouwbare toets beschikbaar gekomen om partiele resistentie tegen *P. ramorum* te kwantificeren.

Concluderend kan gesteld worden dat binnen het genus Rhododendron voldoende genetische variatie voor partiële resistentie tegen *P. ramorum* beschikbaar is om resistentie perspectiefvol in de huidige praktijk en tijdens cultivar ontwikkeling in te zetten.

Detectie

Tijdens de looptijd van dit project zijn protocollen om DNA te isoleren uit plantmateriaal en vanaf millipore filters t.b.v. detectie in (spoel)watermonsters geoptimaliseerd en beschikbaar gemaakt. Daarnaast is het nu mogelijk *P. ramorum* specifiek aan te tonen in plantmateriaal m.b.v. ITS-PCR of Taqman PCR. Indien gewenst kan *P. ramorum* kwantitatief aangetoond worden in b.v. watermonsters m.b.v. Taqman PCR.

Mobiele detectie van *P. ramorum* m.b.v. taqman PCR is daarmee mogelijk geworden. Tijdens een bijeenkomst van de begeleidingscommissie voorjaar 2005 is echter besloten dit traject niet in te zetten omdat te specialistische kennis nodig is om op een verantwoorde manier plantmateriaal op de werkvloer door te toetsen op *P. ramorum* m.b.v. Taqman PCR.

Op het gebied van identificatie was bij de start van dit project 1 methode beschikbaar om *P. ramorum* EU isolaten te onderscheiden van VS isolaten (Kroon *et al.*, 2004). Tijdens de looptijd van dit project zijn diverse methoden beschikbaar gekomen die dit onderscheid ook kunnen maken (AFLP, ISSR, PCR-RFLP, SSR) en is het mogelijk geworden m.b.v. microsatelieten (SSR's) 7 verschillende EU genotypen en 4 verschillende VS genotypen te onderscheiden. Ondanks deze nieuwe mogelijkheden lijkt de genotypische - en fenotypische variatie binnen - en tussen de populaties echter te klein om 'tracking en tracing' mogelijk te maken.

Pogingen om een directe op mating-type gebaseerde test te ontwikkelen op basis van de sequentie van een Bac clone van *P. infestans* bleken helaas niet succesvol.

Verspreiding

Doelstelling van het werk aan verspreiding van *P. ramorum* onder praktijkomstandigheden was maatregelen ter voorkoming van verspreiding te onderbouwen. Daarnaast zou de effectiviteit van bestaande fungiciden tegen verspreiding van *P. ramorum* getoetst worden.

Eind 2004 werden blad en plantmonsters genomen bij een Viburnum kwekerij met *P. ramorum* problemen. Zieke en gezonde planten uit hun directe omgeving werden vervoerd naar de quarantaine kas in Lisse voor verdere observatie. Na de winter bleken, voor zover niet dood, zowel de zieke als de destijds 'gezonde' planten voor het overgrote deel aangetast door *P. ramorum*. Visueel gezonde planten uit 2004 vertoonden dus in het voorjaar van 2005 vrijwel allemaal symptomen van *P. ramorum* aantasting. Dit duidt op besmetting/infectie tijdens de herfst aangezien de planten kort na transport naar Lisse hun blad verloren en in 2004 verder symptoomloos bleven. Opvallend was daarnaast dat nieuwe scheuten in het voorjaar van 2005 opvallend vaak ziek waren wat duidt op systemische infectie van de plant na de winter. Alle planten waren afkomstig uit de 2m zones rondom de geïnfecteerde planten en zouden dus als zodanig afgevoerd en vernietigd zijn.

Overall kwam de aantasting in deze kwekerij redelijk verspreid voor binnen het grote Viburnum blok. Mogelijk werd dit veroorzaakt door een infectie eerder in de tijd in het blok waar de planten vandaan kwamen of door een infectie van algemener aard (b.v. vanuit een wat grotere verder af gelegen bron) in het huidige blok.

Na afspoelen van de bladmonsters werden enkele van deze spoelmonsters, afkomstig van bladmateriaal uit de kleinere plantblokken gelegen aan de overkant van het pad, positief voor *P. ramorum* bevonden. De praktische betekenis van de positieve bladmonsters uit de kleinere plantblokken gelegen aan de overkant van het pad is zeer waarschijnlijk beperkt en eerder een illustratie van de gevoeligheid van de detectiemethode. Omdat geen enkel bladmonster na incubatie onder optimale (lab) omstandigheden voor infectie positief teste voor *P. ramorum* is het zeer onwaarschijnlijk dat deze aanwezigheid geleid zou hebben tot infectie in de kleine plantblokken van de kwekerij. Daarnaast geeft de gebruikte PCR test geen uitsluitsel over aanwezigheid van dode of levende *P. ramorum*. Op de keper beschouwd toont deze PCR test aanwezigheid van *P. ramorum* DNA aan zonder dat daaraan eigenschappen als levend of dood gekoppeld mogen worden.

Aanwezigheid van *P. ramorum* buiten het grote Viburnum blok zou kunnen duiden op de eerder genoemde influx van sporen in de kwekerij van algemener aard of op secundaire verspreiding afkomstig uit het grote Viburnum blok. Aangezien transport van *P. ramorum* sporen over grote afstanden (>30cm) niet aangetoond is (Tjosvold *et al.*, 2004), is transport van inoculum, afkomstig uit het grote Viburnumblok, door teelthandelingen is de meest waarschijnlijke oorzaak van *P. ramorum* aanwezigheid in de kleine plantblokken aangezien transport van sporen door de lucht nooit is aangetoond en de route via drain- en beregeningswater niet waarschijnlijk lijkt omdat de put evenals de sloot als negatief voor *P. ramorum* moet worden beschouwd.

Door een 'dramatische' terugloop van het aantal gemelde *P. ramorum* infecties in kwekerijen in 2004 en 2005 t.o.v. 2002 en 2003 zijn de doelstellingen van dit onderdeel slechts ten dele gerealiseerd. Resultaten en conclusies zijn daarbij gebaseerd op slechts 1 uitbraak in een kwekerij eind 2004.

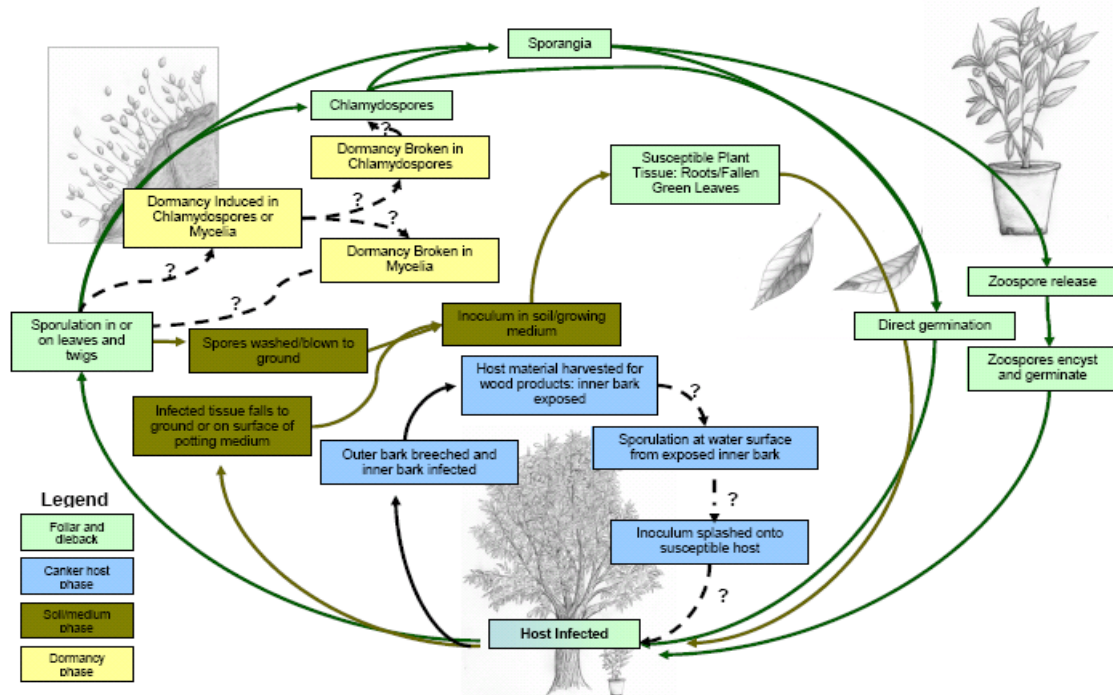
Na discussie in de begeleidingscommissie is besloten om niet aan fungicide effectiviteit tegen *P. ramorum* te gaan werken. Rede hiervoor was dat *P. ramorum* in kwekerijen nog steeds een quarantaine probleem is en blijft. Het doorzoeken van fungiciden op werkzaamheid tegen *P. ramorum* zou een verkeerd signaal geven naar de sector omdat het inzetten van fungiciden tegen dit pathogeen niet aan de orde is. Fungiciden worden zelfs geassocieerd met stimulering/verlenging van latentie of onderdrukking van symptoomontwikkeling wat het probleem voor de handel slechts verergerd. In internationaal verband is wel gewerkt aan de effectiviteit van diverse fungiciden tegen *P. ramorum*. De werkzaamheid was vaak niet optimaal indien curatief toegepast en zoals reeds vermeld werd fungicidegebruik geassocieerd met ongewenste onderdrukking van symptoomontwikkeling. Mochten er in de toekomst fungiciden toegelaten worden voor beheersing van *P. ramorum* dan zal dit uitsluitend inpasbaar zijn in een preventieve bestrijdingsstrategie (spuiten om infectie te voorkomen).

5. Referenties

- Cave, G.L., B. Randall-Schadell, & S.C. Redlin, 2005
 Rev. 1. Risk Analysis for *Phytophthora ramorum* Werres, de Cock & In 't Veld, Causal agent of Phytophthora canker (sudden oak death), ramorum leaf blight and ramorum die back. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine. Center for plant health science and technology, plant epidemiology and risk analysis laboratory, Raleigh, NC, USA.
- Davidson, J.M., A.C. Wickland, H.A. Patterson, K.R. Falk, & D.M. Rizzo, 2005.
 Transmission of *Phytophthora ramorum* in mixed-evergreen forests in California. *Phytopathology* 95:587-596.
 DEFRA, 2004.
Phytophthora ramorum epidemiology: sporulation potential, dispersal, infection, latency and survival. Final Project Report PH0194, Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA), United Kingdom.
 Retrieved from
http://www.defra.gov.uk/science/project_data/DocumentLibrary/PH0194/PH0194_2004_FRP.pdf
- Garbelotto, M., 2003.
 Providing a solution composting as a control for sudden oak death disease. *Biocycle* 44: 53-56.
- Hayden, K.J., D. Rizzo, J. Tse, & M. Garbelotto, 2004.
 Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California forests using a real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 94: 1075-1083
- Ivors, K.L., K.J. Hayden, P.J.M. Bonants, D.M. Rizzo, & M. Garbelotto, 2004.
 AFLP and phylogenetic analyses of North American and European populations of *Phytophthora ramorum*. *Mycological Research* 108: 378-392.
- Kroon, L.P.N.M., E.C.P. Verstappen, L.F.F. Kox, W.G. Flier & P.J.M. Bonants, 2004.
 A rapid diagnostic test to distinguish between American and European populations of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* 94: 613-620.
- Lewis, C.D., & J.L. Parke. 2005.
 Pathways for infection for *Phytophthora ramorum* [abstract], p. 68.in Sudden Oak Death Second Science Symposium The State of our Knowledge. January 18-21, 2005, Monterey, California.
- Swallow, W.H., 1987.
 Relative mean squared error and cost considerations in choosing group size for group testing to estimate infection rates and probabilities of disease transmission. *Phytopathology* 77: 1376 – 1381.
- Tjosvold, S.A., D.L. Chambers, S. Koike, & E. Fitchner, 2004.
 Epidemiology of *Phytophthora ramorum* infecting Rhododendrons under simulated nursery conditions. Book of abstracts Sudden Oak Death Symposium, 'The State of Our Knowledge' January 18-21 2004, Monterey, California. Pg. 80.
- Turner, J., P. Jennings, S. McDonough, D. Liddell & J. Stonehouse, 2005.
 Chemical control of *Phytophthora ramorum* causing foliar disease in hardy nursery stock in the UK. [abstract], p. 56 in Sudden Oak Death Second Science Symposium The State of our Knowledge. January 18-21, 2005, Monterey, California.
- Werres, S., R. Marwitz, W.A. Man In 'T Veld, A.W.A.M. De Cock, P.J.M. Bonants, M. De Weerd, K. Themann, E. Ilieva & R.P. Baayen, 2001.
Phytophthora ramorum sp. nov., a new pathogen on Rhododendron and Viburnum. *Mycological Research* 105: 1155-1165.

Bijlage I.

Levenscyclus van *P. ramorum*



Levenscyclus van *P. ramorum* zoals weergegeven in Cave, G.L., Randall-Schadell & Redlin, 2005.

Bijlage II.

Waardplantlijst Rhododendron t.b.v. resistentietoetsen met onderscheid naar morfologische kenmerken

MORFOLOGISCHE KENMERKEN RHODODENDRON SPECIES EN CULTIVARS

Lepidote: geschubd, de bladeren, bladstelen en schors van de takjes zijn bezet met schubben.

Elepidote: ongeschubd.

Indumentum: een meer of minder dikke viltige beharing doorgaans aan de onderzijde van de bladeren.

R. yakushianum (Elepidote)

Serie ponticum subserie caucasicum

Bladeren 5 – 7cm lang. Jonge bladeren volledig behaard. Aan het einde van het groeiseizoen is de boven zijde glanzend groen. Aan de onderzijde blijft het indumentum aanwezig

R. wardii (Elepidote)

Thomsonii serie subserie soulei

Bladeren 5 – 10cm lang rond-elliptisch, onbehaard. Bovenzijde glanzend groen (soms blauwgroen), onderzijde blauwgroen.

R. ponticum (Elepidote)

Serie ponticum subserie ponticum

Bladeren 10 – 15cm lang afgeronde top, glanzende donkergroen, onbehaard

R. maximum (Elepidote)

Serie ponticum subserie ponticum

Grove leerachtige bladeren 10 – 30cm lang en 4 – 7cm breed. Bovenzijde glad en donkergroen. Aan de onderzijde een dunne bescherm laag, lijkt op een indumentum, lichtgroen

R. campylocarpum (Elepidote)

Serie Thomsonii subserie campylocarpum

Bladeren rond tot elliptisch, leerachtig, 5 – 8cm lang en 3 – 5cm breed. Bovenzijde donkergroen, ondrekant blauwgroen. De epidermis heeft wasachtige papillen met minuscule klein bruine haren

R. ferrugineum (Lepidote)

Serie Ferrugineum

Bladeren omgekeerd eivormig en zijn 2 – 4,5cm groot en 1 -1,5cm breed. De bladeren zijn rondom geschubd. De schubben zijn roodbruin van kleur.

R. williamsianum (Elepidote)

Serie Thomsonii subserie soulei

Bladeren leerachtig, breed elliptisch tot eirond, 1,5 – 4cm lang en 1,5 – 3cm breed, aan de basis hartvormig. De bovenzijde is groen, de onderzijde blauwgroen waarop papillen zitten met glimmend kleine haren.

R. niveum

Serie Arboreum subserie arboreum

Bladeren leerachtig ovaal tot lancetvormig, 8 – 15cm lang en 3,5 – 5,5cm breed. De bovenzijde is ruw behaard en de onderkant heeft een dun indumentium van grijsgroen tot grijsbruin

R. facetum

Bladeren leerachtig lang elliptisch, 12 – 20cm en 4 – 7cm breed, matgroen. Het jonge blad heeft een witachtig laagje haren. Naarmate de bladeren volwassen worden is dit verdwenen. De onderzijde is lichtgroen en strek geribbeld

R. hippopheoides (Lepidote)

Serie Lapponicum

Bladeren smal, 3cm lang en 0,25cm breed. De bladeren zijn volledig bedekt met schubharen die elkaar overlappen. Deze zijn grijsgroen van kleur

R. impeditum (Lepidote)

Serie Lapponicum

Bladeren elliptisch en 1,5cm lang en 0,25cm breed; veel schubharen blauwgrijs

R. augustinii (Lepidote)

Serie Triflorum subserie augustinii

Bladeren lancetvormig, bladpunt gespitst; lengte 4,5 – 9cm, breedte 1,5cm. Bladschubben zijn aanwezig. In de loop van het seizoen zijn de schubben aan de bovenkant verdwenen.

R. 'Wigens Ruby' (Elepidote)

Arboreum groep

Grote bladeren, ovaal tot lang ovaal; mat donkergroen, onderzijde lichtgroen

R. 'Catawbiense Grandiflorum' (Elepidote)

Catawbiensegroep

Bladeren leerachtig en glanzend donkergroen; enigszins bol van vorm en volkomen onbehaard

R. 'Nova Zembla' (Elepidote)

Catawbiensegroep

Bladeren leerachtig en glanzend donkergroen; enigszins bol van vorm en volkomen onbehaard

R. 'Cunninghams White' (Elepidote)

Caucasicumgroep

Grote dofgroene bladeren; 12 – 17cm lang en 5 – 6cm breed

R. 'Dora Amateis' (Lepidote)

groep 24 R. dauricum en carolinianum

Bladeren donkerbruingrijsgroen en 5 – 7cm lang en 2,5cm breed ovaal tot elliptisch. De bladeren zijn bezet met schubben

R. 'Red Jack' (Uitgifte Proefstation) (R. 'Wigens Ruby x 'May Day') x repens hybride

Groep R. arboreum en hybriden

Bladeren donkergroen, elliptisch tot langwerpig; 10 – 12cm lang en 5 - 6cm breed. De onderzijde van het blad is kaal. Uitlopend schot en nieuw blad heeft een bruinachtige beharingtitel