

# Bloedingsziekte bij paardenkastanje: onderzoek naar de oorzaak en verspreiding

Alexander R. van Beuningen<sup>1</sup>, Jaap D. Janse<sup>2</sup>, Annelien Roenhorst<sup>1</sup> en Maria José Villalón-Robles<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen, tevens correspondentieadres: Drs. Alexander R. van Beuningen, e-mail: A.R.van.Beuningen@minlnv.nl

<sup>2</sup> Nederlandse Algemene Keuringsdienst, Postbus 1115, 8300 BC Emmeloord

<sup>3</sup> Seminis Holland BV, Postbus 97, 6700 AB Wageningen

## Inleiding

Bloedingsziekte bij paardenkastanje (*Aesculus hippocastanum*) wordt veroorzaakt door de bacterie *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Engels: bleeding canker of horse chestnut). De ernst en omvang is vergelijkbaar met bacterievuur bij appel/peer (*Erwinia amylovora*) en bacteriekanker bij hazelnoot (*Pseudomonas avellanae*). De ziekte komt vanaf 2002 voor in Nederland en werd sindsdien ook gemeld in België (2003) (Bultreys *et al.*, 2008), Noord-Frankrijk (2004), Duitsland (Schmidt *et al.*, 2008) en Engeland\*. De landelijke werkgroep Aesculaap, opgericht in 2004, deed in de afgelopen vijf jaar onderzoek naar de oorzaak en het verloop van de ziekte. Deze kennis is onmisbaar om de ziekte effectief te kunnen beheersen. Een weerslag van het onderzoek en de huidige stand van zaken is te vinden op de website van Aesculaap ([www.kastanjeziekte.wur.nl](http://www.kastanjeziekte.wur.nl)). Dit artikel geeft een overzicht van het onderzoek dat de Plantenziektenkundige Dienst (PD) heeft uitgevoerd sinds 2005, onder de koepel van Aesculaap in opdracht van het Ministerie van LNV. Het onderzoek richtte zich op de identiteit van de ziekteverwekker, verspreidingsmechanismen (epidemiologie) en onderzoek naar het voorkomen van resistentie.

\*Het betreft hier een toename van bloedingen bij kastanjabomen, symptomen die voor deze tijd werden toegeschreven aan *Phytophthora* sp.

## Symptomen en ziekteverloop

De bloedingsziekte bij paardenkastanje kenmerkt zich door bloedingen op de stam. Bloedingen bestaan uit stroperig suikerrijk boom-

sap dat in contact met de buitenlucht oxideert en bruinzwart van kleur wordt. Dieper in de bast (floëem) komen roestbruine tot zwarte necrotische plekken voor, die zich uitbreiden tot het houtweefsel. Het is niet bekend hoe lang de periode is tussen het begin van de ziekte met typische symptomen onder de bast en het moment waarop de uitwendige bloedingsverschijnselen ontstaan. Na verloop van tijd sterven grote delen van het floëemweefsel in de stam af en dat leidt tot verdroging (atrofie) van takken die hiermee in verbinding staan. Deze takken groeien langzamer, hebben kleinere bladeren, vertonen vroeger bladverlies (kenmerkend is de vroegtijdige vergeling van een deel van de boomkroon) en sterven uiteindelijk. Als de ziekte grote delen van de bast en cambium onherstelbaar heeft beschadigd, kunnen bastscheuren van ca. 5-20 cm ontstaan in de lengterichting van de stam. Hierdoor laat de bast los en komt het onderliggende weefsel bloot te liggen. Als dit rondom de stam gebeurt, sterft de boom af omdat hij als het ware wordt geringd. De kans hierop is het grootst bij jongere bomen (10-30 jaar) met een relatief geringe stamomtrek en dunne floëmlaag. Deze bomen kunnen binnen 3-5 jaar bezwijken terwijl oudere monumentale bomen een grotere kans hebben om te ziekte te overleven.

In 2007 werd vastgesteld dat de ziekte bij jonge bomen (<10 jaar) in één seizoen tot afsterving kan leiden. Aangetaste bomen blijken door het loslaten van de bast gevoeliger voor houtrot-schimmels, die mede oorzaak kunnen zijn van het afsterven van de boom (Figuur 1). In toenemende mate worden zieke en dode bomen uit veiligheidsoverwegingen gekapt.



Figuur 1. Vruchtlichamen van secundaire houtrot-schimmels bij *Aesculus hippocastanum* 'Baumannii' die kunnen leiden tot het afsterven van de boom.

### Frequentie van de bloedingsziekte

In 2005 en 2006 onderzocht de werkgroep Aesculaap in diverse gemeenten paardenkastanjes met symptomen van bloedingsziekte (Tabel 1). In 2006 was ongeveer veertig procent van het Nederlandse paardenkastanjes ziek, een stijging van zeven procentpunt t.o.v. 2005. Cijfers van gemeenten die in beide jaren inventariseerden lieten dezelfde stijging zien. Van de

periode na 2006 zijn alleen cijfers bekend van de provincie Noord-Holland die een eigen inventarisatie uitvoerde. Zij vond een aantasting van 52% in 2007. Dit is een toename ten opzichte van de percentages in 2005 en 2006, respectievelijk 32% en 48%. De omvang van de ziekte is sindsdien niet verminderd.

In de ons omringende landen is het aantal aangetaste bomen ook erg hoog. In Engeland werd in 2007 een landelijke inventarisatie uitgevoerd waarbij van een relatief kleine groep van 2.629 kastanjabomen ongeveer 49% aangetast bleek te zijn (<http://www.forestry.gov.uk/fr/INFD-6KYBGV>). In België is momenteel 61,5 % van de kastanjabomen ziek (meldpunt bloedingsziekte op <http://www.bomenbeterbeheren.be>). Van de landen Duitsland, Frankrijk waar de ziekte ook is gemeld, zijn geen cijfers bekend. Uit de inventarisaties komt verder naar voren dat de soorten *Aesculus pavia* (rode pavia) en *Aesculus flava* (gele pavia) weinig aangetast worden. *Aesculus hippocastanum* 'Baumannii' daarentegen is het vaakst aangetast.\*

**Tabel 1.** Landelijke gemeentelijke inventarisatie van het aantal aangetaste bomen per soort/cultivar. Hieraan namen in 2005 en 2006 respectievelijk 93 (totaal 44.919 bomen) en 115 gemeenten (48.562 bomen) deel.

Soort / cultivar	Aantal bomen	2005 (% ziek)	2006 (% ziek)
<i>Aesculus hippocastanum</i>	14735	31,3	38,4
<i>Aesculus hippocastanum</i> 'Baumannii'	14447	34,0	38,2
<i>Aesculus hippocastanum</i> 'Pyramidalis'	274	44,5	32,5
<i>Aesculus</i> x <i>Carnea</i> + <i>Aesculus hippocastanum</i>	4482	27,6	31,2
<i>Aesculus</i> x <i>Carnea</i> (soort)	3397	24,3	38,5
<i>Aesculus</i> x <i>Carnea</i> 'Briotii'	2636	25,1	25,6
<i>Aesculus</i> x <i>Carnea</i> 'Plantierensis'	163	13,2	36,8
<i>Aesculus pavia</i>	113	2,0	1,8
<i>Aesculus flava</i>	242	1,4	4,5
Onbekend	7448	29,3	45,9

Bron: Eindrapport onderzoeksprogramma 'Behoud de kastanje', Werkgroep Aesculaap, februari 2007.

\*Zowel van de Nederlandse, Engelse en Belgische inventarisatie op basis van visuele vaststelling is feitelijk onbekend welk aandeel van de bastkankers wordt veroorzaakt door de drie bekende kankerveroorzakende pathogenen: *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora citricola* en *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. De gedachte is dat het grootste deel kan worden toegeschreven aan *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*.

## De oorzaak van bloedingsziekte bij paardenkastanje

De landelijke werkgroep Aesculaap onderzoekt sinds 2005 de oorzaak, verspreiding en bestrijding/ beheersing van de bloedingsziekte bij paardenkastanje. Het isoleren van het pathogeen ging aanvankelijk lastig. In eerste instantie werd gedacht aan schimmels, oömyceten en virussen. Symptomen van bloedingsziekte worden vaak veroorzaakt door oömyceten (bijvoorbeeld de zgn. teervlekken op de stam van *Alnus* sp., veroorzaakt door *Phytophthora alni*) en gedacht werd dat de dramatische symptomen bij paardenkastanje verband hielden met *Phytophthora citricola* en *Phytophthora cactorum*. Vanaf de jaren '70 zijn deze soorten in het Verenigd Koninkrijk met regelmaat aangetroffen bij paardenkastanje en veroorzaakten vergelijkbare symptomen\* (Brasier, 1976) (Figuur 2). Isolaties uitgevoerd in samenwerking met de Duitse *Phytophthora*-deskundige Dr. T. Jung, waren echter allemaal negatief. Ook virussen bleken niet verantwoordelijk voor het ontstaan van de bloedingsziekte.

Hierna richtte de aandacht zich op bacteriën. Zowel de PD als Plant Research International (PRI) isoleerden een *Pseudomonas syringae*-achtige bacterie uit de bloedende bomen. Inoculatiestudies bevestigden dat deze *P. syringae*-isolaten de symptomen van bloedingsziekte konden veroorzaken na kunstmatige infectie van zaailingen en volwassen paardenkastanjabomen.



Figuur 2. Stambloedingen bij *Aesculus hippocastanum* veroorzaakt door *Phytophthora cactorum* (Leon, Spanje, juli 2007).

## Verwantschap van *P. syringae* uit paardenkastanje met andere *P. syringae*-pathovars

De *P. syringae*-pathovar van paardenkastanje vertoont sterke overeenkomst met *P. syringae* pv. *syringae*. Deze soort veroorzaakt twijgen- en bloesemsterfte bij o.a. forsythia, peer en sering en werd ook eerder bij kastanje aangetroffen als veroorzaker van bladvlekken. Er zijn enkele belangrijke biochemische verschillen tussen de *P. syringae*-pathovar van paardenkastanje en *P. syringae* pv. *syringae*. De paardenkastanjepathovar is negatief voor gelatine-hydrolyse, fluoresceert slechts zwak op King's medium B en is tolerant voor 5% NaCl.

De *P. syringae* groep bevat meer dan vijftig pathogene variëteiten (pathovars) waarvan een aantal boomziekten kunnen veroorzaken (Tabel 2). Van een aantal soorten is bekend dat zij kankers kunnen veroorzaken bij bomen, en met name *P. savastanoi*, verantwoordelijk voor bastwoekerziekte bij de gewone es (*Fraxinus excelsior*) geeft een sterk gelijkend ziektebeeld met bloedingsziekte bij paardenkastanje (Janse, 1981).

De PD heeft onderzoek gedaan naar de pathogeniteit van de verschillende *P. syringae*-pathovars voor 1-2 jaar oude zaailingen van witte paardenkastanje en 10-15 jaar oude bomen van *Aesculus hippocastanum* 'Baumannii'. De pathovars *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *viburni* en *P. syringae* pv. *aesculi* blijken zwak pathogeen te zijn voor kastanjezaailingen. Verder vertoonden de pathovars *P. syringae* pv. *aesculi*, *P. syringae* pv. *morsprunorm* en *P. syringae* pv. *ulmi* en *P. tremae* de grootste verwantschap met *P. syringae* pathovars van paardenkastanje in clustering van DNA-fingerprints van Box-PCR-fragmenten, DNA-DNA-hybridisatie, biochemische toetsen en vetzuuranalyse. Dit taxonomisch onderzoek werd uitgevoerd samen met Belgische collega's (Janse *et al.*, 2006). Later werd op basis van sequentiehomologie van het gyrase B-gen de pathovarnaam *aesculi* toegekend aan de isolaten uit paardenkastanje (Webber *et al.*, 2008). Dit is opmerkelijk omdat het *P. syringae* pv. *aesculi*-isolaat afkomstig uit India beschreven is als een pathogeen dat bladvlekken (maar geen bastkankers) geeft bij *Aesculus indica* (Durgapal & Singh, 1980). Overigens heeft men bij CSL/FERA (York, Engeland) ook met een isolaat van bloedingsziekte bladvlekken verkregen op paardenkastanje.

**Tabel 2.** Pathogene bacteriën voor houtige gewassen.

Pathoogeen	Gastheer	Voorkomend in Nederland
<i>Brenneria nigrifluence</i>	<i>Juglans regia</i>	
<i>Brenneria rubrifaciens</i>		
<i>Brenneria salicis</i>	<i>Salix</i> spp.	+
<i>Erwinia amylovora</i>	o.a. Rosaceae w.o. appel, meidoorn, vuurdoorn, peer	+
<i>Erwinia (Brenneria) quercina</i>	<i>Quercus</i> spp.	
<i>Pseudomonas avellanae</i>	<i>Corylus avellana</i> (hazelnoot)	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coryli</i>		
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i>		
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>fraxini</i>	<i>Fraxinus excelsior</i>	+
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	<i>Olea europaea</i>	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	<i>Aesculus</i> ssp.	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>avii</i>	<i>Prunus avium</i>	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>ciccaronei</i>	<i>Ceratonia siliqua</i>	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>erobotryae</i>	<i>Eriobotrya japonica</i>	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	<i>Morus alba</i>	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	<i>Prunus</i> spp.	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>persicae</i>	<i>Prunus persica</i>	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>ribicola</i>	<i>Ribes aureum</i>	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Vele waardplanten w.o. <i>Syringae vulgaris</i>	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>theae</i>	<i>Camellia sinensis</i>	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>ulmi</i>	<i>Ulmus</i> sp.	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>viburni</i>	<i>Viburnum</i> sp.	+
<i>Pseudomonas tremae</i>	<i>Trema orientalis</i>	
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	<i>Juglans regia</i>	+
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	perzik / pruim / nectarine	
<i>Xanthomonas populi</i>	<i>Populus</i> sp.	+

### Waardplantenspecificiteit van *P. syringae* pv. *aesculi*

Om te bepalen of ook andere boomsoorten aangetast zouden kunnen worden door *P. syringae* pv. *aesculi* zijn in 2006 in Nederland 72 verschillende bomen met bloedingsverschijnselen bemonsterd en onderzocht (Tabel 3) (Figuur 3). In geen van de gevallen konden de symptomen in verband worden gebracht met de *P. syringae*-bacterie of andere plantpathogene bacteriën (*Erwinia* sp., *Xanthomonas* sp.). In enkele gevallen werd wel een *Phytophthora*-soort geïsoleerd.

In aanvullende experimenten bleek het niet mogelijk om via staminoculatie algemene waardplanten van *P. syringae* zoals wilde kers (*Prunus* sp.) en moerbeï (*Morus alba*) te infecteren met de *P. syringae*-bacterie van paardenkastanje. Deze soort heeft dus een sterke waardplantenspecificiteit die zich beperkt tot *Aesculus* spp.

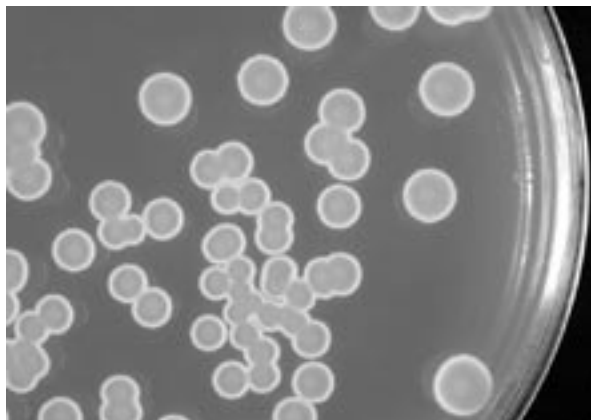
Infectieproeven zijn uitgevoerd met takken van verschillende soorten, cultivars en hybriden van paardenkastanje om de gevoeligheid voor de bloedingsziekte vast te stellen. De uitbreiding van bastnecrose na inoculatie met *P. syringae* pv. *aesculi* werd gevolgd. Cultivars van *A. hippocastanum*, 'Baumannii', 'Incisa', 'Memmingeri' en 'Pyramidalis', waren allemaal gevoelig voor de bacterie en vertoonden uitbreidingen van bastnecrose. Van de hybridensoorten *A. carnea* (rode paardenkastanje), *A. carnea* 'Plantierensis' en *A. mutabilis* was alleen de laatste niet (of tenminste minder) vatbaar. En van de soorten *A. flava* (gele pavia), *A. parviflora* (herfstpaardenkastanje), *A. pavia* (rode pavia) en *A. turbinata* (Japanse paardenkastanje) was alleen de laatste vatbaar voor *P. syringae* pv. *aesculi*. De eerste drie niet of tenminste minder.

**Tabel 3.** Overzicht van onderzochte bomen met bloedingverschijnselen in Nederland in 2006.

Soort	Aantal
<i>Acer sacharimum</i>	11
<i>Acer sp.</i>	3
<i>Alnus sp.</i>	1
<i>Betula sp.</i>	2
<i>Fagus sylvatica</i>	16
<i>Fraxinus excelsior</i>	4
<i>Metasequoia sp.</i>	2
<i>Platanus sp.</i>	2
<i>Prunus gondounii</i>	2
<i>Prunus sp.</i>	2
<i>Quercus robur</i>	14
<i>Quercus rubra</i>	9
<i>Tilia sp.</i>	3



Figuur 3. Stambloedingen bij *Acer* (Zeevolde, augustus 2008).



Figuur 4. Typische Levan<sup>+</sup> kolonies van de *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* gekweekt uit ontwikkelende vruchten van *Aesculus hippocastanum*.

### Isolatie en identificatie van *P. syringae* pv. *aesculi*

De huidige isolatie- en identificatiemethode is erg bewerkelijk. Extracten van kleine stukjes ziek bastweefsel of spoelmonsters van takjes, blad, bloemen en vruchten worden uitgeplaat op twee verschillende voedingsbodems, 5% sucrose agar en King's medium B. Op het eerste medium produceren de *P. syringae*-bacteriën veel slijm (extracellulair polysaccharide levan) en vormen herkenbare glanzende, bolle kolonies (Figuur 4) en op King's medium B scheidt de bacterie een diffunderend groen fluorescerend pigment af. Indien op de voedingsbodems typische kolonies worden waargenomen, worden deze geteld, reingekweekt, en vervolgens geanalyseerd met vetzuuranalyse. Kolonies met een hoge overeenkomst in vetzuursamenstelling met *P. syringae* identificeert men vervolgens verder met een genetische vingerafdruk-methode (fingerprinting, de zgn. BOX-PCR) (Figuur 5). Ter bevestiging wordt een pathogeniteitstoets uitgevoerd op jonge kastanjeaailingen, waarmee wordt voldaan aan de Postulaten van Koch. Inmiddels heeft het PRI een antiserum ontwikkeld, dat is gevalideerd en kan worden gebruikt voor de screening van weefselmonsters van bomen op *P. syringae* pv. *aesculi*. Daarnaast is er ook een real-time-PCR beschikbaar dat gebaseerd is op het gyrase B-gen van de bacterie (Green *et al.*, 2009).

### Epidemiologisch onderzoek

In de jaren 2006-2008 is epidemiologisch onderzoek uitgevoerd om vast te stellen hoe de verspreiding van de *P. syringae*-bacterie in de boom plaats vindt. Van pathovars van *P. syringae* is bekend dat ze via kwetsbare plekken in de bast bomen kunnen binnendringen, bijvoorbeeld via beschadigingen door hagel, insecten en andere dieren, schuurplekken van langs elkaar bewegende takken, maaibeschattingen, snoeiwonden, vorstbarsten, vertakkingen etc. Om de verspreiding van *P. syringae* pv. *aesculi* in de boom te bepalen, is in 2006 en 2007 gedurende een periode van negen maanden, maandelijks een boom geveld en onderzocht. Er werd gekeken naar symptomen, en monsters van de bast en spoelmonsters van de takken, bloemen, bloeiwijzen, bladeren, knopjes en takjes werden geanalyseerd. Er komen in de epifytische monsters ook veel andere *P. syringae*-bacteriën voor en vaak wordt de groei van *P. syringae* onderdrukt door saprophyten zodat isolaties vals-negatief kunnen zijn en kwantitatieve bepalingen van *P. syringae* pv.

Resultaat vetzuur- analyse	Gel Kolom Nr.	Sample	Oorsprong isolaat	DNA vingerafdruk in agarose-gel
	1	Ladder 1 Kb plus		
<i>P. syringae</i>	2	PD 4818	Winssen, 2004	
<i>P. syringae</i>	3	Hout. 15	Houten, 2006	
<i>P. syringae</i>	4	Hout. 15,2	Houten, 2006	
<i>P. syringae</i>	5	PD 4337	Gorinchem, 2002	
Saprofiet	6	Hout. 16	Houten, 2006	
<i>P. syringae</i>	7	PD 5089	NL, 2005	
Saprofiet	8	Hout. 17,1	Houten, 2006	
<i>P. putida</i>	9	Hout. 17,2	Houten, 2006	
<i>P. syringae</i>	10	PD 5136	Merelbeke 2005	
<i>P. syringae</i>	11	Hout. 18	Houten, 2006	
<i>P. syringae</i>	12	PD 5141	Nieuwpoort, 2005	
	13	DNA-Ladder 1 Kb plus		
<i>P. syringae</i>	14	Hout. 19	Houten, 2006	
<i>P. syringae</i>	15	PD 5126	PRI, 2005	
Saprofiet	16	Hout. 20	Houten, 2006	
<i>P. syringae</i>	17	Hout. 21	Houten, 2006	
<i>P. putida</i>	18	Hout. 22,1	Houten, 2006	
<i>B. pichettii</i>	19	Hout. 22,2	Houten, 2006	
<i>P. putida</i>	20	Hout. 24	Houten, 2006	
<i>P. putida</i>	21	Hout. 25,1	Houten, 2006	
Saprofiet	22	Hout. 25,2	Houten, 2006	
	23	NC		
	24	Ladder 1 Kb plus		

Figuur 5. Box-PCR analyse van de *Pseudomonas syringae*-bacterie uit kastanje en saprofytische bacteriën. Duidelijke verschillen in bandenpatronen maken het mogelijk verdachte kolonies te identificeren (referentie-isolaten: PD 4818, 4337, 5089, 5136, 5141 en 5126).

*aesculi* onmogelijk worden. Van de ca. 700 monsters afkomstig van drie onderzoekslocaties werden ruim 600 kolonies met een typische *P. syringae*-morfologie getoetst met vetzuuranalyse. Hiervan gaven 390 een overeenkomst met *Pseudomonas (syringae)*. Van deze 390 kolonies waren er 201 identiek aan *P. syringae* pv. *aesculi* in BOX-PCR-analyse. Uiteindelijk waren 166 van de 700 geanalyseerde monsters positief voor *P. syringae* pv. *aesculi* op basis van zowel koloniemorfologie, vetzuuranalyse en BOX-PCR fingerprinting. De pathogeniteitstoets op kastanjezaailingen werd uitgevoerd met 60 van de 166 isolaten waarmee werd voldaan aan de postulaten van Koch.

In 2007 en 2008 werden regenwatermonsters verzameld tijdens zware regenbuien in de buurt van aangetaste kastanjabomen. Het afdruipe water van bladeren, takjes, vruchten en stam van aanwezige kastanjabomen werd opgevangen in centrifugebuizen en op het laboratorium geanalyseerd. Een aantal watermonsters (13 van de 32) bleek besmet te zijn met de *P. syringae* bacterie (concentratie  $10^2$ - $10^3$  cfu.ml<sup>-1</sup>).

Ook vruchten werden onderzocht op de aanwezigheid van *P. syringae* om de mogelijke rol van overdracht via zaad te kunnen vaststellen. Zaadoverdraagbaarheid kan namelijk belangrijke consequenties hebben voor de verspreiding van de ziekte omdat de vermeerdering van paardenkastanje plaatsvindt via zaailingen. Op drie proeflocaties met geïnfecteerde kastanjabomen werden bloemmengsels, individuele bloemen en vruchtbeginsels verzameld en onderzocht op het epifytisch voorkomen van de bacterie. Op één locatie werden twintig bomen bemonsterd: van zeven bomen waren de bloemmonsters besmet (maximaal  $10^7$  cfu per bloemtros) en van negen bomen de verzamelde vruchtbeginsels (maximaal  $10^5$  cfu per vruchtbeginsel). Ook werden tijdens de bloei een klein aantal bloembezoekende insecten verzameld en geanalyseerd. Van dezelfde locatie is later in het seizoen gekeken of de bacterie ook kon worden aangetoond in ontwikkelende vruchten (aan de boom), zaden met kiem (gevallen bolsters) en gekiemde zaden en kiemplantjes. Alleen in de ontwikkelende vruchten werd bij alle tien de bemonsterde

bomen *P. syringae* pv. *aesculi* aangetroffen (maximaal  $10^6$  cfu/vrucht; de identiteit van de isolaten is nog niet bevestigd met de pathogeniteitstoets)

Bovenstaand onderzoek leverde de volgende gegevens op:

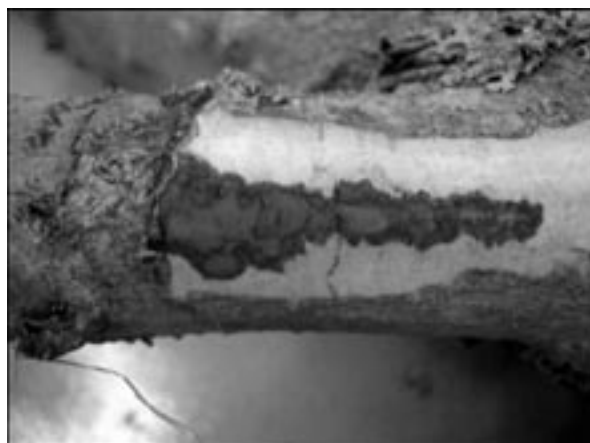
- *P. syringae* pv. *aesculi* komt voor in spoelmonsters van takjes, bladeren, bloemen en (zich ontwikkelende) vruchten en in regenwater op kastanjabomen in de omgeving van zieke bomen;
- Bij de onderzochte bloembezoekende insecten is geen *P. syringae* aangetoond.
- Er zijn te weinig insecten geanalyseerd om hieruit conclusies te trekken betreffende de mogelijke rol bij de overdracht;
- De inwendige aantasting is veel groter dan de uitwendige bloedingsplek (Figuur 6);
- *P. syringae* pv. *aesculi* komt niet voor in houtweefsel;
- *P. syringae* pv. *aesculi* induceert de vorming van afsluitingsweefsel, te zien als verkurkte plekken, rondom geïnfecteerd bastweefsel. Soms wordt hiermee de verdere uitbreiding van de aantastingsplekken gestopt en heeft dit afsluitingsweefsel de infectieuze plekken plaatselijk kunnen inkapselen;
- Regelmatig werden bloedingsymptomen waargenomen op gesteltakken en jongere takken tot op zes meter hoogte. In geen van de gevallen stonden deze aantastingen in verband met bloedingverschijnselen op de stam;
- Enkele keren werden infecties met de *P. syringae*-bacterie gevonden op plekken waar maaischade of oude snoeiwonden waren te zien en op plaatsen waar de hoofdstam vertakt (Figuur 6).

### Mogelijke verspreidingswijzen van *P. syringae* pv. *aesculi*

*P. syringae* pv. *aesculi* werd zowel op bloemen als in afspoelend regenwater aangetroffen. Dit zou er op kunnen duiden dat de bacterie zich in de bloemen vermeerdt, waarbij de nectar als voedingsbron fungeert. Tevens zou hier de primaire infectie kunnen plaatsvinden, daar de bacterie eveneens werd aangetroffen in verschillende delen van zich ontwikkelende vruchten. Vanuit de primaire infectie kunnen de bacteriën vervolgens met regenwater mee gespoeld worden. Dit kan in geval van beschadigingen van de bast tot infecties op de stam leiden.



Figuur 6. Gesteltak (diameter 5 cm) van paardenkastanje met verschijnselen van bloedingsziekte. Boven: uitwendige barsten in de bast; onder: inwendig typische roodbruin verkleuring (ca. 20x3 cm).



Onder experimentele omstandigheden bleek het eveneens mogelijk om zaailingen te infecteren door oppervlakkige prik- en schraapwondjes in de bast. Ook verwondingen die ontstaan na het verwijderen van bladeren bleken als invalspoort voor de bacterie te kunnen fungeren. Een vernevelde bacteriesuspensie leidde in alle gevallen tot infectie op de beschadigde plekken. Van lenticellen is niet komen vast te staan dat deze de bacterie een toegang kunnen verschaffen.

In 2008 zijn infectieproeven met *P. syringae* pv. *aesculi* uitgevoerd bij 10-15 jaar oude bomen van *Aesculus hippocastanum* 'Baumannii'. Vastgesteld is dat één bacterie, aangebracht in een klein sneetje in de stam, voldoende is om een infectie te starten en na enkele maanden bastnecrose te veroorzaken.

### Bestrijding / beheersmogelijkheden

De resultaten van het epidemiologisch onderzoek maken duidelijk dat het vooralsnog moeilijk is om verspreiding van de ziekte tegen te gaan. Toch is er wel een aantal aanknopingspunten:

- Indien wordt aangenomen dat regenwater een belangrijke rol speelt in de verspreiding, dan wordt aanbevolen bij aan- of herplant bomen op een 'veilige' afstand van geïnfecteerde bomen te planten.
- De uitgevoerde inventarisatie geeft de indruk dat niet alle cultivars, en niet alle individuen binnen cultivars, in dezelfde mate zijn aangetast. Dit zou kunnen duiden op resistentie of tolerantie. Op termijn zou het inkruisen van verminderde vatbaarheid de ziekte beheersbaar kunnen maken.
- Snoeien beperken en alleen uitvoeren als geen bladeren/bloemen aanwezig zijn.
- Daar met name infecties op de stam leiden tot het afsterven van de boom, kan met het plaatsen van een manchete onder de kroon van de boom worden voorkomen dat lekwater van geïnfecteerde bloemen, bladeren en takken op de stam terecht komt.
- De vitaliteit van de boom verbeteren waardoor deze minder vatbaar is voor de kastanjeziekte. Proeven daarmee in een aantal Nederland steden lijken een positief effect te hebben, hoewel wetenschappelijk bewijs ontbreekt. Het ploffen (onder druk spuiten van voedingsstoffen en lucht tussen de wortels), bemesten en het aanbrengen van schimmeldominante compost lijkt de conditie van bomen te verbeteren en zo te resulteren in verminderde aantastingen (Rapport "Kastanjebloedingziekte 2008 en andere boomziekten", gemeente Dordrecht; <http://www.bomenindordt.nl/> )
- Door de werkgroep Aesculaap is een beheersadvies opgesteld dat gebaseerd is op de onderzoeksresultaten van de werkgroep en deze is te vinden op de website.

### Conclusies en mogelijk toekomstig onderzoek

Nu het binnen de groep van onderzoekers van Aesculaap steeds duidelijker wordt dat de directe bestrijding van de kastanjeziekte zeer moeilijk, zo niet onmogelijk is, blijven er toch nog enkele mogelijkheden over waaronder resistentieveredeling en herplant van minder vatbare soorten/cultivars zoals pavia en flava. Voor verder onderzoek komen volgens de werkgroep Aesculaap de volgende onderwerpen in aanmerking:

- Verificatie, met behulp van een pathogeniteits-toets van bacterie-isolaten die verkregen werden uit diverse substraten (bloemen, vruchtbe-ginsels, vruchten, regenwater) in 2008.
- Ontwikkeling van een goede screenings- en toetsmethode voor resistentie-onderzoek.
- Voortzetting van de inventarisatie van resistenties binnen het sortiment van de paardenkastanje.

- Voortzetting van onderzoek naar de relatie van wondweefsel (callus) vorming en secundair houtrot.
- In 2008 zijn in een veldproef in de gemeente Houten de remstoffen ascorbinezuur, citroenzuur en cysteine getest om na te gaan of zij in staat zijn bloedingen bij paardenkastanje te remmen c.q. te stoppen. De bacterie wordt hierbij overigens niet aangepakt. Deze proef met remstoffen moet worden voortgezet omdat de bomen nog weinig tijd gehad hebben om te reageren.

### Referenties

- Brasier CM & Strouts RG (1976) New records of *Phytophthora* on trees in Britain. I. *Phytophthora* root rot and bleeding canker of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). *European Journal of Forest Pathology* 6, 129-136
- Bultreys A, Gheysen IC & Planchon V (2008) Characterization of *Pseudomonas syringae* strains Isolated from Diseased Horse-chestnut Trees in Belgium. In: *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens – Identification, Epidemiology and Genomics. Springer Netherland, 283-293
- Durgapal JC & Singh B (1980) Taxonomy of pseudomonads pathogenic to horse-chestnut, wild fig and wild cherry in India. *Indian Phytopathology* 33, 533-535
- Green S, Laue B, Fossdal CG, A'Hara SW & Cottrell JE (2009) Infection of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* and its detection by quantitative real-time PCR. *Plant Pathology*, Early view online, May 7 2009
- Janse JD (1981) The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*) caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini*. 11. Etiology and taxonomic considerations. *European Journal of Forest Pathology* 11:425-438
- Janse JD, van Beuningen AR, van Vaerenbergh J, Speksnijder AGCL, Heyrman J, de Vos P & Maes M (2006) An overview of some emerging diseases, including a taxonomic study on a *Pseudomonas* bacterium related to *P. tremae* and *P. s. pv. ulmi*, causing bleeding canker of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*). 11<sup>th</sup> International Conference of Plant Pathogenic Bacteria, Edinburgh, UK. Programme and abstracts book: p. 11-12
- Schmidt O, Dujesiefken D, Stobbe H, Moreth U, Kehr R & Schröder Th (2008) *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* associated with horse chestnut bleeding canker in Germany. *Forest Pathology* 38, 124-128
- Webber JE, Parkinson NM, Rose J, Stanford H, Cook RTA & Elphinstone JG (2008) Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* causing bleeding canker of horse chestnut in the UK. *Plant Pathology* 57: 368