

Onderzoek 2007

op basis onderzoekprogramma

"Behoud de kastanje"

Werkgroep Aesculaap,
Juni 2007

Colofon

Dr. Ir. M.W.C. (Marijke) Dijkshoorn-Dekker Programmacoördinator

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Wageningen UR

Sector Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
Prof. van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse
Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel: 0252-462121
Fax: 0252-462100
E-mail: kastanjeziekte@wur.nl
Internet: www.kastanjeziekte.wur.nl

1	Onderzoek bloedingsziekte in paardenkastanjabomen.....	4
2	Resultaten onderzoek 2006.....	5
3	Onderzoeksprojecten	8
3.1	Toetsplantensysteem.....	8
3.2	Beheersing- en bestrijdingstrategieën	8
3.2.1	Overleving	9
3.2.2	Bestrijdingsmiddelen/Remstoffen	9
3.2.3	Vectoranalyse.....	10
3.3	Epidemiologie.....	10
3.3.1	Analyse van initiatie en eerste ontwikkeling ziekteproces	10
3.3.2	Resistentie.....	10
3.4	(A)biotische factoren	11
3.4.1	Inventarisatie/stressfactoren.....	11
4	Producten.....	12
5	Tijdpad en kosten.....	13

1 Onderzoek bloedingsziekte in paardenkastanjbomen.

In de zomer van 2002 kwamen uit Noord- en Zuid Holland en Friesland meldingen binnen van bruine plekken op de stam van paardenkastanjbomen. Aangetaste bomen hebben plekjes op de stam, waar bruin vocht uit loopt. In een later stadium kunnen er bastscheuren optreden en kan de boom uiteindelijk doodgaan. In 2004 is geconstateerd dat vele duizenden paardenkastanjes in het gehele land zijn aangetast door deze ziekte. Het leek een landelijk probleem te worden. Om deze redenen is de werkgroep Aesculaap opgericht. De werkgroep coördineert acties rond de onbekende aantasting in de kastanje. Door krachtenbundeling van verschillende expertises wil de werkgroep de oorzaak zo snel mogelijk achterhalen en een strategie ontwikkelen om het probleem te beheersen.

Onder de media en het publiek is veel belangstelling en bestaat er grote zorg over het voortbestaan van de paardenkastanje. Uniek aan de bloedingsziekte in de paardenkastanje is dat de ziekte binnen een relatief kort tijdsbestek op deze grote schaal voorkomt. Zowel nationaal, als internationaal is de ziekte een probleem. De aanpak van Aesculaap is er op gericht zo snel mogelijk de juiste oplossingsrichting voor de bloedingsziekte te bepalen. Hiertoe is eerst gezocht naar een eventuele veroorzaker van de bloedingsziekte. Tegelijkertijd is een start gemaakt met bestudering van het ziekteproces in de paardenkastanjeboom met als doel middelen te vinden die het ziekteproces kunnen afremmen of stoppen. Hieronder worden de tot nu toe behaalde resultaten van het onderzoekprogramma 'Behoud de kastanje' (2006) beschreven. Op basis daarvan wordt de aanpak gegeven voor de voortzetting van het onderzoek in 2007 en wordt een tijdpad voor de verschillende onderdelen van het programma gepresenteerd. Veel onderzoeken lopen gelijktijdig, zodat wederzijdse interacties mogelijk zijn met als doel om in korte tijd resultaten te boeken.

2 Resultaten onderzoek 2006

Vervolgonderzoek bacterie

Zowel kunstmatige infectie van één- en tweejarige zaailingen in een kas als kunstmatige infectie van kastanjabomen van 10 – 15 jaar in het veld heeft bewezen dat een bacterie, behorend tot de groep *Pseudomonas syringae*, de veroorzaker is van de kastanjeziekte. In zowel de kasexperimenten als in de veldproeven kon aan de postulaten van Koch worden voldaan. Na kunstmatige inoculatie van de uit aangetaste bomen geïsoleerde *Pseudomonas syringae* bacterie was het mogelijk dezelfde verschijnselen te veroorzaken. Uit het geïnoculeerde weefsel kon de bacterie opnieuw teruggeïsoleerd worden. Dit is zowel met behulp van fingerprinting, vetzuuranalyse als met BOX-PCR bevestigd. Tevens blijkt dat uitbreiding van de infectie zich voor lange tijd onder de beschermende bast aan het oog kan onttrekken. Het schillen van de bast geeft duidelijk het ziekteverloop aan.

Taxonomisch onderzoek wijst uit dat de bacterie tot de *Pseudomonas syringae* groep behoort en nauw verwant lijkt te zijn met *P. tremae* (voorheen *P. syringae* pv. *tremae*) en *P. syringae* pv. *ulmi*. Verder onderzoek op dit vlak is in gang gezet met belgische en engelse collega's om de exacte taxonomische positie van de *P. syringae* bacterie uit kastanje te bepalen. Hierbij wordt ook *P. syringae* pv. *aesculi*, een stam geïsoleerd uit bladvlekken in India en de VS meegenomen.

Bestudering van het ziekteproces laat zien dat bloedingsreacties optreden zowel bij oppervlakkige of diepere injectie van de bacterie en dat exudaat al binnen twee weken kan ontstaan. Serologisch zijn *Pseudomonas syringae* bacteriën in bastweefsel getraceerd. Binnen een dag na injectie verspreiden zij zich in het omliggende weefsel en zijn na maanden nog goed aantoonbaar in bast en cambiumweefsel van geïnfecteerde bomen. Monsters kunnen daarvoor eerst in plastic worden ingebed om nauwkeurige localisatiestudies uit te voeren of direct gesneden worden voor een snelle detectie.

Voor het aantonen van de bacterie is een detectiemethode ontwikkeld. Deze detectiemethode van de *Pseudomonas*-bacterie kan als een snelle en gevoelige detectiemethode worden toegepast. Een bevestiging van de identiteit moet bij positieve resultaten plaatsvinden, om de vals positieve detectie van nauwverwante *Pseudomonaden* uit te sluiten.

Verdedigingsmechanismen

In een experiment vertoonden twee-jarige kastanjeboompjes die geïnjecteerd waren, al binnen 6 dagen wondherstelreacties in de vorm van de aanleg van een periderm in de bast rondom de plaats van injectie. Het proces van wondherstel leidde in twee maanden tot de volledige afsluiting van het beschadigde bastweefsel van de rest van de plant en een extra groei van het xyleem op de plaats van injectie. Omdat in dit toetsplantenexperiment infectiereacties als necrose en bloeding geheel zijn uitgebleven en al de planten een normale wondherstelreactie vertoonden, is het niet mogelijk geweest te toetsen of behandelingen met remstoffen effect hebben gehad op de cellulaire ontwikkeling. Het toetsplantenexperiment zal om deze reden herhaald moeten worden.

Stressfactoren

Groeiplaatsonderzoek

Van 11 straat- en laanbeplantingen van *Aesulus hippocastanum* 'Baumannii', verspreid over 5 Nederlandse gemeenten, is onderzocht in hoeverre er een relatie bestaat tussen de conditie van de bomen en de mate waarin ze zijn aangetast door de bloedingsziekte. Uit dit onderzoek blijkt dat verschillen in conditie vooral zijn terug te voeren op tekorten in de N-voorziening en dat bomen met de slechtste N-voorziening gemiddeld genomen het zwaarst zijn aangetast. Omdat het niet waarschijnlijk is dat de aantasting zelf bepalend is voor de opname van stikstof, betekent dit een sterke aanwijzing dat de mate waarin bomen worden aangetast vooral afhankelijk is van de N-voorziening van de bomen.

Overige onder- en bovengrondse groeiplaatsfactoren (waaronder plantplaatsomstandigheden, windinvloeden, oriëntatie van een bomenrij), evenals de mate waarin de bomen waren aangetast door de paardenkastanjiemineermot en de bladvlekkenziekte bleken in dit onderzoek geen aantoonbare invloed te hebben op de mate van aantasting door de bloedingsziekte.

De resultaten geven aan dat er een relatie bestaat tussen de conditie van de bomen en de mate waarin ze door de bloedingziekte worden aangetast en dat van maatregelen die er op gericht zijn om de conditie van de bomen te verbeteren een positief effect mag worden verwacht.

Virusonderzoek

Een in kastanjabomen gevonden virus blijkt volgens de screenings in 2005 en 2006 algemeen voor te komen en door Nederland verspreid te zijn. Volgens de laatste gegevens behoort het gevonden virus tot de familie *Flexiviridae*, waarschijnlijk tot een van de genera *Foveavirus* of *Vitivirus*, maar ook andere genera van de *Flexiviridae* behoren tot de mogelijkheden (zoals *Capillovirus* en *Trichovirus*).

Wanneer bekend is welk virus de kastanje infecteert en tot welk genus het behoort, kunnen experimenten worden opgezet die duidelijkheid verschaffen in de rol die het virus speelt in de bloedingziekte en kan ook een beter beeld verkregen worden over de precieze verspreidingswijze van dit virus.

Beheersing en bestrijding

Verspreiding

Om de verspreiding van de *Pseudomonas syringae* bacterie te bestuderen, zowel in als op de boom en zowel in als op insecten, werden besmette bomen onderzocht. Dit onderzoek heeft aangetoond dat de *P. syringae* bacterie in veel gevallen vrij eenvoudig uit bast- en houtmonsters geïsoleerd kan worden, zelfs in de maand december. Dit laatste kan echter komen door een uitzonderlijk zacht najaar van 2006 en de afwezigheid van nachtvorst. De bacterie kon ook uit onderste stamdelen en jongere takken worden geïsoleerd tot op 3 m hoogte. Onduidelijk is nog of de verspreiding vanuit jongere takken naar de stam of andersom plaats vindt. Het onderzoek naar epifytisch voorkomende *P. syringae* bacteriën is nog niet afgerond.

Een indicatieve pilotstudie naar de mogelijkheid van overdracht van de kastanjabacterie door insecten kon niet bevestigen dat insecten een drager kunnen zijn van de *Pseudomonas* bacterie, maar deze mogelijkheid is zeker nog niet uitgesloten. De serologisch positieve IF (immunofluorescentie) -reactie van een aantal sluiwesp-extracten kon niet worden bevestigd met identificatie via fingerprinting (REP-PCR) van bacteriekolonies na uitplaten. Zeer waarschijnlijk speelde kruisreactiviteit van het serum hierbij een rol. Een goede validatie van het serum moet hierin duidelijkheid verschaffen. In vervolgonderzoek zal extra aandacht besteed worden aan de rol en bemonstering van sluiwesp.

Effecten van remstoffen in het veld

Effecten van de geteste remstoffen ascorbinezuur, citroenzuur, NAF en cysteine waren wisselvallig. Bovendien was de variatie groot. Hoewel behandeling met citroenzuur en ascorbinezuur in een aantal gevallen resulteerde in beter uitzierende bomen en minder ziekteverschijnselen, zijn de resultaten te grillig om onomstotelijk positieve effecten toe te schrijven aan deze remstoffen in het veld.

Het meten van de geleidbaarheid (EC) op verschillende posities van de stam is een bruikbare methode om op niet-destructieve wijze na te gaan hoever een aantasting gevorderd is. Bovendien biedt deze methode de mogelijkheid vast te stellen of een aantasting zich uitbreidt dan wel tot stilstand komt en kunnen effecten van middelen die mogelijk de bloeding stoppen, nagegaan worden.

Inventarisatie

De resultaten van de landelijke inventarisatie van 2006 zijn in grote lijnen vergelijkbaar met 2005. Opnieuw komt naar voren dat het westen en midden van het land zwaar zijn getroffen; in het zuidoosten ligt het aantastingsniveau, op een paar uitzonderingen na, aanmerkelijk lager en zijn er zelfs enkele gemeenten waar de aantasting nog niet is gesignaleerd. Wel blijkt het aandeel zieke bomen dat vorig jaar nog 31 % was, nu 40 % te zijn. In alle provincies is in 2006 sprake van een stijging van het percentage aangetaste bomen ten opzichte van 2005. Noord-Holland, Zuid-Holland en Utrecht komen qua aantastingspercentage boven het landelijk gemiddelde uit met resp. 48, 45 en 46% zieke bomen.

Van een aantal provincies waaronder de provincies Flevoland en Zeeland is de steekproefgrootte te gering om een voldoende betrouwbare uitspraak te kunnen doen over de stand van zaken in de gehele provincie. Van de 115 gemeenten die in 2006 hebben deelgenomen hebben er 41 ook in 2005 deelgenomen. Op basis van deze cijfers kan echter nog onvoldoende een uitspraak worden gedaan over hoe de ziekte zich in de toekomst geografisch zou kunnen uitbreiden qua intensiteit en richting.

Gelet op het aantastingspercentage van de zieke bomen blijkt er ten opzichte van 2005 een lichte verschuiving in aantastingscategorie van "licht" naar "zwaar" te zijn. (14,0 % was "zwaar" in 2005 en 19,2% in 2006). Ook is het



percentage zieke bomen met bastscheuren toegenomen. Evenals in 2005 blijkt de aantasting het meest voor te komen in de leeftijdscategorie “half-volwassen” (50,3 %) en het minst in de categorie “jonge bomen” (30,4%). Uit het landelijk inventarisatieonderzoek komt verder naar voren dat alle Aesculussoorten vatbaar zijn voor de bloedingsziekte. Zowel de *Aesculus hippocastanum* als de *Aesculus carnea* zijn voor bijna 40% aangetast. Het aantastingsniveau verschilt per cultivar. Zo is de *Aesculus hippocastanum* 'Briotti' voor 26% aangetast en de *Aesculus carnea* 'Plantierensis' voor 37%. Opmerkelijk is dat *Aesculus pavia* en *Aesculus flava*, die in Nederland minder algemeen voorkomen, minder vatbaar lijken te zijn (dit jaar resp. 1,6 en 4,5 %).

In het onderzoek is er wederom gelet op omgevingsfactoren die van invloed kunnen zijn op het ontstaan en de ontwikkeling van de bloedingsziekte. Zo is er gekeken of er wel of niet onderbegroeiing bij de boom aanwezig was, of de boom geplaatst was in de verharding, naar het niveau van het grondwater, of er sprake was van waterstagnatie en in welke grondsoort de boom was geplaatst. Op basis van de beschikbare gegevens zijn er m.b.t. deze omgevingsfactoren geen noemenswaardige verschillen aan te tonen.

Andere boomsoorten

Afgelopen jaar zijn enkele tientallen meldingen binnengekomen van bloedingen in andere boomsoorten (berk, beuk, eik, els, esdoorn, linde). Aangezien de symptomen lijken op die bij de paardenkastanje zijn ze onderzocht op aanwezigheid van pathogenen. Uit dit onderzoek is gebleken dat de *Pseudomonas* bacterie die voorkomt bij de kastanjeziekte niet aanwezig is bij bloedingen in andere boomsoorten.

Internationaal

In oktober 2006 is een internationale workshop georganiseerd, waaraan onderzoekers uit Engeland, Duitsland, Italië, Nederland en België deelnamen. De stand van zaken op het gebied van de kastanjeziekte in de verschillende landen is uitgewisseld en mogelijkheden tot internationale samenwerking zijn besproken.

Communicatie

In 2006 heeft de werkgroep Aesculaap veel aandacht besteed aan actieve externe communicatie. Directbetrokkenen zijn geïnformeerd via een regelmatig verschijnende nieuwsbrief. Verder onderhoudt de werkgroep een eigen website, www.kastanjeziekte.wur.nl, waar dit jaar ook een engelse link aan toegevoegd is. Op deze site is uitgebreide en actueel gehouden informatie te vinden. Behalve belanghebbenden, zoals gemeenten, bezoekt het grote publiek deze website met grote regelmaat. De belangstelling van het publiek blijkt ook uit de vele e-mails en telefoontjes die het projectteam van de zijde van de particulieren bereikt. De meeste communicatie verloopt via de media. Kranten, radio en televisie blijken grote belangstelling te hebben voor de kastanjeziekte en het onderzoek ernaar. Dat blijkt uit de bijna 140 artikelen die er dit jaar verschenen zijn en uit de tientallen radio- en tv-uitzendingen, waarin aan de ziekte aandacht is besteed. Daarbij is meestal de programmacoördinator als woordvoerder opgetreden.

Uit literatuuronderzoek werd slechts één melding gevonden van dezelfde ziektesymptomen in Aesculussoorten. In 2001 werden in Noord-Frankrijk en in de regio rond Brussel paardenkastanjabomen aangetroffen met gelijksoortige bloedingverschijnselen. Er werd toen geen veroorzaker of oorzaak gevonden.

3 Onderzoeksprojecten

Vervolgonderzoek zal zich in het bijzonder richten op beheersing en zo mogelijk bestrijding van de bloedingsziekte. Belangrijke vragen daarbij zijn hoe de bacterie zich verspreidt en welke andere factoren de aantasting beïnvloeden. Hiertoe is door Aesculaap in het eindrapport 'Behoud de kastanje' van 2006 een aantal aanbevelingen gedaan. Dit zijn de meest kansrijke en wetenschappelijk onderbouwde aanbevelingen. Aangezien het onderzoek voor 2007 (juli 2007) nog moet starten is het niet meer mogelijk om alle aanbevelingen te onderzoeken. Ook is er een prioritering gemaakt vanwege een lager beschikbaar budget. In dit hoofdstuk worden verschillende onderzoeksprojecten opgevoerd. Er wordt gekeken naar de bestrijding en beheersing van de ziekte door in te zoomen op het onderdeel overleving van de bacterie en effect van bestrijdingsmiddelen en remstoffen. Ook wordt er bestudeerd of de bacterie verspreid wordt door insecten. Helaas kan voor dit onderdeel geen uitspraak gedaan worden over de periode januari tot en met juni. Voortzetting van onderzoek op welke "natuurlijke" wijze de bacterie de boom infecteert vindt plaats door het bestuderen van het infectie/ziekteproces en kijken hoe de bacterie zich verspreidt, buiten en in de boom. Hierbij zal er ook gekeken worden of er verschillen te vinden zijn tussen de verschillende *Aesculus*-soorten (resistentieproject). Daarnaast zal er gekeken worden naar relaties tussen de conditie van de boom en aantasting in een gecombineerd stressfactoren/inventarisatieproject.

3.1 Toetsplantensysteem

Uit het kastanjeziekte-onderzoek van vorig jaar is een *Pseudomonas syringae* bacteriesoort gevonden die een rol speelt in het ziekteproces. Een toetsplantensysteem wordt opgezet, waarbij de kastanjeziekte op reproduceerbare wijze kan worden geïnduceerd in paardekastanjezaailingen, die in de kas onder ziektevrije omstandigheden worden opgekweekt. Met behulp van deze toetsplanten kan de kastanjeziekte zorgvuldig worden bestudeerd in al zijn aspecten, fytopathologie, morfologie en fysiologie, maar vooral ook in onderlinge samenhang.

Ook bestrijdingsmiddelen kunnen met deze toetsplanten worden getest op hun werking.

De ervaringen die met behulp van een toetsplantensysteem worden opgedaan kunnen zeer waardevol zijn in de nabije toekomst, wanneer eventueel weer een onbekende ziekte de kop opsteekt.

De toetsplanten worden opgekweekt in de kas onder geconditioneerde omstandigheden. Verschillende onderzoeksprojecten, die hieronder beschreven staan, gaan hier gebruik van maken.

3.2 Beheersing- en bestrijdingstrategieën

Inleiding

In verband met de sterke toename van de kastanjeziekte in Nederland, maar ook in andere landen binnen de EU, moet gekeken worden hoe verdere verspreiding van de ziekte zoveel mogelijk voorkomen kan worden. Het onderzoek naar de veroorzaker van de kastanjeziekte heeft zich toespitst op een *Pseudomonas syringae* bacterie. Om antwoorden te kunnen geven op voor de praktijk relevante vragen die te maken hebben met het beheersen en het bestrijden van de kastanjeziekte is gericht onderzoek nodig naar de epidemiologie van deze ziekte. Onbekend zijn momenteel de mogelijkheden van verspreiding, infectieroutes en andere factoren die bijdragen aan de ziektedrukverhoging en uitbreiding van de ziekte. Van verwante boompathogene bacteriën uit de *P. syringae* groep zoals *P. syringae syringae*, *P. syringae pv. morsprunorum* *P. syringae pv. mori* is meer bekend. Deze kennis kan als uitgangspunt dienen voor dit onderzoek.

Onafhankelijk van de vraag of genoemde ziekteverwekker een rol speelt in de kastanjeziekte, is het van belang om fysiologische en biochemische processen in en rond de 'wonden' tot stilstand te brengen. In het onderzoeksprogramma 'Red de kastanje voor Nederland' is een buitenproef gestart waarin een aantal wondbehandelingsmiddelen wordt uitgetest op hun werking tegen de kastanjeziekte. Als resultaat zou dit onderzoek kunnen leiden tot methoden, die de ontwikkeling van de ziekte kunnen onderdrukken. De waarnemingen aan de ontwikkeling van de ziekteverschijnselen van deze proefbomen gaan door in de loop

van 2007.

Tevens kan worden nagegaan of er verschillen bestaan in de componenten van het verbruiningssysteem tussen behandelde en onbehandelde bomen uit de veldproef van 2005-2006. Dit biedt dan de mogelijkheid om een correlatie te maken tussen de macro-ontwikkelingen van de ziekteverschijnselen tijdens het vervolg van de veldproef in 2007 en de ontwikkelingen in de componenten van het verbruiningssysteem. Hiermee kan dan meer gericht worden ingegrepen in de ziekteontwikkeling.

Doel

Verkrijgen van epidemiologische kennis via onderzoek en literatuurstudie om te komen tot een effectief praktijkadvies: hoe de kastanjeziekte te voorkomen, te beheersen en/of bestrijden.

Het volgen van de effecten van wondbehandelingsmiddelen tegen de kastanjeziekte op toetsplanten en in het veld.

3.2.1 Overleving

Belangrijk voor de beheersing zijn hygiënische maatregelen. Hiervoor moet duidelijk worden wat de overleving van de bacterie is op verschillende substraten. De overleving van de bacterie in de bodem (vanuit regenwater wat langs de boom valt), in dood houtmateriaal, bladeren, plantresten en de overleving van de bacterie op gereedschappen die worden gebruikt voor snoeiwerkzaamheden en het vellen van bomen. Verschillende overlevingsscenario's worden getest door materialen te inoculeren en onder verschillende condities te bewaren. Daarnaast zal detectie uitgevoerd worden direct op de materialen en kan effectiviteit van ontsmettingsmethoden getest worden.

Aanpak

- Ziekte-ontwikkeling en mogelijke vectoren nauwkeurig onderzoeken aan de hand van gemerkte bomen op praktijklocaties. Elke maand een geïnfecteerde boom vellen en nauwkeurig onderzoeken op symptoomvorming, plaats van nieuwe infecties en voorkomen van mogelijke vectoren of abiotische overdrachtsfactoren.
- Onderzoek naar de overdracht in aanwezigheid van inoculum. Dit inoculum kan zijn: versnipperd boommateriaal van zieke bomen, bastmateriaal afkomstig van bloedende bomen of verneveld inoculum. Invalspoorten kunnen al dan niet gecreëerd worden door kerven in de bast, verwijderen van bladmateriaal, conditionering waardoor lenticellen open komen te staan en eventueel insectenschade. In kasproeven wordt de mogelijkheid van luchtverspreiding en infectie (vanuit aanwezig inoculum/door verneveling) via al dan niet natuurlijke openingen bij zaailingen onderzocht. Informatie uit de resultaten van deze experimenten kan belangrijk zijn voor het bepalen van de haalbaarheid van bestrijdingsmaatregelen. Tevens wordt gekeken naar het effect van de kastanjemineermot op het ontstaan van de kastanjeziekte. Het verband tussen de aanwezigheid van kastanjemineermot-aantasting en optreden van de kastanjeziekte is in openbaar groen niet aangetoond maar ook niet verworpen. Als dit verband bestaat is de bestrijding/onderdrukking van de ziekte via mineermotbestrijding te realiseren.

3.2.2 Bestrijdingsmiddelen/Remstoffen

- Met laboratoriumproeven is vastgesteld dat meerdere stoffen de celafbraak in geïnfecteerd weefsel kunnen remmen, waardoor de boom in staat is tijdig verdedigingsmechanismen te activeren. In 2005 en 2006 zijn in een buitenproef in Houten effecten van remstoffen op zieke bomen getest. Vanwege de benodigde hersteltijd en gewenst inzicht in effecten op wat langere termijn is het nodig om ook in 2007 de bomen te blijven volgen en behandelingen voort te zetten.
- Om de effecten van remstoffen op het verloop van het ziekteproces op veel kortere termijn vanaf het begin van infectie vast te kunnen stellen, zullen 2-3 jarige zaailingen geïnfecteerd worden, en daarna behandeld met remstoffen. Het vaststellen van de effecten gebeurt met diverse fysiologische en histologische technieken. Ten slotte zullen de effecten van de meest effectieve remstoffen getest worden op gezonde volwassen bomen, die kunstmatig geïnfecteerd worden. Dit

moet leiden tot een realistisch behandelingsplan om geïnfecteerde bomen te sparen.

3.2.3 Vectoranalyse

In 2006 is een survey uitgevoerd naar de mogelijke overdragers van de bacterie die de kastanjeziekte veroorzaakt. Insecten werden gevangen met vallen (lijmplaten en unitraps) en de bacterie werd gedetecteerd m.b.v. het in 2006 ontwikkelde antiserum (IF) en geverifieerd m.b.v. REP fingerprinting. De *Pseudomonas* werd teruggevonden in enkele sluipwespen.

Aanpak

Dit jaar zullen meer vallen, verdeeld over vier verschillende plaatsen in Nederland en op twee verschillende tijdstippen uitgezet worden. Om een "jaarrond-beeld" te krijgen zullen in 2008 nog twee momenten gekozen worden om vallen uit te zetten. De insecten zullen worden ingedeeld in families en waar mogelijke / wenselijk worden gedetermineerd. In de insecten zal m.b.v. IF worden gekeken of de *Pseudomonas* bacterie aanwezig is. Daarvoor zal ook nog een serumvalidatie worden uitgevoerd. Een positief signaal zal worden geverifieerd m.b.v. REP-fingerprinting.

3.3 Epidemiologie

3.3.1 Analyse van initiatie en eerste ontwikkeling ziekteproces

Naast analyse van de overdracht van de ziekteverwekker, is het belangrijk om de eerste ontwikkeling van het infectieproces en de reactie van de boom daarop anatomisch te volgen. Onderzoek in 2005 en 2006 heeft uitgewezen dat in de eerste weken na infectie sterk weefselverval optreedt, waarbij de plant in een aantal gevallen verdedigingsbarrières opbouwt. Aan 2-3 jarige zaailingen, die geïnfecteerd worden met *Pseudomonas*, zal de ontwikkeling van het ziekteproces anatomisch gevolgd worden. Tevens wordt nagegaan in hoeverre het ontstaan van het verdedigingsmechanisme van de boom afhankelijk is van de concentratie van bacteriën in het inoculum en de wijze van applicatie. Met serologische en microscopische methoden wordt nagegaan hoe bacteriën zich verspreiden en langs welke route.

3.3.2 Resistentie

Vergelijking vatbaarheid/resistentie *Aesculus pavia* en *Aesculus flava*. Uit het inventariserend onderzoek is gebleken dat vooral de witte en rode paardenkastanje zijn aangetast. Bij *Aesculus pavia* en *A. flava* is het aantal aangetaste bomen verhoudingsgewijs laag. Dit beeld zal in infectieproeven met zaailingen nader onderzocht worden. Het is goed om te kijken of er vergelijkbare of andere verdedigingsmechanismen voorkomen binnen de diverse *Aesculus*-soorten (resistentieonderzoek starten). Door genetische selectie van weinig of niet vatbare soorten kan voor de lange termijn wellicht een gezonde cultivar worden gevonden.

Aanpak

Van alle bekende soorten en variëteiten van paardenkastanje zullen een aantal exemplaren worden aangekocht en kunstmatig worden besmet onder praktijkomstandigheden om de vatbaarheid te bepalen. Hierbij zal eerst een screening in de kas plaats vinden en met veelbelovende soorten/variëteiten ook een proef onder praktijkomstandigheden. Tegelijkertijd worden ook de fysiologische en histologische aspecten van vatbaarheid/resistentie bestudeerd.

3.4 (A)biotische factoren

3.4.1 Inventarisatie/stressfactoren

In 2005 en in 2006 heeft er een landelijke inventarisatie plaatsgevonden onder de Nederlandse gemeenten. Dit niet alleen om de ernst en omvang van de ziekte in beeld te krijgen maar juist om te bekijken in hoeverre de conditie van de bomen bepalend is voor de aantastingsgraad. De afgelopen jaren leverde wat ruis rond data van gemeenten op. Uniformiteit van gegevens is gewenst om een relatie tussen groeiplaatsfactoren en conditie van de boom te leggen. Om iets te kunnen zeggen over het verspreiden van de bacterie t.a.v. het praktijkadvies is dit onderzoek onmisbaar. Bij het onderzoek naar de epidemiologie van de bloedingsziekte worden de stressfactoren, zoals de kastanjemineermot, meegenomen in het onderzoek. Zo kan een sterke afname van de hoeveelheid bladmassa door aantasting door de kastanjemineermot een belangrijke biotische stressfactor zijn. Uit het inventariserend onderzoek kan eventueel blijken dat abiotische factoren een rol spelen. Het is niet uitgesloten dat een combinatie van abiotische factoren de boom zo verzwakt dat gelegenheidspathogenen kunnen toeslaan. Stressfactoren die in combinatie een rol kunnen spelen zijn: sterke afname van de hoeveelheid bladmassa door (forse) snoei, een standplaats met een hoge grondwaterstand of klimaatsomstandigheden als droge zomers of natte, zachte winters. Stressfactoren en hun invloed op de bloedingsziekte zijn nog onvoldoende bekend.

Aanpak

Het uitvoeren van een inventarisatie van de bloedingsziekte in combinatie met stressfactoren onder de kastanjabomen in Nederland. Deze inventarisatie zal worden uitgevoerd door een groep mensen, die steekproefsgewijs het land doorreizen om bomenbestanden te beoordelen op de mate van aantasting volgens vaste protocollen. Op diverse locaties met beplantingen van paardenkastanjes, waarin een voldoende groot verschil in mate van aantasting aanwezig is, worden in iedere aantastingscategorie bomen bemonsterd op takscheutontwikkeling en voedingselementengehalte van het blad. De resultaten worden onderling vergeleken en getoetst op verschillen en correlaties. Per object wordt eveneens een beschrijving van de bodemopbouw gegeven aan de hand van de resultaten van grondboringen.

4 Producten

Het programma zal de volgende producten opleveren:

- Kennis van epidemiologische factoren die van belang zijn in de bestrijding/beheersing en verspreiding van de kastanjeziekte
- Onderbouwd praktijkadvies op basis van het uitgevoerde onderzoek op dat moment (hoe om te gaan met zieke bomen).
- Uitspraak over de bruikbaarheid van de getoetste wondbehandelingsmiddelen voor de praktijk
- Inzicht in mogelijke resistentie
- Kwantitatieve informatie over relatie tussen de conditie van kastanjabomen en de aantastingsgraad en daaruit voortvloeiend aanbevelingen voor het te geven praktijkadvies.
- Eindrapportage onder andere t.b.v. opdrachtgever LNV
- Coördinatie onderzoek en communicatie via werkgroep Aesculaap
- Contacten binnen- en buitenland.
- Een Web-site www.kastanjeziekte.wur.nl waar alle actuele ontwikkelingen, onderzoeksresultaten en actueel advies zijn te vinden, inclusief achtergrondinformatie
- Een Engelstalige Web-site
- Via lezingen worden de resultaten gecommuniceerd aan een breed publiek
- Nieuwsbrieven uitgebracht door Aesculaap
- Publicaties in vakbladen
- Publicaties in wetenschappelijke tijdschriften
- Media presentaties, dagbladen, radio en televisie (landelijk en regionaal)

5 Tijdpad en kosten

De kosten van het onderzoek in 2007 bedraagt € 240.159,- . Er is in de gegeven aanpak rekening gehouden met prioritering van onderzoeksrichtingen, nog uitvoerbare onderzoeksrichtingen in 2007 en beschikbare budget. Het onderzoek is half juli van start gegaan vanwege beschikbaarheid financiële middelen. De meest kansrijke, nog (grotendeels) uitvoerbare en wetenschappelijk onderbouwde onderzoeken zijn gekozen. Veel onderzoeken lopen gelijktijdig zodat wederzijdse interacties mogelijk zijn met als doel om snel resultaten te boeken. In de loop van het onderzoek kunnen binnen de begroting wijzigingen plaatsvinden in de uit te voeren projecten als gevolg van tussentijdse resultaten.

Aesculaap	2007											
	januari	februari	maart	april	mei	juni	juli	augustus	september	oktober	november	december
Toetsplantensysteem												
Bestrijding en beheersing												
<i>Overleving</i>												
inoculuminfectie fase i												
vectoranalyse kas												
Resistentie Aesculussoorten												
<i>Bestrijdingsmiddelen/remstoffen</i>												
Toetsplanten fase i												
fase ii												
fase iii												
Veld												
Epidemiologie												
<i>Vector-analyse veld</i>												
<i>analyse ziekteproces</i>												
<i>Resistentie</i>												
Resistentie Aesculussoorten												
(A)biotische factoren												
Inventarisatie/stressfactoren												
Samenwerking internationaal												
Communicatie/Coördinatie												
Onvoorzien												