

Eindrapport

Onderzoeksprogramma

"Behoud de kastanje"

DEEL 2



Werkgroep Aesculaap, februari 2008, Lisse

© 2008 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving 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 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Colofon

Dr. Ir. M.W.C. (Marijke) Dijkshoorn-Dekker
Dr. Ir. G.J. (Gera) van Os

Programmacoördinator
Onderzoekscoördinator

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

Voorwoord

De paardenkastanjabomen (*Aesculus* spp.) in Nederland worden bedreigd door de kastanjeziekte. In 2002 kwamen de eerste symptoommeldingen binnen, in 2004 werd geconstateerd dat vele paardenkastanjabomen in het gehele land waren aangetast door deze ziekte.

Onderzoeksinstituten, gemeenten en andere organisaties, die professioneel betrokken zijn bij de zorg voor de bomen in Nederland, maakten zich grote zorgen over deze tot dan toe onbekende ziekte en hebben daartoe hun krachten gebundeld in de werkgroep Aesculaap¹. Uit een eerste onderzoeksprogramma 'Red de kastanje voor Nederland' in opdracht van de minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit bleek dat een bacterie de vermoedelijke veroorzaker is van de kastanjeziekte. Ook werd duidelijk dat de omvang en ernst van de ziekte in Nederland toenam. In 2006 is de veroorzaker van de ziekte geïdentificeerd als een bacterie uit de groep van *Pseudomonas syringae*. Uit dit onderzoekprogramma "Behoud de kastanje" kwamen verder een aantal aanbevelingen voor een nieuw plan van aanpak met als doel mogelijke oplossingsrichtingen aan te geven om de kastanjeziekte te beheersen. Dit rapport, in opdracht van de minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, is de weerslag van het onderzoek hieraan in 2007.

Het gehele onderzoek staat onder verantwoordelijkheid van de werkgroep Aesculaap. In deze werkgroep, onder coördinatie van het Praktijkonderzoek Plant en Omgeving (PPO) van Wageningen Universiteit en Researchcentrum, werkt een aantal partijen samen: Groenadvies Amsterdam BV, de Plantenziektenkundige Dienst van het Ministerie van LNV, het onderzoeksinstituut Alterra van Wageningen UR en de gemeenten Den Haag, Utrecht, Haarlemmermeer, Amsterdam en Houten. Aan het onderzoek werken verder mee Plant Research International van Wageningen UR en de leerstoelgroepen Plantencelbiologie en Plantenfysiologie van Wageningen Universiteit.

De werkgroep beschikt over een veelbezochte website, waarop zij alle informatie zo actueel mogelijk beschikbaar stelt: www.kastanjeziekte.wur.nl.

Lisse, 15 februari 2008

Dr. ir. Marijke.W.C. Dijkshoorn-Dekker
Praktijkonderzoek Plant en Omgeving
Wageningen UR

¹ De naam Aesculaap is een samentrekking van de naam voor het medisch symbool Esculaap en de Latijnse naam voor het geslacht paardenkastanje, *Aesculus*. De paardenkastanje is overigens een heel andere boomsoort dan de tamme kastanje (*Castanea*).

Inhoudsopgave

Voorwoord	3
Samenvatting	7
Summary	11
1 Inleiding	17
2 Programmaorganisatie Aesculaap	19
2.1 Opdrachtgever	19
2.2 Programmacoördinatie	19
2.3 Het onderzoeksteam	20
2.4 De onderzoeksprojecten	20
2.5 Het communicatieteam	20
3 Onderzoeksprojecten	21
3.1 Epidemiologie	21
3.1.1 Analyse initiatie en eerste ontwikkeling ziekteproces	21
3.1.2 Overleving	25
3.1.3 Invalspoorten	33
3.1.4 Mogelijke overdragers	37
3.1.5 Serumvalidatie	41
3.2 Resistentie	47
3.2.1 Toetsing gevoeligheid Aesculussoorten, -hybriden en –cultivars.....	47
3.2.2 PPO-cascade in andere <i>Aesculus</i> -soorten en cultivars.....	58
3.3 (A)biotische factoren	65
3.3.1 Inventarisatie groeiplaatsomstandigheden	65
3.3.2 Kastanjemineermot als stressfactor.....	74
3.4 Beheersing	77
3.4.1 Effecten van remstoffen onder kasomstandigheden	77
3.4.2 Effecten van remstoffen in de praktijk	84
4 Communicatie	95

Samenvatting

De kastanjeziekte breidt zich snel over Nederland uit. De ziekte in paardenkastanje (*Aesculus* spp.) is een nationaal probleem en komt ook internationaal voor in het stedelijk groen, de bossen en de boomteeltsector. Het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit heeft afgelopen drie jaar onderzoek gefinancierd naar deze ziekte. Uit het onderzoeksprogramma 2005 ('Red de kastanje voor Nederland') kwam naar voren dat een bacterie uit de *Pseudomonas syringae*-groep mogelijk de veroorzaker is van de kastanjeziekte. Onderzoek in 2006 ('Behoud de kastanje') bevestigde dit. Tevens is in het onderzoek van 2006 een eerste aanzet gemaakt voor het vinden van mogelijke oplossingsrichtingen voor het beheersen van de kastanjeziekte. Bestudering van het ziekteproces liet onder andere zien dat uitbreiding van de infectie zich voor langere tijd onder de beschermende bast aan het oog kan onttrekken. Verder bleek dat bloedingsreacties optraden bij oppervlakkige of diepere injectie van de bacterie en dat exudaat al binnen twee weken kan ontstaan. Ook was er gekeken naar de invloed van groeiplaats en de verspreiding van de bacterie. Onduidelijk is nog of de verspreiding vanuit jongere takken naar de stam of andersom plaatsvindt. Tevens waren er nog geen conclusies te trekken over het gebruik van remstoffen om de bloeding te stoppen of te vertragen in het veld. De ernst en omvang van de ziekte in 2006 is in Nederland wel toegenomen. Op basis van de aanbevelingen uit het onderzoek van 2006 is er in 2007 een vervolgonderzoek van start gegaan 'Behoud de kastanje, deel 2' (augustus-december 2007). Dit onderzoeksprogramma sluit aan bij het vorige onderzoeksprogramma en heeft als doel het vinden van mogelijke oplossingsrichtingen voor het beheersen van de kastanjeziekte.

Epidemiologie

Om meer inzicht te krijgen in het ziekteverloop en aangrijpingspunten te vinden voor bestrijding van de ziekte, is het belangrijk om de eerste ontwikkeling van het infectieproces en de reactie van de boom daarop anatomisch te volgen. Vragen daarbij zijn hoe dringen bacteriën de boom in en hoe verspreiden ze zich in en buiten de boom en langs welke route, hoe ontwikkelt het ziekteproces zich en hoe reageert de plant op de infectie? Kunstmatige infectie van tweejarige zaailingen liet uitwendige symptoomuitbreiding, een bobbelige bast en bastscheurtjes, zien vanuit de infectieplaats zowel naar boven als naar beneden. Bloeding werd waargenomen op de plaats van infectie en in enkele gevallen ook op andere plaatsen van de stam. Op de plaats van infectie werd in eerste instantie altijd weefseldegeneratie gezien maar aan de buitenzijde van de plant is ook wondherstel waargenomen. Aan de binnenzijde was de bacterie nog steeds aantoonbaar. Wondherstel duidt niet per definitie op genezing, maar zou wel invloed kunnen hebben op het verdere verloop van het ziekteproces in de boom. Opmerkelijke verschillen in mate van uitbreiding van de infectie in de boom en in het optreden van het wondherstel duiden erop dat genotypische variatie hierbij een rol kan spelen. Ook bleken de kascondities van belang voor het ontwikkelen van ziekteverschijnselen. Condities met hoge luchtvochtigheid leek het ziekteproces te versterken.

Bij het afschillen van de schors bij actieve bloedingen op volwassen bomen bleek de inwendige aantasting veel groter dan de uitwendige bloedingsplek. De aangetaste plek vertoonde in het midden weefsel dat in meer of minder mate oud, droog en verkurkt was en waaruit de bacterie niet geïsoleerd kon worden. Aan de randen bevonden zich verse uitbreidingsplekken, waaruit isolatie van de bacterie wel mogelijk was.

Via kwetsbare plekken in de bast (zoals beschadigingen door dieren, schuurplekken van langs elkaar bewegende takken, maaibeschatigingen, snoeiwonden, vorstbarsten, vertakkingen etc.) kunnen in het algemeen bacteriën de boom binnendringen en aantastingsplekken veroorzaken. In kasproeven bleken zaailingen eenvoudig geïnfecteerd te raken via oppervlakkige prik- of schraapwondjes in de bast. Ook wondjes die ontstaan bij het verwijderen van bladeren (vergelijk windschade) bleken een goede invalspoort voor de bacterie. Een vernevelde bacterieoplossing gaf 100% infectie van de beschadigde plekken op de

zaailingen. Van lenticellen is niet vast komen te staan dat deze als mogelijke toegangspoort voor de *P. syringae* bacterie fungeren.

Pseudomonas syringae lijkt epifytisch op de boom en in regenwater in de omgeving van zieke bomen aanwezig. De bacterie is geïsoleerd en geïdentificeerd uit enkele bladeren, takken, bloemen en verschillende onderdelen van de vruchten. Vervolgonderzoek is nodig om hier meer inzicht in te krijgen. Uit het overlevingsonderzoek kwamen aanwijzingen naar voren dat de bacterie ook enkele maanden op houtsnippers en bladeren zouden kunnen overleven. Het huidige beheersadvies over de te nemen maatregelen bij aangetaste bomen om eventuele verspreiding van de bloedingsziekte te beperken blijft vooralsnog gehandhaafd (<http://www.kastanjeziekte.wur.nl>).

In het najaar is onderzoek gedaan naar de mogelijkheid van overdracht van *Pseudomonas syringae* door insecten. De resultaten konden niet bevestigen dat insecten overbrengers zijn van de kastanjebacterie.

Binnen het onderzoek in 2006 is een serum ontwikkeld voor immunofluorescentie microscopie (IF-microscopie). Om betrouwbaarheid van het ontwikkelde serum te bepalen is deze gevalideerd. Het serum (titer en specificiteit) is geschikt bevonden voor de screening van zieke boommonsters op de aanwezigheid van de *Pseudomonas syringae* bacterie.

Resistentie

In het onderzoek naar de kastanjeziekte (2005, 2006) zijn er verschillen geconstateerd tussen de kastanjesoorten en -hybriden in vatbaarheid/gevoeligheid voor de kastanjeziekte. In infectieproeven met takken is gekeken welke soorten, cultivars en kruisingen van paardenkastanje vatbaar dan wel meer of minder gevoelig zijn en naar de fysiologische en histologische aspecten van verdedigingsmechanismen. Er kan voorlopig geconcludeerd worden dat *A. x mutabilis*, *A. flava*, *A. parviflora* en *A. pavia* niet (of tenminste minder) vatbaar lijken te zijn voor de bloedingsziekte in vergelijking met *A. hippocastanum*-cultivars. *A. turbinata* (Japanse soort die in Nederland niet voorkomt buiten arboreta) blijkt zeer gevoelig voor infectie na inoculatie.

Bij de verbruiningsreactie in de bast speelt het polyfenoloxidase-enzym een rol. Uit het fysiologisch onderzoek is gebleken dat er mogelijk een relatie bestaat tussen gevoeligheid van de kastanje en de aanwezigheid van dit enzym en/of zijn substraat (fenolen). Deze relatie zou de basis kunnen vormen voor een snelle screening van individuele bomen of zaailingen op de gevoeligheid voor de kastanjeziekte.

(A)biotische factoren

In 2005 en 2006 zijn inventarisaties van paardenkastanjes uitgevoerd onder de Nederlandse gemeenten om de ernst en omvang van de ziekte in beeld te krijgen en om te achterhalen onder welke groeiplaatsomstandigheden de ziekte het meest optreedt. Stressfactoren en hun invloed op de bloedingsziekte zijn echter nog onvoldoende bekend. In het onderzoek van 2007 is besloten om locaties uit de voorgaande inventarisaties meer gedetailleerd op groeiplaatsaspecten te onderzoeken.

Bomen met een goede conditie vertoonden minder aantasting door de bloedingsziekte dan bomen met een slechte conditie. Het is echter onduidelijk in hoeverre een minder goede conditie van de bomen een voorwaarde is voor aantasting, of een gevolg ervan. In het onderzoek was er veel variatie tussen individuele bomen en kon geen significant verband worden aangetoond tussen de mate van bloedingsziekte en factoren zoals droogtestress, zoutschade en standplaatsituatie. Ook aantasting door de bladvlekkenziekte (*Guignardia aesculi*) lijkt vooralsnog geen verband te houden met aantasting door de bloedingsziekte en lijkt als stressverhogende factor van ondergeschikt belang te zijn. Toch mag van beheersmaatregelen, die erop zijn gericht om de conditie van de bomen te verhogen, gemiddeld genomen eerder een positief dan een negatief effect worden verwacht.

Er zijn sterke aanwijzingen naar voren gekomen dat de mate van aantasting door de bloedingsziekte mede wordt bepaald door genetische verschillen tussen individuen van één soort.

Uit het groeiplaatsonderzoek in diverse gemeenten leek er geen verband te zijn tussen aantasting door de bloedingsziekte en besmetting met de paardenkastanjemineermot (*Cameraria ohridella*). Uit een oriënterende proef met losse takken bleek echter dat er mogelijk wel een verband is tussen de aanwezigheid van de kastanjemineermot en de kans op infectie met de kastanjabacterie. Het is wenselijk deze proef in een meer uitgebreide opzet uit te voeren.

Beheersing

Een mogelijke beheersmaatregel tegen uitbreiding van de bloedingsziekte is het tot stilstand brengen van fysiologische en biochemische processen in en rond de 'wonden', die het gevolg zijn van bacterie-aantasting. In 2005 is aangetoond dat een zichzelf versterkend proces van celafbraak en verbruining (PPO-cascade) kan leiden tot bloedingsverschijnselen. Een aantal stoffen blijkt in deze processen in te grijpen. Na selectie en testen van een aantal remstoffen (o.a. ascorbinezuur, cysteïne, citroenzuur en NaF) en combinaties hiervan in het laboratorium is een beperkt aantal behandelingen uitgekozen voor verder onderzoek.

Er is een biotoets ingezet met kunstmatig besmette zaailingen in de kas, waarbij is gekeken naar het effect van de remstoffen op de ziekteontwikkeling en naar morfologische effecten. Behandelingen met ascorbinezuur en een combinatie van ascorbinezuur, citroenzuur en cysteïne leken de uitbreiding van de ziekteontwikkeling te remmen. De behandelingen lijken tevens te resulteren in een verlaging van de PPO-activiteit.

In 2005 is een proef gestart langs de rondweg van de gemeente Houten. Hierin is gekeken of de remstoffen de symptomen van de bloedingsziekte kunnen vertragen of zelfs tot stilstand kunnen brengen. De waarnemingen aan de ontwikkeling van de ziekteverschijnselen van deze proefbomen zijn voortgezet in 2007. Terwijl de mate van aantasting van de bomen over het algemeen toenam van 2005 tot 2006, was in 2007 enig herstel te zien, ook bij onbehandelde bomen. Dit kwam tot uiting in een afnemende mate van aantasting en in callusvorming in de bastscheuren. Er kan nog geen eenduidige conclusie worden getrokken over het effect van remstoffen.

Communicatie

In 2007 heeft de werkgroep Aesculaap aandacht besteed aan actieve externe communicatie. Directe betrokkenen zijn geïnformeerd via een nieuwsbrief. Verder onderhoudt de werkgroep een eigen website, www.kastanjeziekte.wur.nl. 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 tevens uit de vele e-mails en telefoontjes van de zijde van de particulieren die het projectteam hebben bereikt. De meeste communicatie verloopt via de media. Kranten, radio en televisie blijken nog steeds belangstelling te hebben voor de kastanjeziekte en het onderzoek ernaar. Dat blijkt uit ruim 100 artikelen die dit jaar zijn verschenen en aandacht voor de ziekte in audiovisuele media. Daarbij is meestal de programmacoördinator als woordvoerder opgetreden.

Op basis van de behaalde resultaten in dit onderzoeksprogramma worden aanbevelingen gedaan voor verder onderzoek.

Summary

The horse chestnut bleeding disease is spreading across the Netherlands at an alarming rate. The disease, that affects the bark of the horse chestnut and may finally kill trees, has been found in all *Aesculus* species and is a national problem at this moment. It also appears to be present in other countries in urban greenery, woodlands and nurserystock. Over the last three years, the Dutch Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality has financed the research on the horse chestnut disease. A first research programme entitled '*Red de kastanje voor Nederland*' ('Save the chestnut tree for Holland') showed that the trees were possibly infected by bacteria from the group *Pseudomonas syringae*. This was confirmed in the follow-up research programme, '*Behoud de kastanje*' ('Preserve the chestnut'). In addition, research is being done into management and disease control strategies. Studies into the infection process showed that, underneath the outer bark, symptom development can remain invisible for a period of time before bleeding appears. The dispersal of the bacteria and influence of environmental factors (water supply, flooding, undergrowth) on disease development were also investigated. It is not yet clear whether infections start in young branches and spread to the trunk, or the other way around. In laboratory tests, a number of inhibiting agents (ascorbic acid, citric acid, cysteine, NaF) are able to block the browning process partially, if not entirely. These agents were also applied in a field experiment, starting in 2005. In 2006, the severity and extent of bleeding disease in the Netherlands had increased. Based on the recommendations from the previous research, a follow-up research programme '*Behoud de kastanje, deel 2*' ('Preserve the chestnut, part 2') started in August 2007. The aim of this programme was to find methods to control the horse chestnut bleeding disease and develop effective practical advice for urban green managers and arborists.

Epidemiology

Knowledge on the epidemiology of the disease is essential in order to develop effective disease control strategies. Research concentrated on anatomical changes of bark tissue during the development of the infection process and the reaction of the tree. Questions related to the penetrating of the bacteria in the tree, its spread within and outside the tree, the development of the infestation process and the anatomical and physiological reaction of the plant to the infection, need further answering.

In general, bacteria enter the bark through wounds (caused by animals, scouring branches, mowing, pruning, frost, etc.) and infect the tree from there. In greenhouse experiments, seedlings were easily infected by superficial punctures or scrape wounds in the bark. Also through scars on the twig left by blown off leaves bacteria could enter the plant. All small damages present on the seedlings bark resulted in 100% infection after spraying a bacterium suspension over the plants. High humidity of the ambient air enhanced the infection process. It was not yet established to what extent lenticells are possible entrances for the *P. syringae* bacterium.

After inoculation, two-year-old seedlings developed various visual symptoms: an uneven bark surface and bark cracks, upwards and downwards from the inoculation point. Bleeding was observed both at the infection point itself and, in some cases, at some distance from the point of entrance. In all cases degeneration of tissues was observed underneath the bark around the infection point. The internal symptoms consisted of dry, corky tissue in the centre of infection, out of which the bacterium could not be isolated any more. The margins of the infection showed active tissue out of which the bacteria could easily be isolated. Occasionally compartmentalization of the lesions was observed but inside the lesions the bacteria were still active. Therefore, visual healing of lesions may not yet be regarded as recovery of the tree from the disease. Healing of lesions, however, may slow down the disease progress within the tree. Both field observations and greenhouse observations revealed striking differences between individual trees in disease progress and healing of lesions, indicating the existence of genotypic variation within the species of *Aesculus hippocastanum*.

Research was done into the epiphytic occurrence of *Pseudomonas syringae* on diseased trees. Bacteria were isolated and identified from the surfaces of leaves and branches and out of flowers and various parts of the fruits. Bacteria were also detected in rainwater in the vicinity of diseased trees and bacteria could survive in woodchips and fallen leaves for a period of several months. More research is needed to get more insight in the significance of these findings in the framework of the epidemiology of the disease and to determine whether the current management advice for disease control needs to be adjusted (<http://www.kastanjeziekte.wur.nl>).

During an inventory in the autumn, the possible role of insects in transmitting the bacteria could not yet sufficiently be assessed.

A serum for detection of *Pseudomonas syringae* using immunofluorescence (IF) microscopy was validated. The titer and specificity of the serum proved to be suitable for screening wood samples for the presence of the bacterium.

Resistance

Previous research revealed differences in susceptibility and sensitivity to horse chestnut disease between species and hybrids of *Aesculus*. In an experiment on living branches of several species, cultivars and crossbreedings of *Aesculus* differences in disease development and physiological and histological aspects of their defence mechanisms after inoculation with *P. syringae* were studied. Preliminary results reveal that *A. x mutabilis*, *A. flava*, *A. parviflora* and *A. pavia* seem less or not at all susceptible to the bleeding disease, compared to cultivars of *A. hippocastanum*, whereas *A. turbinata* (a Japanese species, which only occurs in the Netherlands inside a few arboreta) showed high susceptibility for *P. syringae*.

The browning process in diseased bark is depending on the presence of an enzyme called polyphenol oxidase. The physiological studies indicate a possible correlation between the susceptibility of the tree and the presence of this enzyme and/or its substrate (phenols). This presumed correlation may be used for a quick screen of individual trees on susceptibility for horse chestnut disease in the future.

(A)biotic factors

Ongoing research in Dutch town districts into growing site factors may provide more insight into correlations between infection and various environmental characteristics, and also the vitality of trees. Trees with good physical condition showed less infection than trees with poor condition. However, it remained unclear to which extent poor tree vitality was conditional for infection or a result from infection. High variation was found in disease development between individual trees. No significant correlations were found between severity of infection and factors like drought, salt damage or soil conditions. Also the presence and rate of attack of biotic factors such as leaf blotch disease (*Guignardia aesculi*) or leafminer (*Cameraria ohridella*) seemed to have no influence on disease development. However, preliminary results from a greenhouse experiment with detached branches infested with *Cameraria ohridella* suggest a possible correlation with disease development by *P. syringae* and presence of *Cameraria*. Further research on this subject is needed. Control measures to enhance the vitality of trees are expected to have a positive effect on disease control rather than a negative effect. The observations also indicate that genotypic differences between individual trees of the same species contribute to the variability in disease severity.

Control measures

For controlling the spread of the disease within the tree once the bacterium has entered, it is important to impede the physiological and biochemical processes in and around the lesions. Clearly, the various components of the enzymatic browning process, such as polyphenol oxidase, are active in and underneath the bark, and it is possible to affect these reactions. A number of inhibiting agents with few known side effects (ascorbic acid, citric acid, cysteine) have been tested in the laboratory and appear to block the browning process partially, if not entirely. These substances have subsequently been tested in various concentrations and combinations on infected chestnut trees. In a bioassay with two-year old seedlings, ascorbic acid or a combination of ascorbic acid with citric acid and cysteine, inhibited disease development and suppressed polyphenol oxidase activity. In a field experiment, which started in 2005 in the city of

Houten (the Netherlands), the inhibiting agents however showed no consistent results. In 2006, severity of disease even increased in most trees, despite the treatments. Nevertheless, in 2007, some recovery was observed in both treated trees and untreated trees. The recovery was noticeable as a reduction of disease symptoms and the formation of callus around the lesions of necrotic bark. No conclusion can be drawn thus far on the efficacy of the inhibiting agents under field conditions.

Communication

The working group Aesculaap is maintaining contact with tree experts, advisors on urban greenery, researchers, city policymakers, landscapers, and urban green managers. In 2007, all people concerned were informed of the latest results by means of a news letter and the website of the working group (www.kastanjeziekte.wur.nl). This site is also has an English version and contains all relevant and new scientific information on horse chestnut disease and the results of research coordinated by Aesculaap. The website is frequently visited by a broad variety of interested and dedicated people, both professionals and individual citizens. The need for accurate and up to date information of a wide audience is also demonstrated by the overwhelming amount of phone calls and emails to the project coordinator from private individuals and institutions. News papers, radio and television media have also showed serious interest for the disease.

Aanbevelingen voor vervolgonderzoek

Om te komen tot een goed praktijkmanagementadvies voor de kastanjeziekte is vervolgonderzoek nodig. De aanbevelingen hieronder hebben betrekking op voortzetting van eerder ingezette onderzoekslijnen en op een aantal nieuwe aspecten die uit het onderzoek van 2007 naar voren zijn gekomen.

Epidemiologie

- Uit het dit jaar uitgevoerde onderzoek blijkt (nogmaals) dat de *Pseudomonas syringae* bacterie uit verschillende aangetaste delen van de boom is te isoleren. De bacterie lijkt ook epifytisch op de boom aanwezig. Hij is op enkele bladeren, takken, bloemen en vruchten aangetroffen. Bovendien is de bacterie aangetroffen in spoelwater dat langs de buitenkant van bomen naar beneden loopt en in regenwater in de omgeving van zieke bomen. Dit kan gevolgen hebben voor de beheersstrategie. Uitgebreider onderzoek is nodig om dit te bevestigen en tevens een beter beeld te krijgen over het voorkomen van de bacteriën (ook op gezonde bomen), de bacterieconcentratie die van nature voorkomt en de minimale bacterieconcentratie die nodig is voor infectie. Bloemen zijn over het algemeen een goede vermeerderingsplek voor de micro-organismen. Hier zou primaire aantasting kunnen plaatsvinden, die van invloed kan zijn voor de epifytische bacterieconcentratie.
- Ontwikkeling van ziekteproces onder gecontroleerde droge en vochtige kasomstandigheden met als accenten, verspreiding van de bacterie vanuit de inoculumplaats in de stam van de zaailing.
- De aanwezigheid van de bacterie in verschillende onderdelen van de ontwikkelende vrucht vraagt om nader onderzoek naar de zaadoverdraagbaarheid van de *Pseudomonas syringae* bacterie.
- Om de overdracht van de *P. syringae* bacterie door insecten te kunnen onderzoeken is het van belang om jaarrond insecten te verzamelen. In 2007 is het onderzoek echter pas in augustus van start gegaan. Bacteriën uit de groep van de *Pseudomonaden* werden algemeen aangetroffen op de verzamelde insecten, echter niet de *P. syringae* bacterie. Voortzetting van dit onderzoek is nodig om ook insecten die in het voorjaar (o.a. tijdens de bloei) een rol kunnen spelen bij de verspreiding van de ziekte te bemonsteren.
- Kleine verwondingen zijn voldoende voor de bacterie om binnen te dringen. Van natuurlijke openingen zoals lenticellen mag worden verwacht dat ze ook een ingang kunnen vormen. Dit is in het onderzoek echter nog niet aangetoond. Vervolgonderzoek is noodzakelijk om hierin meer duidelijkheid te krijgen.

Resistentie

- In het onderzoek met gebruik van losse takken is gebleken dat er verschillen zijn tussen de kastanjesoorten, cultivars en -hybriden in vatbaarheid/gevoeligheid voor de kastanjeziekte. Voorzetting van het resistentieonderzoek met zaailingen en/of takken van zoveel mogelijk verschillende soorten zal hier meer inzicht in moeten geven.
- Uit het onderzoek naar de invloed van groeiplaatsfactoren zijn bovendien sterke aanwijzingen naar voren gekomen dat de aard en ernst van aantasting door de bloedingziekte mede wordt bepaald door genetische verschillen tussen de individuen van één soort (*A. hippocastanum*). Genotypische variatie m.b.t. de vatbaarheid voor kastanjeziekte kan van belang bij het selecteren van uitgangsmateriaal en de effectiviteit van beheersmaatregelen. Nader onderzoek zou hierin inzicht kunnen verschaffen.
- Bij de verbruiningsreactie in de bast speelt het polyfenoloxidase-enzym een rol. Uit het fysiologisch onderzoek is gebleken dat er mogelijk een relatie bestaat tussen gevoeligheid van de kastanje en de aanwezigheid van dit enzym en zijn substraat. Deze relatie zou de basis kunnen vormen voor een snelle screening (Polyfenoloxidase kleuringstoets) op de gevoeligheid voor de kastanjeziekte. Op basis van de resultaten kan wellicht worden vastgesteld in hoeverre het de moeite loont om binnen de soort te zoeken naar voldoende resistent uitgangsmateriaal voor de teelt en toepassing van de (witte) paardenkastanje in het openbaar groen.

Biotische factoren

- De aanwezigheid van insecten, zoals de kastanjemineermot, vergroot mogelijk de kans van infectie. Echter door de korte proefperiode, de tijd van het jaar en het geringe aantal herhalingen kon het bewijs hiervoor nog niet worden geleverd. Het is wenselijk deze proef opnieuw uit te voeren.
- De door de bloedingsziekte veroorzaakte bastwonden vormen een makkelijke ingang voor houtparasitaire schimmels (houtrot). De praktijk leert dat veel bomen vroegtijdig worden gekapt omdat de bomen onveilig worden als gevolg van dergelijke secundaire aantastingen. Er zijn sterke aanwijzingen dat vooral bomen die weinig wondovergroeiingsweefsel vormen sneller en heviger worden aangetast door houtrot dan bomen met een grotere mate van wondweefselvorming. Onderzoek naar deze (veronderstelde) relatie, d.m.v. dissectie van bomen met en zonder callusweefsel in diverse stadia van aantasting door de bloedingsziekte kan hierop een betrekkelijk snel antwoord geven en leidt hoe dan ook tot relevante informatie voor het beheersadvies.

Beheersing

- Het onderzoek heeft aanwijzingen opgeleverd dat bepaalde remstoffen effect kunnen hebben op de mate van aantasting van een boom. Voortzetting van het onderzoek in biotoetsen (op zaailingen en/of takken onder droge en vochtige omstandigheden) en onder praktijkomstandigheden (Houten) moet leiden tot beter inzicht in de effectiviteit van de remstoffen en toepasbaarheid (frequentie, toedieningsmethode etc.) in het openbaar groen.
- De bestaande database met de monitoringsgegevens van de praktijkproef in Houten bevat zeer veel informatie. Omdat de kastanjeziekte nog relatief nieuw is, is het zeer waardevol om het monitoren voort te zetten (vervolgen van natuurlijk ziekteverloop en lange termijn effecten van de behandelingen). Verdergaande statistische analyse van de gegevens kan meer informatie verschaffen over het (natuurlijke) verloop van de kastanjeziekte en de effecten van remstoffen hierop.
- Er zijn in de loop van het onderzoek sterke aanwijzingen naar voren gekomen dat maatregelen die de conditie van de bomen verhogen de kans, omvang en ernst van een aantasting kunnen verminderen. Door meerdere gemeenten zijn in dit kader al groeiplaatsverbeteringsproeven uitgevoerd of zijn initiatieven ontwikkeld om dit op korte termijn te gaan uitvoeren. Gezien de betrekkelijk lange termijn waarop hiervan effecten zijn te verwachten ligt het niet voor de hand om groeiplaatsverbeteringsproeven in het onderzoekprogramma mee te nemen. Wel kunnen er activiteiten worden ontwikkeld om de diverse initiatieven vanuit het onderzoek dat binnen Aesculaap wordt uitgevoerd te begeleiden, zodat de proeven wetenschappelijk voldoende onderbouwd zijn, beter op elkaar kunnen worden afgestemd en daarmee een beter kader opleveren aan onderling vergelijkbare resultaten.

Samenwerking

Internationale afstemming van het onderzoek van Aesculaap.

1 Inleiding

In Nederland, maar ook in andere landen, worden de paardenkastanjabomen *Aesculus hippocastanum* bedreigd door de kastanjeziekte. De ziekte blijkt snel om zich heen te grijpen en het lijkt erop dat er grote schade ontstaat als er geen actie wordt ondernomen. Beeld- en sfeerbepalende bomen zullen verdwijnen uit stadsgezichten en landschappen. Vanaf de eerste berichten dat de kastanjeziekte zich op grote schaal voordoet in Nederland is gebleken dat onder de media en het grote publieke daarvoor veel belangstelling en zorg bestaat. Verwacht mag worden dat die belangstelling blijft omdat beseft wordt dat we te maken hebben met een ernstig probleem en vooral gemeenten en particuliere bomenbezitters naarstig uitkijken naar een mogelijke remedie.

Aesculaap, een samenwerkingsverband van onderzoekers, gemeenten en boomverzorgers, coördineert al sinds 2005 het onderzoek naar de kastanjeziekte. Een groot aantal deskundigen vanuit verschillende disciplines, ook uit het buitenland, is betrokken bij het onderzoek. In 2005 is, in opdracht van het ministerie van LNV, onderzoek gestart gericht op het opsporen van de oorzaak van de ziekte en het vaststellen van de ernst en omvang van de ziekte in Nederland. Uit dit onderzoek kwam in juli 2006 naar voren dat een bacterie uit de *Pseudomonas syringae*-groep de veroorzaker is van de kastanjeziekte ('Red de kastanje in Nederland, 2005; 'Behoud de kastanje', 2006). Vervolgens is het onderzoek gericht op het vinden van mogelijke oplossingsrichtingen voor het beheersen van de kastanjeziekte.

Resultaten 2006

Om meer inzicht te krijgen in het ziekteverloop en aangrijpingspunten te vinden voor bestrijding van de ziekte, is de ontwikkeling van het infectieproces en de reactie van de boom daarop anatomisch gevolgd. Er is gekeken hoe de bacteriën zich binnen en buiten de boom verspreiden en langs welke route. Hiertoe zijn zowel proeven met zaailingen ingezet als periodiek bomen geveld. Bestudering van het ziekteproces liet zien dat uitbreiding van de infectie zich voor langere tijd onder de beschermende bast aan het oog kan onttrekken. Verder bleek dat het geen verschil maakte of een boom oppervlakkig of dieper geïnjecteerd werd; binnen twee weken zijn de eerste ziekteverschijnselen al zichtbaar. Resultaten van onderzoek naar een eventuele rol van insecten geven echter voldoende aanleiding hier extra aandacht aan te besteden in het vervolgtraject.

In vijf 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. Hieruit bleek dat verschillen in conditie vooral zijn terug te voeren op tekorten in de stikstofvoorziening en dat bomen met de slechtste stikstofvoorziening gemiddeld genomen het zwaarst zijn aangetast. Overige onder- en bovengrondse groeiplaatsfactoren, waaronder plantplaatsomstandigheden, windinvloeden, as-oriëntatie van een bomenrij, bleken in dit onderzoek geen aantoonbare invloed te hebben op de mate van aantasting door de bloedingsziekte.

Als mogelijke beheersmaatregel tegen uitbreiding van de bloedingsziekte is het van belang om het bloeden te vertragen of te stoppen. Na selectie en testen van een aantal remstoffen (o.a. ascorbinezuur, cysteine, citroenzuur en NaF) en combinaties hiervan in het laboratorium is een beperkt aantal behandelingen uitgekozen voor onderzoek op zaailingen in de kas. Op een buitenlocatie waren de effecten van geteste remstoffen wisselvallig. Hoewel behandeling met citroenzuur en ascorbinezuur in een aantal gevallen resulteerde in beter uitziende bomen en minder ziekteverschijnselen, zijn de resultaten te grillig om onomstotelijk positieve effecten toe te schrijven aan deze remstoffen. NaF geeft relatief goede resultaten wanneer het in een pasta op de wonden wordt aangebracht. Het onderzoek naar de effecten van behandelingen is nog niet afgerond.

Een in kastanjabomen gevonden virus blijkt algemeen voor te komen en door heel Nederland verspreid te zijn. Waarschijnlijk behoort het virus tot de familie Flexiviridae. Wanneer dit met zekerheid is vastgesteld, kan onderzocht worden of het virus een rol speelt in de bloedingsziekte en kan ook een beter beeld verkregen worden over de precieze verspreidingswijze van dit virus.

Afgelopen jaar zijn enkele tientallen meldingen binnengekomen van bloedingen in andere boomsoorten (berk, beuk, eik, els, esdoorn, linde), waarvan de symptomen lijken op die bij de paardenkastanje. Uit

onderzoek is gebleken dat de *Pseudomonas* bacterie die voorkomt bij de kastanjeziekte niet aanwezig is bij bloedingen in andere boomsoorten.

Een tweede landelijke inventarisatie toonde aan dat de verspreiding over Nederland niet gewijzigd is ten opzichte van 2005. Het westen en midden van het land zijn zwaar getroffen; in het zuidoosten ligt het aantastingsniveau aanzienlijk lager. Het gemiddeld percentage zieke bomen is gestegen van 31% naar 40% en er blijkt een lichte verschuiving te zijn van “licht” naar “zwaar” aangetast. Helaas zijn alle *Aesculus*soorten vatbaar voor de bloedingsziekte. Opmerkelijk is dat de *Aesculus pavia* en de *Aesculus flava*, beide minder voorkomend in Nederland, minder vatbaar lijken te zijn. Nader onderzoek zal hier meer inzicht in moeten geven.

Onderzoeksrichtingen 2007

In het door Aesculaap uitgebrachte eindrapport ‘Behoud de kastanje’ (2006) is de stand van zaken van het onderzoek gepresenteerd betreffende een eerste aanzet voor het vinden van mogelijke oplossingsrichtingen voor het beheersen van de kastanjeziekte. In dit rapport zijn aanbevelingen gedaan voor verder onderzoek. Op basis hiervan is een nieuw onderzoeksprogramma 2007 samengesteld waarin onderzoek naar het vinden van mogelijke oplossingsrichtingen voor het beheersen van de ziekte wordt voortgezet.

Dit eindrapport ‘Behoud de kastanje, deel 2’ beschrijft de stand van zaken betreffende het vervolgonderzoek naar de kastanjeziekte.

In hoofdstuk 2 wordt de programmaorganisatie beschreven voor de uitvoering van het onderzoek. De onderzoeksprojecten worden beschreven in hoofdstuk 3.

In het eerste onderzoeksproject (paragraaf 3.1) wordt een vervolg gegeven aan het in 2006 ingezette epidemiologisch onderzoek. Allereerst is de initiatie en eerste ontwikkeling van het ziekteproces aan zaailingen bestudeerd. Vervolgens zijn zieke bomen geveld voor het onderzoeken van de ziekteontwikkeling en het vinden van mogelijke vectoren voor verspreiding. Ook is er ingegaan op mogelijke invalspoorten voor de bacterie. Er is gekeken naar natuurlijke en kunstmatig aangebrachte invalspoorten. Insecten kunnen mogelijke overdragers zijn van de *Pseudomonas syringae* bacterie. Hier is nader onderzoek naar gedaan. In 2006 is een serum ontwikkeld voor immunofluorescentie microscopie. De betrouwbaarheid hiervan is gevalideerd in paragraaf 3.1.5.

Paragraaf 3.2. behandelt het aspect resistentie. Het is van belang te weten welke soorten en cultivars van paardenkastanje resistent dan wel meer of minder vatbaar zijn. De fysiologische en histologische aspecten van vatbaarheid/resistentie zijn bestudeerd.

De invloed van (a)biotische factoren is beschreven in paragraaf 3.3. Er is bekeken in hoeverre er een verband is tussen de conditie van de bomen en de mate waarin ze door de kastanjeziekte zijn of worden aangetast. In dit onderzoek is onder andere meegenomen de invloed van groeiplaatsaspecten, de eventuele invloed van aantasting van de boom door insecten (o.a. kastanjemineermot) als mogelijke stressverhogende factor en beheermaatregelen.

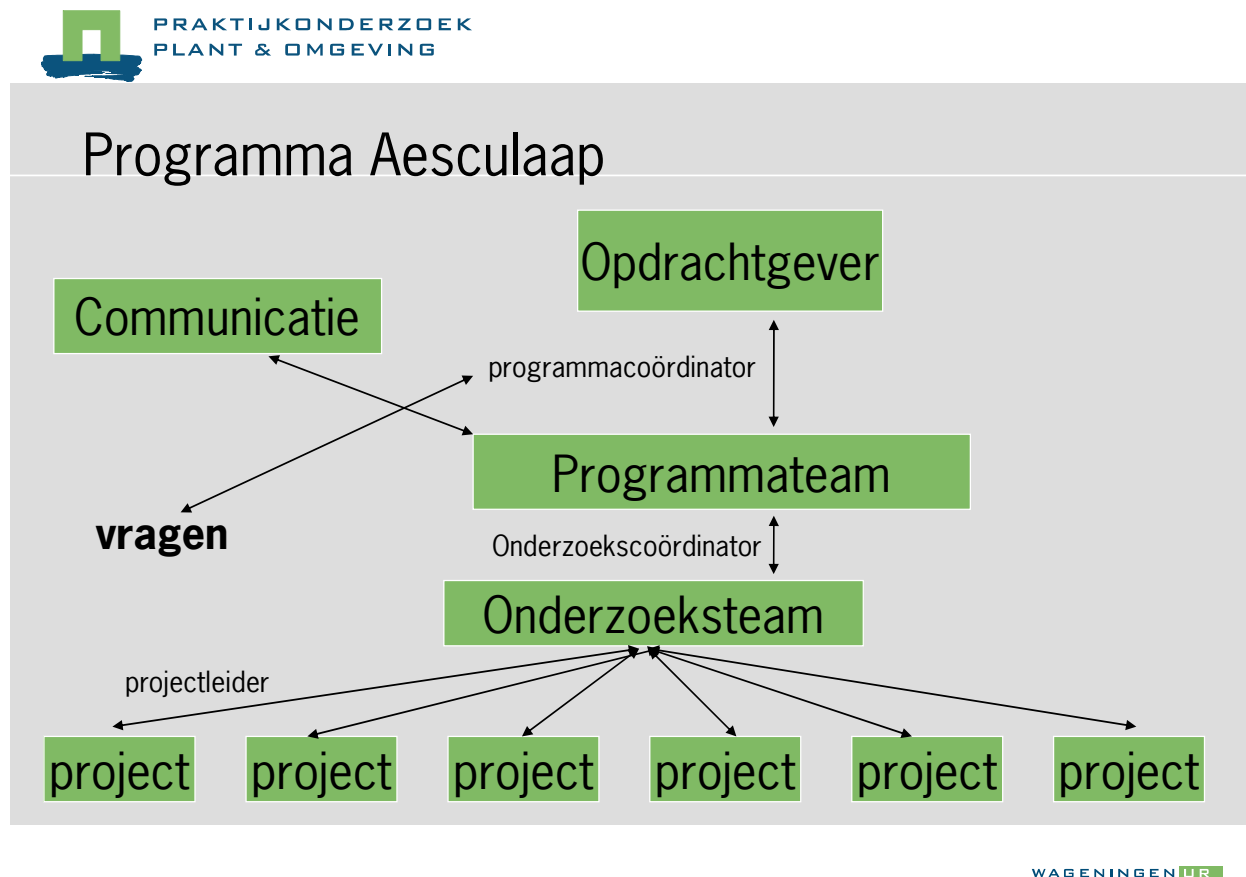
In paragraaf 3.4 wordt ingegaan op het verkrijgen van epidemiologische kennis om te komen tot een effectief praktijkadvies om de kastanjeziekte te beheersen. De effecten van wondbehandelingsmiddelen tegen de kastanjeziekte zijn op toetsplanten en in het veld gevolgd.

In het laatste hoofdstuk (hoofdstuk 4) wordt de communicatie van de onderzoeksresultaten beschreven.

Alle bevindingen van dit onderzoeksprogramma zijn gebruikt om te komen tot aanbevelingen voor verder onderzoek naar het beheersen van de kastanjeziekte (hoofdstuk ‘Aanbevelingen’).

2 Programmaorganisatie Aesculaap

De programmaorganisatie is schematisch weergegeven in figuur 1.



Figuur 1: Programma-organisatie

2.1 Opdrachtgever

Het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV), directie Natuur is als opdrachtgever tevens eigenaar van dit programma. De programmacoördinator heeft haar verantwoording rechtstreeks afgelegd aan haar contactpersoon bij het ministerie van LNV.

2.2 Programmacoördinatie

De programmaorganisatie wordt aangestuurd door een programmateam onder leiding van de programmacoördinator. Het team heeft zorg gedragen voor de bewaking van samenhang tussen de verschillende organisatieonderdelen (communicatie, klankbord, onderzoeksteam) en de programmaplaning en resultaten zowel naar binnen als naar buiten toe.

Samenstelling programmateam:

- programmacoördinator (PPO) : Marijke Dijkshoorn-Dekker
- gemeente Den Haag : Leendert Koudstaal
- gemeente Haarlemmermeer : Rudolf Stelpstra
- gemeente Houten : Geerten Kalter
- gemeente Utrecht : Wim de Graaf
- gemeente Amsterdam : Hans Kaljee
- Onderzoekscoördinator (PPO) : Gera van Os
- onderzoeker (Alterra) : Jitze Kopinga
- onderzoeker (Groenadvies Amsterdam) : Bart Stoffer

Het programmateam is in totaal 5 maal bijeen geweest.

2.3 Het onderzoeksteam

Het onderzoeksteam heeft zorg gedragen voor een goede bewaking en samenhang tussen de verschillende onderzoeksprojecten. Het onderzoeksteam is maandelijks bijeen geweest om de inhoudelijke voortgang met elkaar te bespreken. Het team bestaat uit de volgende personen:

Dr. Ir. Gera van Os (PPO), Ir. Jitze Kopinga (Alterra), Ing. Martin Verbeek (PRI), Dr. Jaap Janse (PD), Drs. Alexander van Beuningen (PD), Maria José Villalón, MSc. (PD), Dr. André van Lammeren (Laboratorium Plantencelbiologie, Botanisch Centrum, WUR), Prof. Dr. Linus van der Plas, (Leerstoelgroep Plantenfysiologie WUR), Diaan Jamar (Leerstoelgroep Plantenfysiologie, WUR), Leo Slingerland (PPO), Dr. ir. Ria Derkx (PPO), Bart Stoffer (Groenadvies Amsterdam), ir. Margareth Hop (PPO), ing. Henk Kieft (WUR), Jacquelinga Donkers (WUR); Suzanne Breeuwsma (PPO), P. van Deventer (PRI), I. de Vries (PRI) en O. Mendes (PRI).

2.4 De onderzoeksprojecten

Ieder onderzoeksproject is vertegenwoordigd door een projectleider. Zij maken tevens onderdeel uit van het onderzoeksteam. In een onderzoeksproject hebben meerdere onderzoeksorganisaties vanuit hun deskundigheid deel genomen.

Het onderzoeksplan bestaat uit de volgende vier onderzoekslijnen:
Epidemiologie, Resistentie, (A)biotische factoren en Beheersing.

2.5 Het communicatieteam

Het communicatieteam wordt aangestuurd door de programmacoördinator. Het communicatieteam werkt faciliterend aan het programmateam. De communicatiegroep is verantwoordelijk voor het naar buiten brengen van onder andere persberichten, vakbladartikelen, actuele stand van zaken. Het team is klein en slagvaardig gehouden. Het Ministerie van LNV is voornamelijk op de hoogte gehouden door Marijke Dijkshoorn-Dekker.

Samenstelling communicatieteam:

- | | |
|--------------------|--|
| PPO Boskoop | Marijke Dijkshoorn-Dekker, coördinator en woordvoerder |
| Wageningen UR | Bouke de Vos |
| Gemeente Den Haag | Mariëtte Pasman |
| PD | Manon Leenders |
| Ministerie van LNV | |

3 Onderzoeksprojecten

3.1 Epidemiologie

3.1.1 Analyse initiatie en eerste ontwikkeling ziekteproces

Projectleider: Dr. André van Lammeren (WUR)

Projectmedewerkers: Henk Kieft (WUR), Jacqueline Donkers (WUR), Suzanne Breeuwsma (PPO)

Inleiding

Om meer inzicht te krijgen in het ziekteverloop en aangrijpingspunten te vinden voor bestrijding van de ziekte, 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. Tevens is er in 2006 een gevoelige serologische detectiemethode ontwikkeld waarmee de bacterie kan worden aangetoond en waarmee bacterie-isolaten geïdentificeerd kunnen worden. In het hier beschreven onderzoek zal het ziekteproces verder anatomisch en cytologisch worden bestudeerd waarbij twee snelle immunologische detectie methoden worden toegepast. Vragen daarbij zijn hoe verspreiden de bacteriën zich in de boom en langs welke route, hoe ontwikkelt het ziekteproces zich en hoe reageert de plant op de infectie?

Materiaal en methoden

Anatomisch volgen van ontwikkeling ziekteproces

In juni 2007 werden 18 paardenkastanjezaailingen (2-3 jarig) geïnfecteerd met de *P. syringae* isolaten PD5126 en PD4818, met water of helemaal niet. De infectie werd uitgevoerd d.m.v. injectie, het maken van incisies en het aanbrengen van schaafwondjes. Op diverse tijdstippen zijn de zaailingen gefotografeerd en bemonsterd. Per waarnemingen werden meerdere planten bekeken. Voor de anatomische analyse zijn stengeldelen van 2-3 cm lengte met een snoeischaar gemonsterd en vervolgens gefixeerd in een mengsel van 3% paraformaldehyde, 0.05% glutaraldehyde in 0,1M fosfaatbuffer, pH 7.0. Coupes zijn gemaakt met een sledemicrotoom, gespoeld in buffer en ingesloten in glycerine gelatine voor observatie met de lichtmicroscop.

Immunocytochemische detectie van *Pseudomonas syringae*

Voor de immunologische detectie van *Pseudomonas syringae* in geïnfecteerde weefsels is dezelfde procedure gevolgd als in 2006. Coupes met een dikte van 20-30 μm zijn eerst gespoeld in buffer, dan 5 min geïncubeerd in 0,1M hydroxylammoniumchloride (HONH_2Cl), vervolgens gespoeld en 30 min geïncubeerd in 1% bovine serumalbumine (BSA-fractie V), nogmaals gespoeld en overnacht geïncubeerd met antiserum tegen *P. syringae* in verdunning 1:500. Het antiserum is opgewekt tegen het PRI1-isolaat van *Pseudomonas syringae* (eindrapport 'Behoud de Kastanje', 2006) en geconjugeerd met FITC (anti-PRI1-FITC). Bacterie-reincultures van *P. syringae* en *E. coli* zijn gebruikt om specificiteit van het antiserum te testen (PRI- antilichaam). Voor validatie van het antilichaam: zie onderdeel 3.1.5.

Voor een snelle serologische detectie van *P. syringae* in geïnfecteerd weefsel is tevens gebruik gemaakt van 'tissue printing' op nitrocellulosemembraan. Van het te onderzoeken weefsel werd een vlak aangesneden en gedurende 3 minuten op een droog nitrocellulosemembraan gedrukt. Hierna werd het membraan 1 min gefixeerd in 3% paraformaldehyde, gespoeld, geïncubeerd met 1% BSA-fractie V, gespoeld, en geïncubeerd in anti-PRI1-FITC (1:500). Het nitrocellulosemembraan werd ingesloten in Citifluor glycerol en met fluorescentiemicroscopie geanalyseerd.

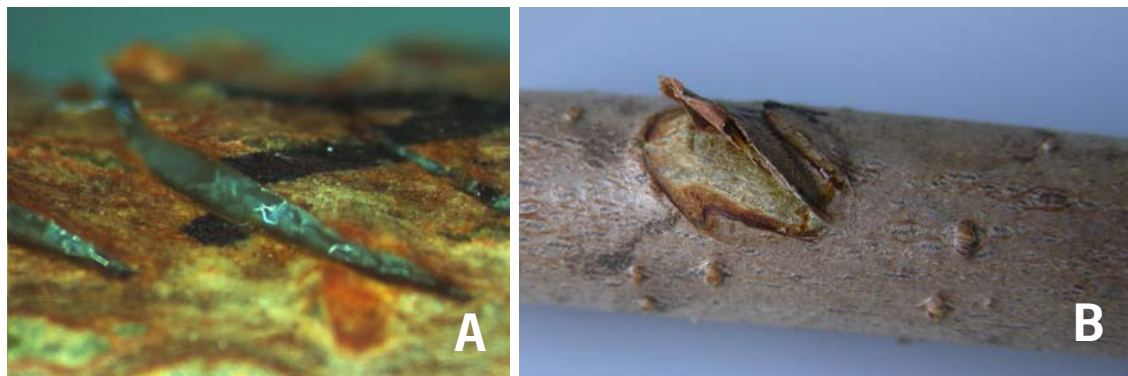
Om na te gaan of *P. syringae* met de transportstroom door het xyleem wordt getransporteerd is een

gebladerde tak afgesneden en in een bacteriesuspensie gezet. Een vergelijkbare tak op vaas met een waterige oplossing van eosine (1-2%) is gebruikt om wateropname zichtbaar te maken.

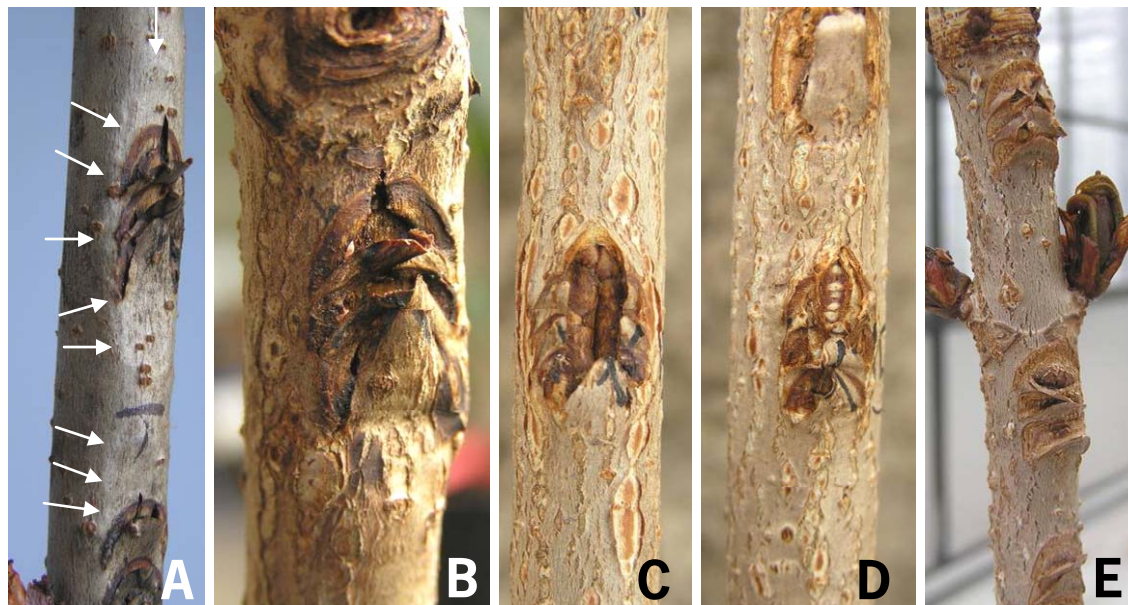
Resultaten en discussie

Effect van infectie met P. syringae van paardenkastanjezaailingen

Als 2-3 jarige zaailingen op sneden op de stam geïnfecteerd worden met *P. syringae* is na twee weken exudaatvorming te zien (Figuur 2A). Bij controleplanten waarbij de wond alleen met water of buffer is behandeld treedt in twee weken wondheling op (Figuur 2B).



Figuur 2: Wondreacties bij paardenkastanjezaailingen twee weken na inoculatie met *P. syringae* (A) of met water (B). In A is sterke exudaatvorming te zien waarbij bacteriën zijn aangetoond terwijl bij B wondherstel optrad.



Figuur 3: Overzicht van wondreacties in individuele zaailingen van paardenkastanje 2 á 3 maanden na infectie met *Pseudomonas syringae*. A, B, C: Geinoculeerd met PD 5126. D: Geinoculeerd met PD4818. E: Geinoculeerd met buffer (controlebehandeling).

Merk op dat de controle veel wondweefsel vormt (E) maar dat ook geïnfecteerde stammetjes (B, C en D) herstel vertonen. A vertoont geen herstel en het weefsel rondom de inoculatieplaats is sterk ingevallen door necrose-uitbreiding (pijltes).

Het verloop van de infectie is in de tijd gevolgd. Na twee tot drie maanden is er bij geïnfecteerde planten enige variatie in de wondontwikkeling waargenomen. Altijd ontstonden necrotische plekken ter plaatse van de inoculatie. Schors en bastweefsel degenereerden volledig en houtweefsel werd vanaf de buitenzijde

zichtbaar. Echter na langere tijd konden er 'spontaan' herstelreacties optreden. Het wondoppervlak werd dan opnieuw bedekt doordat zijdelings van de wond nieuw secundair weefsel werd gevormd dat over de wond heen groeide. Figuur 3 geeft voorbeelden waarbij planten geïnfecteerd met PD5126 verschillende mate van wondherstel vertoonden. In Figuur 3A is er in het geheel geen herstel waar te nemen en is het weefsel rondom de inoculatieplaats sterk ingevallen door necrose-uitbreiding (aangegeven met pijltjes), terwijl in Figuur 3B-D verschillende maten van herstel te zien zijn. In dergelijke planten zijn vaak nog wel bacteriën aan te tonen met immunocytochemie en kan het ziekteproces inwendig voortgaan. Figuur 3E toont een controleplant die alleen verwond was maar niet geïnfecteerd. Als reactie trad nooit necrose op maar volledig wondherstel.

Bij het infecteren van zaailingen en het succes van een infectie spelen meerdere factoren een rol. Een van de factoren die uiteindelijk als belangrijk naar voren kwam, was de luchtvochtigheid. Een hoge luchtvochtigheid verhoogt de kans om een infectie te krijgen van de kastanjezaailingen. Het feit dat de luchtvochtigheid tijdens de uitvoering van het experiment niet optimaal is geweest, kan hebben bijgedragen aan het waarnemen van herstelreacties van zaailingen. Om deze reden zijn er later in het experiment ook planten overgebracht naar kassen met een hoge luchtvochtigheid. Hier bleek dat alle planten ziekteverschijnselen toonden.

Immunocytochemische detectie van Pseudomonas syringae

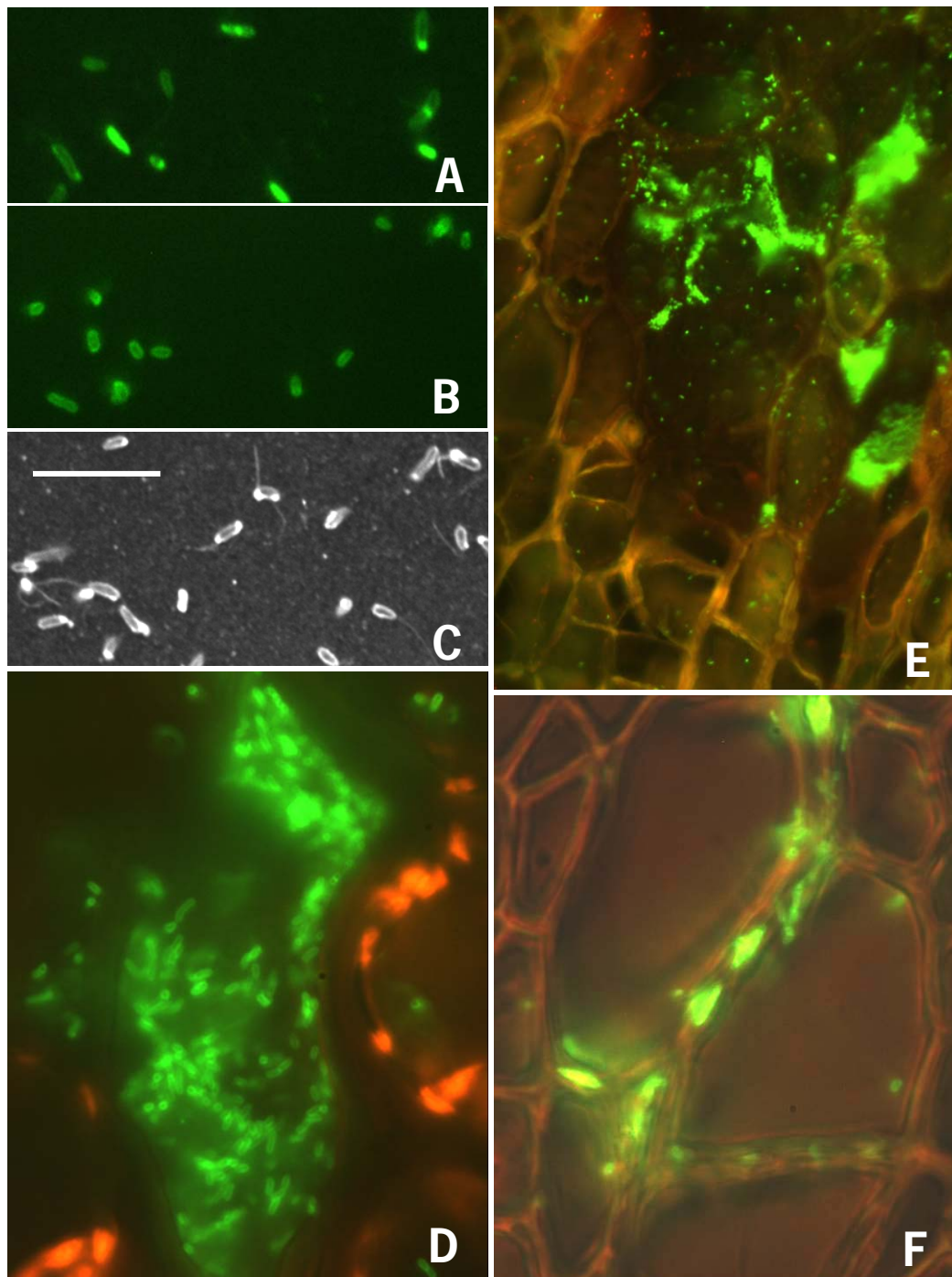
Geïnfecteerde zaailingen zijn getoetst op aanwezigheid en distributie van *P. syringae*. De procedure van immunocytochemische detectie is eerst getest op *P. syringae* bacteriën (isolaten PD4818 en PD5126) en *E. coli* in suspensie. Alleen *P. syringae* werd fluorescent (Figuur 4A). Bacteriën hadden een lengte van 2-3 micrometer.

Pseudomonas syringae kon snel gedetecteerd worden in weefsels door gebruik te maken van tissue printing technieken waarbij de bacteriën hechten aan nitrocellulosemembraan, waarna ze immunocytochemisch gelabeld werden. Figuur 3B is daarvan een voorbeeld.

Hechting van *Pseudomonas syringae* (isolaten PD4818 en PD5126) op microscoopglasjes gecoat met poly-L-lysine en visualisatie met CLSM gaf een beeld van de flagellen van *P. syringae* (Figuur 4C). In suspensiecultuur is hun beweeglijkheid gekwantificeerd. Ze bewogen met een snelheid tot 20 micrometer per seconde.

Ten slotte zijn bacteriën in weefselcoupes gedetecteerd. Binnen 10 dagen na de infectie werden ze teruggevonden in intercellulaire holtes van het nog levende schorsparenchymweefsel grenzend aan de wond (Figuur 4D). Later, als de paardenkastanje afsluitingsweefsel om een geïnfecteerd gebied had aangelegd, konden in het 'buitengesloten gebied' nog bacteriën worden aangetroffen (Figuur 4E). Ze bevonden zich dan in principe 'ex-planta'. Zij zijn hier tot het einde van de waarnemingen (3 maanden na infectie) aangetroffen. Ter plaatse van een verwonding werden bacteriën ook in het xyleem aangetroffen, zij het in kleine hoeveelheden. Soms werden ze gedetecteerd in houtstraalparenchymcellen of de intercellularen ervan, en soms in houtvaten. Figuur 4F toont enkele houtvaten waarbij de groen fluorescerende bacteriën zijn ingevangen in de hofstippels in de celwanden van aanliggende houtvaten.

Met een wateropname-experiment is nagegaan in hoeverre bacteriën met de xyleemwaterstroom meegevoerd werden als een afgesneden gebladerde tak in een bacteriesuspensie werd gezet. Dat dergelijke takken binnen het uur water opnamen tot in de bladeren was in een parallelexperiment vastgesteld waarbij de tak in een eosineoplossing was gezet. Met tissue-printing is vastgesteld dat ondanks snel opgaand watertransport, bacteriën niet verder konden komen dan enkele centimeters vanaf de plaats van wateropname. Op 4 cm afstand werden nog veel bacteriën gedetecteerd, op 10 cm geen enkele. Xyleem vormde blijkbaar een barrière voor verticaal transport van bacteriën, waarschijnlijk omdat de hofstippels aan de uiteinden van houtvaten de doorgang belemmerden (zie Figuur 3E).



Figuur 4: Overzicht van *P. syringae* gevisualiseerd met FITC-gelabelde polyclonale antilichamen opgewekt tegen PRI-1 isolaat. Bacteriën lichten groen op. Chloroplasten in D zijn rood gekleurd en peridermwefsel in E vertoont oranje autofluorescentie. A. *P. syringae* uit suspensie op objectglas met polylysine coating; B. *P. syringae* op nitrocellulose-membraan; C. *P. syringae* uit suspensiecultuur gehecht aan een poly-L-lysine gecoat objectglas, geobserveerd met CLSM; Maatstreep is 10 µm. D. Weefselcoupe met *P. syringae* in intercellulaire ruimten in de schors van paardenkastanjezaailingen; E. Weefselcoupe met *P. syringae* in ingesloten necrotische gebieden in de bast van paardenkastanjezaailingen; F. Weefselcoupe met *P. syringae* geobserveerd in houtvaten van het xyleem van paardenkastanjezaailingen.

Conclusies

- Immunocytochemie is geschikt voor specifieke detectie en lokalisatiestudies van *P. syringae*.
- Met behulp van opnameproeven en tissue printing kon worden aangetoond dat de bacteriën niet via watertransport worden verspreid.
- Inoculatie leidt op korte termijn tot exudaatvorming en op langere termijn tot necrose ter plaatse van de verwonding, indien geen tussentijds wondherstel optreedt.
- Uitbreiding onder de oppervlakte leidt tot verdere bacterieverspreiding om de wond met als gevolg necrose en invallen van het stamoppervlak.
- Er zijn opmerkelijke verschillen tussen zaailingen in mate van het optreden van wondherstel. Dit kan duiden op genotypische variatie.

3.1.2 Overleving

Projectleider: Drs. Alexander van Beuningen (PD)

Projectmedewerkers: Maria José Villalón, MSc. (PD), Dr. Jaap Janse (PD)

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 factoren, die bijdragen aan de ziektedrukverhoging en uitbreiding van de ziekte. Van verwante *Pseudomonas syringae* pathovars zijn onderzoeksgegevens bekend, die als uitgangspunt dienen voor epidemiologisch onderzoek. Voor dit onderzoek werden er zieke bomen geveld voor het bestuderen van de ziekteontwikkeling en het vinden van mogelijke vectoren voor verspreiding.

Hygiënische beheersmaatregelen kunnen van belang zijn om verdere uitbreiding van de kastanjeziekte af te remmen. Van belang is te weten in welke substraten de bacterie kan overleven. Te denken valt aan de overleving van de bacterie in de bodem (vanuit regenwater wat langs de boom naar beneden sijpelt), in dood houtmateriaal (een versnipperde boom), bladeren, plantresten en de overleving van de bacterie op gereedschappen, die worden gebruikt voor snoeiwerkzaamheden en de kap van bomen. Verschillende overlevingsscenario's zijn getest door materialen te inoculeren en onder verschillende condities te bewaren. Daarnaast is bacteriedetectie uitgevoerd op de besmette materialen uit de praktijk (onder praktijk omstandigheden).

Materiaal en methoden

Om de verspreiding van de *Pseudomonas syringae* bacterie vast te stellen, zowel in en op de boom als in en op insecten, werd er vrijwel maandelijks een natuurlijk zieke boom met vermoedelijke bloedingsziekte geveld en nauwkeurig geanalyseerd op de verspreiding van bloedingsplekken, de aanwezigheid van de *Pseudomonas syringae* bacterie en op het voorkomen van (besmette) insecten rond/in de aantastingsplekken. Dit onderzoek is het vervolg van de in 2006 gestarte studie langs de Rondweg en op de gemeentewerf in de Gemeente Houten. Gedurende een looptijd van 9 maanden (hiervan resteren nog 6 maanden omdat het onderzoek van 2007 pas in juni kon beginnen) werd maandelijks 1 aangetaste boom geveld en onderzocht op symptomen.

In de maand juni t/m oktober 2007 werd zesmaal een aangetaste boom onderzocht en werden op de praktijklocatie Houten waarnemingen en isolaties verricht. De geveldde bomen werden geschild en er werden monsters genomen om de verspreiding van *Pseudomonas syringae* door de boom vast te stellen. Waargenomen symptomen werden fotografisch vastgelegd. Verder werden voorkomende insecten

verzameld in de kroon van de geveldde bomen en in de buurt van geïnfecteerd bastweefsel (zie verder paragraaf 3.1.4). Ook werd er materiaal verzameld om hiervan in het laboratorium zowel spoel- en overlevingsmonsters in te zetten.

In juni 2007 werd de bemonstering voor het onderzoek van dat jaar hervat met boom 06 van de Rondweg. Resultaten van de boombemonstering van boom 1-5 zijn opgenomen in het verslag van onderzoek in 2006. De codering van bomen gaat door met volgnummer van de in 2006 onderzochte bomen. In de maand juli had de Gemeente Houten niet gepland bomen te rooien op de Rondweg. Het was wel mogelijk een keuze te maken van bomen van een andere locatie op de gemeentewerf. Van de ter beschikking gestelde bomen werden de enige twee bomen gekozen die wel, zij het twijfelachtige, symptomen vertoonden (boom 07 en boom 08). De resterende drie bomen in 2007 (boom 09, boom 10 en boom 11) waren wel weer afkomstig van de Rondweg.

Van alle zes geveldde bomen werden 30 willekeurige takken gesnoeid voor epyfitisch onderzoek. Dit werd uitgevoerd met spoelmonsters van verschillende onderdelen: bloemen (indien aanwezig), bloeiwijzen, bladeren, knoppen en takjes. Van elke boom werden steeds één blad en maximaal vijf takstukjes van 2,5 cm per tak ingezet. Alle bloemen, bloeiwijzen en knoppen (kruislings ingesneden) van de 30 gesnoeide takken werden geanalyseerd. Hiervoor werden de verzamelmonsters per monstertype in PB (0,05 M) met Tween-20 (200ul/L), gedurende minimaal 20 minuten geweekt en de zodanig verkregen spoelmonsters uitgekweekt op Levan agar en King's medium B.

In het kader van het overlevingsonderzoek werd van boom 09 extra blad materiaal verzameld en in een koelcel (4 °C) bewaard om hiervan later op verschillende tijdstippen (één keer per maand) spoelmonsters te analyseren. Tevens werd voor hetzelfde doel van boom 09 en boom 10 aangetaste schors en bastweefsel verzameld en bewaard op een koele, droge plek.

Om te onderzoeken of de bacterie op gereedschap kan overleven, werden de messen, die voor de bemonstering gebruikt zijn, in buffer gespoeld. De buffer werd vervolgens uitgeplaat om de aanwezigheid van de *Pseudomonas syringae* bacterie vast te stellen.

Als aanvulling op het overlevingsonderzoek werden tijdens regenbuien regenwatermonsters verzameld in de buurt van de aangetaste kastanjabomen van het Arboretum Belmonte in Wageningen. De monsters werden genomen door het afdruipende water van bladeren, takjes, vruchten en stam apart op te vangen. Hiernaast werd regenwater uit de lucht opgevangen dat niet direct in contact was geweest met bomen uit de omgeving.

In Arboretum Belmonte in Wageningen werden monsters uit bloemen, takjes, stam en verschillende onderdelen van ontwikkelende vruchten genomen. De monsters werden in het laboratorium onderzocht op de aanwezigheid van de *Pseudomonas syringae* d.m.v. uitplaten op King's medium B en Levan agar. Typische kolonies werden reingekweekt en geïdentificeerd met vetzuuranalyse, BOX-PCR en, immunofluorescentie microscopie m.b.v. het recent ontwikkelde en gevalideerde serum (onderdeel 3.1.5 voor voorlopige identificatie).

Resultaten en discussie

Alle bemonsterde bomen van dit onderdeel van het onderzoek vertoonden, in meer of minder mate, symptomen van natuurlijke aantasting van de bloedingsziekte.

Gevelde bomen

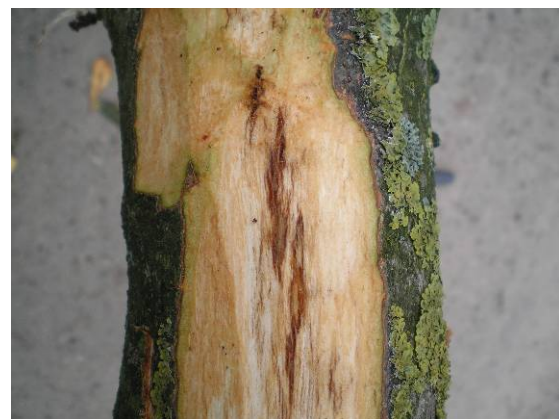
Boom 6, met een hoogte tussen 10-11 meter, was bemonsterd in de maand juni en liet meerdere duidelijke “actieve” symptomen over de hele lengte van de stam (ca. 4 m) zien. Van de hoofdstam werden er bij aantastingsplekken zes bast- en houtmonsters genomen op de grens van ziek en gezond weefsel. Hiervan waren er drie positief voor de *Pseudomonas syringae* bacterie. Vanaf de basis van de boom tot een hoogte van ongeveer 2 meter werden meerdere actieve plekken geconstateerd. Dit zijn verse (niet verkurkte) aantastingsplekken waaruit nog uitbreiding plaatsvindt. De activiteit per plek verschilde, maar ze waren allemaal met elkaar verbonden (Figuur 5). Op een hoogte rond 3 meter waren alleen zeer oude symptomen waarneembaar. Uitwendig waren dit grote diepe barsten met wondherstel (callus)weefsel. Na afschillen van de schors bestonden de symptomen uit oude, droge en verkurkte plekken. Uit dit soort weefsel was het niet mogelijk de bacterie te isoleren. Deze afgestorven plekken zijn oude aantastingsplekken van eerdere jaren. Uit deze boom werden er 15 takmonsters met symptomen ingezet. Slechts bij twee monsters werd verdachte groei waargenomen op isolatieschalen. Hieruit werd de *Pseudomonas syringae* bacterie geïsoleerd. De resterende monsters uit de andere takken gaven of helemaal geen groei of zeer weinig groei van niet-typische bacteriën te zien op de isolatieschalen. Een van de positieve monsters kwam uit een tak op ca. 4 meter hoogte en met een doorsnede van ca. 10 cm. Uitwendig vertoonde deze tak in de lengte een barst. Na afschillen was er een duidelijke uitbreiding in het bastweefsel zichtbaar (Figuur 6, 7). Deze aantastingsplek stond niet in verband met andere plekken. Het tweede positieve isolaat was afkomstig uit een andere tak die ook van ongeveer 4 meter hoogte kwam. De plek bevond zich aan de basis van de tak en bevatte delen met verschil in “aantastingsactiviteit”.



Figuur 5: Actieve aantastingsplekken met elkaar verbonden in boom 6.



Figuur 6: Gesteltak (10 cm doorsnee) van kastanje met bloedingsziekte verschijnselen. Uitwendige barst in de lengte van de tak.



Figuur 7: Gesteltak van kastanje met bloedingsziekte verschijnselen. Inwendige uitbreiding.

In juli werden er twee bomen geveld, boom 7 en boom 8. Beide bomen kwamen uit dezelfde standplaats op de gemeentewerf en waren jonger dan de rest van de bemonsterde bomen in dit onderzoek (gemiddeld 25 jaar). Ze waren ongeveer 15 jaar oud. Beide bomen hadden een lengte van ca. 4,5 m. Deze twee bomen werden twee keer eerder beoordeeld en in beide gevallen werd er verschil in activiteit van bloedingsplekken waargenomen. De eerste keer dat de bomen bekeken werden, eind november 2006, was een kleine

bloeding op elke boom zichtbaar. Maanden later, medio maart 2007, werden de bomen opnieuw bekeken en de bloedingsplekken waren toen niet meer zichtbaar. Toen de bomen in juli geveld werden, waren de plekken opnieuw duidelijk aanwezig. In boom 7 werd een bloedingsplek in de stam op ca. 80 cm hoog (Figuur 8) aangetroffen. Na afschillen bleek de plek "vers" maar zeer klein (ca. 1,5 cm²) te zijn. Bij boom 8 waren slechts op een klein deel van de stam (iets hoger dan 0,5 meter) verse kleine bloedingsplekken zichtbaar (Figuur 9). De meest actieve hiervan bevonden zich naast een oude herstelde wond en een oude vertakking. Uit geen van de bast- en houtmonsters of takken, die bemonsterd waren, was het mogelijk de *Pseudomonas syringae* bacterie te isoleren. Er was opvallend weinig bacteriegroei op de isolatieschalen en er werden geen verdachte kolonies aangetroffen.



Figuur 8: Zeer kleine plek (ca. 1,5 cm²) op de stam van boom 7, ca. 80 cm hoog



Figuur 9: Aantastingsplek (ca. 1,5 cm²) op de stam van boom 8, ca. 0,5 m hoog

De laatste week van juli werd boom 9 geveld. Deze boom bevatte oude herstelde bemonsteringsplekken over de hele lengte van de stam. Geconstateerd werd dat deze boom bemonsterd is voor het Aesculaaponderzoek, binnen het onderdeel "Parasitair onderzoek", in 2005. Van de bijna 3 meter lang stam, werden actieve bloedingsplekken tot een hoogte van ca. 2 meter aangetroffen. Alle oude bemonsteringsplekken vertoonden herstelweefsel (Figuur 10). Bij het afschillen van de schors rond de oude bemonsteringsplekken bleek dat ze centraal gelegen waren in een inwendige, grotere uitbreidingsplek. De kern van deze grote plekken was oud, droog, verkurkt weefsel, terwijl de actieve randen bestonden uit verse aantastingen te herkennen aan nat, roodverkleurd, necrotisch weefsel (Figuur 11). Er werden 14 bast- en houtmonsters genomen waarvan uit 12 de *Pseudomonas syringae* bacterie kon worden geïsoleerd. De twee negatieve monsters waren afkomstig van de oudere plekken. De positieve monsters zijn zowel in het buitenste deel van de aantastingsplek genomen, dat is op de grens van ziek en gezond weefsel, als meer binnen in de plek (ouder deel van een uitbreidingsplek). Uit al deze monsters was het mogelijk de bacterie te isoleren (in tegenstelling tot de oude, droge en verkurkte plekken waaruit dit, zoals eerder gemeld, niet mogelijk was). Na het afschillen van de boom bleken alle bloedingsplekken bijna over de hele lengte en omtrek van de stam met elkaar verbonden. Doordat de aantastingsplekken niet overal tot aan het cambium doorliepen, was de sapstroom kennelijk niet volledig afgesloten (Figuur 12). Van boom 9 werden drie takken met symptomen bemonsterd. De enige die positief was geworden kwam uit de basis van een vertakking in de boom (ca. 2 meter hoog), die actieve bloeding vertoonde. De andere twee waren al twijfelachtig op het moment van monsteropname, gezien dat de ene aantasting erg oppervlakkig was en de andere meer een beschadiging (met weefselverkleuring) leek te zijn, die ontstaan was tijdens de kap. Na uitplaten van het verkregen extract en incubatie van de schalen werd de *Pseudomonas syringae* bacterie dan ook niet geïsoleerd.



Figuur 10: Herstelweefsel bij oude bemonsteringsplekken op de stam van boom 9.



Figuur 11: Oude bemonsteringsplekken op de stam van boom 9 na afschillen met herstelweefsel en verse uitbreiding.



Figuur 12: Alle bloedingsplekken op de stam van boom 9 bijna over de hele lengte en omtrek van de stam met elkaar verbonden.

Boom 10, ca. 8,5 meter hoog, toonde een groot vitaliteitsverschil in de takken van de kroon. Deze zag er voor de helft gezond en voor de andere helft zeer slecht uit (Figuur 13). De achtergebleven groei van de takjes hield verband met de verminderde sapstroom. Dit werd duidelijk na afschillen van bastweefsel waaruit bleek dat de aantastingsplekken in verbinding stonden met de minder vitale takken in de kroon. Het vitaliteitsverschil was ook te zien aan de bladeren van deze takken (Figuur 14).



Figuur 13: Duidelijk vitaliteitsverschil tussen de takken van de kroon van boom 10.



Figuur 14: Verschil in bladgrootte tussen takken uit de kroon van boom 10.

Uit de stam werden vijf monsters genomen, waarvan er vier positief waren. Twee van de positieve monsters werden genomen uit een deel van de stam waaruit dit seizoen nieuwe uitlopers waren gevormd. De basis van de uitlopers toonde een actieve bloedingsplek, maar na het afschillen werd duidelijk dat de actieve aantastingsplek niet doorliep in de jonge takjes. Het is wel mogelijk dat, in de loop van de tijd, de infectie verder in de takjes dringt. Dit is namelijk waargenomen bij twee andere vertakkingsplekken in de hoofdstam waar, na het afschillen van de schors, zichtbaar werd dat de infectie verder was doorgedrongen in de jonge takjes (Figuur 15). Deze twee takjes werden bemonsterd en de *Pseudomonas syringae* bacterie werd hier succesvol uit geïsoleerd. Op de isolatieschaal van de eerste tak werden ca. 100 typische kolonies gevonden, terwijl uit de tweede tak meer dan 1000 typische kolonies werden aangetroffen. Echter, de bacterie kon niet worden geïsoleerd uit bastweefsel dat onderdeel uitmaakte van de stam aan de basis van de genoemde vertakkingsplekken. Verder in de kroon werd een tak, van ca. 10 cm in doorsnede en op een hoogte van ca. 6 meter, bemonsterd op twee verschillende plaatsen waar externe symptomen van bloedingsziekte zichtbaar waren. Slechts één van de monsters gaf een positief isolatie-resultaat.



Figuur 15: Vertakking op ca. 2 m hoogte met kleine bloedingsplek op basis van tak (ca. 2,5 cm in doorsnede); 5 cm verder in de tak een kleine bloedingsplek met een uitbreiding van ca. 10 cm na afschillen.

Boom 11, met een hoogte van ca. 8 meter, werd bemonsterd in oktober. Tijdens deze laatste bemonsteringsdag in oktober waren er bij opvallend veel bomen aan de Rondweg in Houten zichtbare takinfecties, die recent waren ontstaan. Bij boom 11 waren over de gehele lengte van de stam uitwendig aantastingsplekken te zien, die in mate en activiteit verschilden. In dit geval werden er bloedingsplekken tot 7 meter hoog in de takken van de kroon aangetroffen. Deze boom werd op een andere wijze dan de vorige bomen bemonsterd. Nu werd alleen uit de stam een monster genomen voor bevestiging van de aanwezigheid van de bacterie. Dit monster was helaas negatief. De rest van deze stam werd in schijven van ca. 5 cm dikte gezaagd. Hierin was duidelijk te zien dat de diepte van de aantasting verschilde, in sommige gevallen raakte dit het cambium, terwijl dit vaak ook niet het geval was (Figuur 16). Uit de kroon werden negen takken gezaagd, waarvan er later zes in het laboratorium zijn ingezet. De *Pseudomonas syringae* bacterie werd slechts in één geval geïsoleerd. Een mogelijke verklaring voor de geringe isolatie van *P. syringae* is dat er veel saprofytische bacteriën op de isolatie schalen aanwezig waren, die de groei van de *Pseudomonas syringae* bacterie kunnen onderdrukken. IF-microscopie met deze extracten kan de aanwezigheid van de *syringae*-bacterie mogelijk bevestigen. Hiervoor moeten eerst de resultaten van de prestatie van het serum in de serumvalidatie afgewacht worden.



Figuur 16: Een duidelijk diepteverschil van de aantasting. De linker pijl wijst naar een aantasting, die het cambium raakt, de rechter naar een meer oppervlakkige aantasting.

Epyfitisch onderzoek

Zoals in *Materiaal en methoden* is vermeld, werden er van alle zes geveld bomen monsters ingezet voor epyfitisch onderzoek. Uit deze spoelmonsters werd de *Pseudomonas syringae* bacterie een aantal malen geïsoleerd en geïdentificeerd. Van boom 7 (bemonsterd in juli) waren de (necrotische) bloeiwijzen positief (met ca. 500 typische kolonies). De bladmonsters van boom 9 (bemonsterd in september) werden op verschillende tijdstippen ingezet en de bacterie werd in twee gevallen aangetoond, met ca. 700 en meer dan 1000 typische kolonies. De eerste keer direct na de bemonstering en de tweede 15 weken later. De epyfitische aanwezigheid van de bacterie werd ook aangetoond bij bladmonsters uit boom 10 (bemonsterd in september) en boom 11 (bemonsterd in oktober). In dit geval werden respectievelijk ca. 750 en ca. 500 kolonies aangetroffen. Om er zeker van te zijn dat deze epyfitische bacterie-isolaten ook infectieus zijn, zullen hiermee in een later stadium infectieproeven met zaailingen worden uitgevoerd.

Overleving

Van de overlevingsmonsters uit aangetast schors- en bastweefsel van boom 9 en boom 10 werd de bacterie succesvol geïsoleerd, respectievelijk 12 en 8 weken na verzamelen van de monsters. Na de bemonstering van boom 9 werd op het laboratorium ook buffer geanalyseerd, die gebruikt was om de bemonsteringsmessen te spoelen. Het bleek niet mogelijk de bacterie hieruit te isoleren.

Arboretum Belmonte

Uit de in Arboretum Belmonte verzamelde regenwatermonsters werd de *Pseudomonas syringae* bacterie geïsoleerd uit het afdruipende water van takjes, vruchten en regenwater uit de lucht (dat niet direct in contact is geweest met bomen). Het tellen van kolonies werd bemoeilijkt door het hoge aantal saprophyten dat op de isolatieschalen groeide. In de gevallen dat de kolonies wel telbaar waren, waren dit ca. 1000 kolonies per schaal. De bacterie werd ook aangetoond (steeds meer dan 1000 kolonies per monster) bij monsters van bloemetjes, bloemstengeltjes en verschillende onderdelen van ontwikkelende vruchten (te weten: het vaatweefsel van de bolster, onder de stekels van de bolster, de ontwikkelende zaadhuid van de kastanje, het aanhechtingpunt van stengel/kastanje, het zaad en de zaadlob). Tevens werd de bacterie gevonden in monsters van bloeiwijzen met aangetaste, ontwikkelende vruchten en in de lenticellen van dezelfde bloeiwijzen. Bij de lenticelmonsters was maar in één geval sprake van een duidelijke infectie met isolatie van meer dan 1000 kolonies.

Discussie en conclusies

Uit het dit jaar uitgevoerde onderzoek blijkt dat de *Pseudomonas syringae* bacterie uit verschillende aangetaste delen van de boom redelijk eenvoudig is te isoleren. De bacterie lijkt ook epifytisch op de boom (bladeren, takken en vruchten) en in regenwater in de omgeving van zieke bomen aanwezig. Het feit dat de bacterie ook uit bloemen succesvol geïsoleerd is, duidt erop dat deze mogelijk een goede vermeerderingsplek voor de micro-organismen kunnen zijn. Hier zou primaire aantasting kunnen plaatsvinden. Dit wordt bevestigd door de isolatie van de *Pseudomonas syringae* bacterie uit verschillende delen van ontwikkelende vruchten. De aanwezigheid van de bacterie in verschillende onderdelen van de vrucht vraagt om een nader onderzoek om de zaadoverdraagbaarheid van de *Pseudomonas syringae* bacterie te bestuderen. Verder zullen bloemen nog meer in detail onderzocht moeten worden om deze gedachtegang te onderbouwen.

Na de primaire aantasting kan het inoculum met regenwater uit de bloemen gespoeld worden en mee naar beneden stromen. Via kwetsbare plekken in de bast (zoals beschadigingen door dieren, schuurplekken van langs elkaar bewegende takken, maaibeschadigingen, snoeiwonden, vorstbarsten, vertakkingen etc.) kan de bacterie de boom binnendringen en aantastingsplekken (kankers) veroorzaken. De kankers in de stam zouden op deze wijze dus een secundaire aantasting zijn. Gezien het aantastingspatroon en ontwikkeling van de bloedingsplekken, is het voorstelbaar dat, in eerste instantie, het externe bastweefsel aangetast wordt. Onder voor de bacterie gunstige omstandigheden kan deze aantasting uitbreiden tot aan het cambium. Als dit gebeurt wordt deze laag permanent beschadigd en kunnen als gevolg hiervan geen nieuwe lagen floëem en xyleem meer worden gevormd. Als het cambium over de gehele omtrek van de boom is aangetast en afgestorven, is de verbinding tussen het wortelsysteem en de kroon onderbroken. Dit resulteert uiteindelijk in het volledig afsterven van de boom.

Iedere keer dat een actieve bloeding werd afgeschild, was de inwendige aantasting veel groter dan de uitwendige bloedingsplek. Bij het afschillen van de bast rond de bloedingsplekken was er bijna altijd een centraal gedeelte dat in meer of minder mate oud, droog en verkurkt weefsel bevatte en verse uitbreidingsplekken aan de randen. Uit het oude weefsel was het niet mogelijk de bacterie te isoleren. Vermoedelijk zijn deze afgestorven plekken oude aantastingsplekken. De verkurkte plekken zijn vermoedelijk gemaakt als reactie op de activiteit van de *Pseudomonas syringae* bacterie. Soms treedt hierdoor de stop van verdere uitbreiding van de aantastingsplekken op. In dat geval heeft dit afsluitingsweefsel de infectieuze plekken blijkbaar plaatselijk kunnen inkapselen. Het is aannemelijk dat bomen uit een jongere leeftijdsgroep hogere activiteit vertonen en hierdoor beter in staat zijn de *Pseudomonas syringae* bacterie in te kapselen

en daarmee primaire aantastingen tegen te gaan. Dit kan een mogelijke reden zijn dat jongere bomen minder vaak zijn aangetast. Wat betreft de bomen in de oudste leeftijdsgroep, deze kunnen, als ze eenmaal zijn aangetast, langer leven omdat hun bastweefsel (floëem) uit veel meer lagen bestaat, waardoor het voor de bacterie moeilijker is de cambiumlaag te bereiken en daarmee onherstelbare schade te veroorzaken

Het overlevingsonderzoek lijkt erop te duiden dat de *Pseudomonas syringae* bacterie tenminste enkele maanden op houtsnippers en bladeren kan overleven. Het voorgestelde beheersadvies op de internetpagina van Aesculaap (<http://www.kastanjeziekte.wur.nl>) om eventuele verspreiding van de bloedingsziekte te voorkomen, lijkt hiermee dus gegrond. Snoeiwerkzaamheden en maaischade moeten zo veel mogelijk worden beperkt en het is raadzaam om wondbehandeling met afdekmiddelen toe te passen, teneinde het aantal invalspoorten voor de bacterie te beperken. Ondanks het feit dat de isolatie uit spoelbuffer van bemonsteringsgereedschap niet is gelukt, is het raadzaam om alle gebruikte gereedschappen na werkzaamheden aan paardenkastanje bomen en bij wisseling van boom te ontsmetten.

3.1.3 Invalspoorten

Projectleider: Drs. Alexander van Beuningen (PD)

Projectmedewerkers: Maria José Villalón, MSc. (PD), Dr. Jaap Janse (PD)

Inleiding

Het bestuderen van het ziekteproces kan het beste worden uitgevoerd in een toetsplantensysteem, waarbij toetsplanten onder kascondities worden onderworpen aan een infectie door inoculatie met *Pseudomonas syringae*. In dit onderzoek is in kasproeven de mogelijkheid van verspreiding door de lucht en infectie (vanuit aanwezig inoculum/door verneveling) via al dan niet natuurlijke openingen bij zaailingen onderzocht. Het onderzoek is ingezet op basis van de kennis verkregen uit in de literatuur beschreven epidemiologische factoren voor de verspreiding van *Pseudomonas syringae*.

Voor verspreiding moet gedacht worden aan wind (inoculum aan stof of aanwezig in aerosolen), slagregen en hagel en insecten. Invalspoorten in kastanjabomen zijn mogelijk lenticellen, bladlittekens, beschadigingen van de bast door weersomstandigheden (vorstschade: inwerking van vorst of windschade: de schurende werking van bewegende takken, takbreuk, bliksem etc.) of dieren (vogels, insectenvraat, etc.). Ook kan verspreiding plaatsvinden via versnipperd, geïnfecteerd boommateriaal of bastmateriaal afkomstig van bloedende bomen.

Mogelijke invalspoorten voor de bacterie kunnen door middel van fysieke schade worden aangebracht. Invalspoorten kunnen gecreëerd worden door kerven in de bast, verwijderen van bladeren (bladlittekens) en conditionering van de omgeving waardoor lenticellen open komen te staan. De gegevens uit deze kasproeven kunnen belangrijk zijn voor het bepalen van de haalbaarheid van beheers- en bestrijdingsmaatregelen.

Materiaal en methoden

In een kasexperiment met 2-3 jaar oude zaailingen (40 per behandeling) van witte paardenkastanje werd op een drietal manieren potentiële invalspoorten gecreëerd voor infectie door *Pseudomonas syringae*. Deze behandelingen waren:

1. Handmatig verwijderen van bladeren, waardoor subtiele verwonding ontstaat.
2. Handmatig beschadigen van oppervlakkig bastweefsel.
3. Induceren van hoge luchtvochtigheid, waardoor de lenticellen gaan openstaan.

Het handmatig beschadigen (behandeling 2) van oppervlakkig bastweefsel van de zaailingen werd uitgevoerd m.b.v. een steriel scalpel (oppervlakkige schraapwonden) en een steriele naald (10 willekeurige oppervlakkige prikwonden).

Voordat de inoculatie uitgevoerd werd, waren de zaailingen, gedurende 24 uur in een omgeving met lage luchtvochtigheid (ca. 70-75%) geconditioneerd. In deze periode hebben de zaailingen ook geen water gekregen. Net voor de inoculatie was de kas geconditioneerd d.m.v. een watervernevelaar tot een luchtvochtigheid boven de 85%. Deze procedure vergroot de kans van opname van bacterie-inoculum door de boom. Deze omstandigheden van hoge luchtvochtigheid zijn voor behandeling 1 en 2 gehandhaafd gedurende de eerste maand na inoculatie. Bij behandeling 3 zijn de omstandigheden van hoge luchtvochtigheid tot de beëindiging van de proef gehandhaafd teneinde de lenticellen zoveel mogelijk open te houden. Verder is er geen conditionering van temperatuur of verlichting uitgevoerd behalve het dicht houden van het schermdoek om direct zonlicht te weren en daarmee hoge temperaturen tijdens de zomermaanden te voorkomen.

Direct na conditionering werd er een inoculum met een dichtheid van *Pseudomonas syringae* van (ca. 10^7 cfu.ml⁻¹) over de planten gespoten met behulp van een plantenspuit. De bacteriesuspensie werd gemaakt van isolaat PD 4818 uit paardenkastanje (48 uur oude cultuur op Nutriënt agar, gekweekt bij 28°C), dat werd opgelost in steriele fosfaat buffer (PBS 0,01 M and pH 7,2). De inoculaties werden een week later herhaald. Gezien het uitblijven van ziektesymptomen in het geval van overdracht via de lenticellen is de inoculatie, ongeveer een maand later, op dezelfde wijze nogmaals herhaald. Na deze laatste behandeling zijn de bomen ca. twee weken onder plastic met veel water gehouden.

Per behandeling zijn 40 planten ingezet. Op gezette tijden, gedurende ca. 21 weken, werden de planten beoordeeld om symptoomvorming nauwkeurig vast te leggen. De waargenomen symptomen werden gefotografeerd en monsters verzameld voor screening op de fysiologische en histologische aspecten (zie paragraaf 3.1.1). Aan het eind van de proef zijn herisolaties uit de geïnfecteerde zaailingen gemaakt op King's medium B en Levan agar. Typische kolonies werden reïngekweekt en geïdentificeerd met vetzuuranalyse en BOX-PCR. Overleving van de bacterie op bladmateriaal is onderzocht a.h.v. analyse van spoelmonsters.

Resultaten en discussie

Verwijdering van bladeren

Twee weken na inoculatie werd exudaat aangetroffen bij de bladlittekens van twee zaailingen, maar na de isolatie en identificatieprocedure kon de *Pseudomonas syringae* bacterie hierin niet worden aangetoond.

Visuele beoordeling van de zaailingen 8 weken na inoculatie toonde externe symptoomuitbreiding vanaf het bladlitteken. Het oppervlak van de stammetjes was bobbelig misvormd in de lengte van het boompje. Dit geeft aan dat de activiteit van het cambium verstoord is geweest. Er werden ook een soort kleine bloedingen aangetoond, 1-3 cm vanaf het inoculatie punt, en kleine barstjes in een lengte van 10 cm. (Figuur 17, 18, 19). Het herstelweefsel rond de littekens van de verwijderde bladeren toonde een zwarte inwendig verkleuring (doorzichtig) (Figuur 20).



Figuur 17, 18, 19: Visuele beoordeling van de zaailingen 8 weken na inoculatie met zichtbaar verstoorte cambiumactiviteit (figuur 17), kleine bloeding 3 cm vanaf het inoculatiepunt (figuur 18) en kleine barstjes op een afstand van 10 cm vanaf het inoculatiepunt (figuur 19)



Figuur 20: Herstelweefsel rond de littekens van de verwijderde bladeren met zwart inwendig verkleuring.

Bij het inzetten van monsters voor herisolatie werd in de meeste gevallen een uitbreiding geconstateerd van 10-15 cm naar beneden vanaf het inoculatie-punt. De aantasting, in de vorm van glazig tot necrotisch weefsel, liep vanuit het bastweefsel door tot aan het houtweefsel (Figuur 21, 22). De bacterie werd 21 weken na inoculatie positief teruggeïsoleerd uit het geïnfecteerde weefsel.



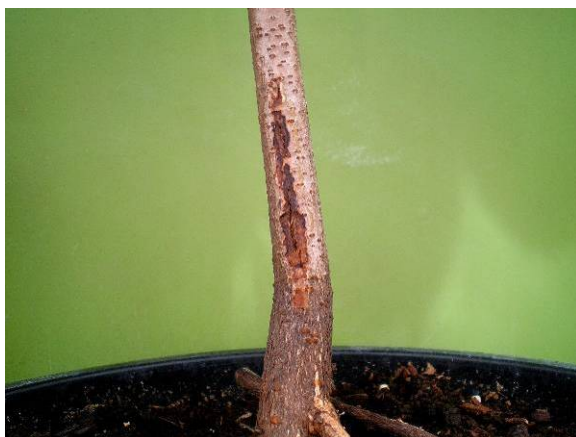
Figuur 21, 22: Uitbreiding van ca. 15 cm vanaf het inoculatie punt. De aantasting, in de vorm van glazig tot necrotisch (verkurkte) weefsel (pijl), liep vanuit het bastweefsel door tot aan het houtweefsel.

Beschadiging van oppervlakkig bastweefsel

De visuele beoordeling van de zaailingen 3 weken na de eerste inoculatie liet zien dat de meeste prikwonden open begonnen te barsten. Schraapwonden toonden een soort reactieweefsel met donkerverkleuring aan.

Vier weken na de eerste inoculatie ontstonden bij het meeste prikwonden duidelijke (wel kleine) bloedingssymptomen. De prikwonden van de tweede inoculatie begonnen ook 4 weken later open te barsten (Figuur 23 en 24).

De bacterie werd positief teruggeïsoleerd uit beide soorten beschadigingsplekken 21 weken na de eerste inoculatie.



Figuur 23: Prikwonden beginnen open te barsten. Ingezonken weefsel rond littekens.



Figuur 24: Schraapwonden met reactieweefsel en donker-verkleuring.

Open lenticellen

Eenentwintig weken na de eerste inoculatie waren nog geen uitwendige of inwendige symptomen aantoonbaar. Er werden in ieder geval meerdere bomen geanalyseerd (mengmonster van bastweefsel uit vijf zaailingen) maar hieruit was de bacterie niet terug te isoleren (Figuur 25). De eindbeoordeling van deze proef moet nog plaatsvinden.

Om te bevestigen of de *Pseudomonas syringae* bacterie lang genoeg vitaal bleef op de boompjes om een

aantasting te kunnen veroorzaken werden er bladmonsters geanalyseerd. De eerste direct na inoculatie en de tweede een week later. In beide gevallen werd de bacterie positief geïdentificeerd, met een verschil in aantal aangetroffen kolonies per keer: direct na inoculatie werden ca. 600 typische kolonies gevonden in de isolatieschaal, terwijl een week later het aantal kolonies was gedaald naar ca. 10 kolonies.



Figuur 25: Geen bijzonderheden na oppervlakkig verwijdering van schors.

Discussie

Beschadigingen van de bast van paardenkastanje komen in de praktijk veelvuldig voor. Dit soort oppervlakkige wondjes kunnen veroorzaakt zijn door dieren (insecten, vogels, eekhoorns), menselijke activiteiten zoals snoeien en maaien, de invloed van de wind, waardoor takbreuk of het schuren van takken optreedt. Dit kunnen plaatsen zijn waar bacteriën bastinfecties kunnen veroorzaken. Voor de *Pseudomonas syringae* bacterie is deze mogelijkheid in de kasexperimenten onderzocht. Zaailingen blijken eenvoudig geïnfecteerd te raken via oppervlakkige prik- of schraapwondjes in de bast. Ook wondjes die ontstaan bij het mechanisch verwijderen van bladeren (vergelijk windschade) lijken een goede invalspoort voor de bacterie. Verneveld inoculum (10^7 cfu/ml) gaf 100% infectie van de beschadigde plekken op de zaailingen. Onbekend is nog of lagere inoculumconcentraties en concentraties in regenwater/spoelmonsters van de boom ook voldoende zijn voor infectie. Dit zou nader in vervolgonderzoek moeten bestudeerd.

In dit experiment is niet aangetoond dat de lenticellen als mogelijke toegangspoort van de *Pseudomonas syringae* bacterie tot de boom fungeren. Dit ligt echter wel in de lijn van de verwachting.

Conclusie

Met een bacterieconcentratie van ca. 10^7 cfu.ml⁻¹ in de omgeving van bomen, zijn kleine beschadigingen voldoende om infectie te krijgen.

3.1.4 Mogelijke overdragers

Projectleider: Ing. Martin Verbeek (PRI)

Projectmedewerkers: P. van Deventer (PRI), I. de Vries (PRI) en O. Mendes (PRI), Drs. Alexander van Beuningen (PD), Maria José Villalón, MSc. (PD)

Inleiding

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. In deze survey kon niet bevestigd worden dat insecten een drager kunnen zijn van de *Pseudomonas syringae* bacterie. Echter deze mogelijkheid werd ook zeker nog niet uitgesloten. De serologisch positieve immunofluorescentie-reactie van een aantal sluipwespen 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 dit onderzoek wordt extra aandacht besteed aan de rol en bemonstering van insecten. Hierbij zijn insecten verzameld op de verschillende locaties.

Materiaal en methoden

Voortbordurend op de pilotstudie, die in 2006 is uitgevoerd, zijn in de tweede helft van 2007 lijmvallen uitgezet op een viertal locaties in Nederland. Deze 4 locaties waren:

1. de gemeentewerf te Houten: de kastanjabomenaanplant die in vorige jaren voor inoculatieproeven is gebruikt;
2. de rondweg te Houten: kastanjabomen langs de openbare weg;
3. de Buitenhof te Giessen: kastanjabomen langs volkstuintjes;
4. botanische tuin Belmonte te Wageningen.

De locaties zijn zo gekozen dat de vegetaties rond de bemonsterde kastanjabomen verschillend waren. Op elke locatie zijn kleefvallen geplaatst rond de stam, ongeveer 1,5 m van de grond. Omdat aantrekkingskracht voor vliegende insecten van gele en blauwe kleefvallen kunnen verschillen, zijn beide kleuren per locatie gebruikt (Figuur 26). Waar mogelijk werden de vallen om zowel gezond ogende als duidelijk zieke bomen geplaatst. Kleefvallen bevatten aan twee kanten lijm zodat zowel aanvliegende insecten als kruipende insecten en spinnen die tussen de val en de boom in kruipen werden gevangen.

Gedurende het najaar zijn de locaties twee maal gedurende 1 week bemonsterd met in totaal 20 kleefvallen per periode. De eerste periode was van 13-20 september (Belmonte van 17-24 september) en de tweede periode was van 7 tot 14 november 2007.



Figuur 26: Blauwe en gele kleefval.



Figuur 27: uitplating van wintervlinder op King's B medium

Na de bemonstering werden de gevangen insecten gedetermineerd, ingedeeld in groepen en geteld. Van individuele insecten of (bij hoge aantallen) groepen van 10 individuen uit elke groep werden extracten gemaakt. Deze extracten werden uitgeplaat op King's B-medium (op dit medium worden *Pseudomonas* bacteriën fluorescerend) en beoordeeld op het voorkomen van fluorescerende bacteriekolonies (Figuur 27). Fluorescerende kolonies werden in reïncultuur gebracht op TSA medium en geanalyseerd m.b.v. immunofluorescentie. Hiervoor werd het door PRI tegen het kastanje-isolaat van *Pseudomonas syringae* (PRI1) ontwikkelde antiserum gebruikt. Op (zwak) positieve extracten werd een verificatie toegepast met behulp van fingerprinting.

Daarnaast zijn er in de maand juni t/m oktober door de Plantenziektenkundige Dienst op de praktijklocatie Houten insecten verzameld in de kroon van geveld bomen en in de buurt van geïnfecteerd bastweefsel (zie materiaal gebruikt in paragraaf 3.1.2). Tevens werden in Arboretum Belmonte in Wageningen en aan de Klein Amerikaweg in Heelsum, op besmette bomen, bloembezoekende insecten (17 bijen, 4 hommels, 3 kevers en 5 vliegen) handmatig met een netje gevangen. Deze werden ieder apart gevangengezet in een petrischaal met King's B medium, waarop zij vrij konden rondlopen, en op deze wijze bacterieafdrukken maakten. De insecten zijn later op het lab, na onderkoeling (5 minuten bij -20°C), gedood en geanalyseerd.

Resultaten

In tabel 1 zijn de vangsttotalen van de groepen insecten weergegeven per locatie, tijdstip en vangplaat.

Tabel 1: Vangsttotalen op vangplaten per locatie

Tijdstip	13-20 september														17-24 september								
Locatie	Houten, gemeentewerf							Houten, rondweg							Giessen, volkstuinen				Wageningen, Belmonte				totaal
Plaats	H1-01	H1-02	H1-03	H1-04	H1-05	H1-06	H1-07	H1-08	H1-09	H1-10	G1-01	G1-02	G1-03	G1-04	G1-05	G1-06	W1-01	W1-02	W1-03	W1-04			
Gevangen																							
mineermot	317	1294	95	25	396	284	53	47	54	53	17	20	24	14	9	7	18	1720	14	171	4632		
vliegen	1	10	6	10	12	18	28	12	121	67	27	38	44	154	71	62	8	10	39	107	845		
muggen	7	2	9	2	11	22	28	28	44	47	27	22	31	18	9	10	10	6	9	13	355		
cicaden	21	2	11	1	2	2	2	0	1	4	9	4	9	2	4	7	4	2	2	27	116		
luizen	2	7	11	0	0	0	5	17	10	2	19	6	8	5	2	2	12	8	3	0	119		
sluipwespen	11	2	24	8	5	9	20	20	1	8	20	8	10	11	5	10	10	2	6	5	195		
spinnen	2	0	6	7	9	8	9	21	8	4	16	4	11	7	7	13	3	0	0	2	137		
pissebedden	4	0	11	35	12	12	1	5	0	1	9	2	19	3	27	48	2	0	1	6	198		
zweefvliegen	1	0	0	3	1	29	1	2	7	1	0	0	1	1	2	2	1	0	3	4	59		
oorwormen	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	12	9	3	5	1	0	0	0	37		
springstaarten	0	5	0	8	0	4	6	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	40	0	22	89		
kevers	1	3	1	2	1	1	1	2	1	2	1	0	0	0	5	5	1	0	1	0	29		
wespen	0	0	0	1	0	1	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	8		
tripsen	0	0	0	0	1	4	0	4	0	0	2	5	2	9	1	32	0	0	0	1	61		
sprinkhanen	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
graafwespen	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3		
wantsen	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3		
galwespen	0	0	0	1	0	4	13	13	1	8	19	7	6	5	7	9	0	0	0	0	93		
gaasvliegen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1		

Tijdstip	7-14 november																						
Locatie	Houten, gemeentewerf							Houten, rondweg							Giessen, volkstuinen				Wageningen, Belmonte				
Plaats	H2-01	H2-02	H2-03	H2-04	H2-05	H2-06	H2-07	H2-08	H2-09	H2-10	G2-01	G2-02	G2-03	G2-04	G2-05	G2-06	W2-01	W2-02	W2-03	W2-04			
Gevangen																							
mineermot	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
vliegen	37	13	20	19	10	10	23	14	25	24	8	9	20	14	14	36	37	32	34	19	418		
muggen	116	119	59	22	16	21	12	9	1	14	31	9	4	16	12	8	13	28	17	24	551		
cicaden	9	9	10	2	2	3	1	1	0	0	46	1	1	4	2	6	17	17	15	7	153		
luizen	24	19	11	3	6	3	0	4	1	1	14	10	9	29	8	4	3	1	0	0	150		
sluipwespen	11	6	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	0	3	1	28		
spinnen	27	28	46	37	33	21	29	5	34	4	9	13	2	1	9	11	11	28	24	9	381		
pissebedden	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	3	2	9	2	14	2	37		
zweefvliegen	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	1	0	1	3	12		
oorwormen	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	4		
springstaarten	25	22	49	12	33	33	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	29	21	70	36	335		
kevers	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	6		
wespen	0	0	0	0	0	0	2	4	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	9		
tripsen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
sprinkhanen	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
graafwespen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
wantsen	0	0	1	0	2	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	8		
galwespen	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	14		
gaasvliegen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
wintervlinder	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	31	79	17	32	160		

De kleur van de kleefval leek weinig invloed te hebben op de vangsten. Welke insectensoorten worden gevangen werd voornamelijk bepaald door tijdstip en locatie. De verschillen per val waren soms enorm (bijvoorbeeld bij kastanjemineermot, waar op dezelfde locatie met dezelfde kleur kleefvallen, op de ene val slechts 18 exemplaren werden gevangen en op de andere 1720). Dit kan te maken hebben met de oriëntatie van de kleefval waardoor de ene val beter wordt beschenen door de zon dan de andere. De grootste verschillen werden veroorzaakt door het tijdstip (in september nog volop mineermotten en in november geen) en locatie (in Wageningen wel wintervlinder en op de andere locaties nauwelijks).

Bij het uitplaten op King's B medium werden fluorescerende kolonies gevonden in bijna alle groepen insecten (behalve in de sprinkhaan en gaasvliegen, maar daar waren ook maar enkele exemplaren van gevangen). In 8 groepen kwamen kolonies voor die ook een, zij het zeer zwakke, reactie gaven met het antiserum tegen de kastanje *Pseudomonas*. Dit lijkt niet gerelateerd te zijn aan de locatie. Deze 8 groepen

zijn de mineermotten, vliegen, muggen, sluiwespen, spinnen, springstaarten, trips en wintervlinder. Een overzicht van de getoetste insecten is weergegeven in tabel 2, waarbij de insectengroepen met in King's B medium positieve kolonies oranje zijn gemerkt en de insectengroepen waarbij na het reinstrijken ook een zwak positieve reactie met het antiserum is gevonden groen zijn weergegeven.

Tabel 2: Aantallen insecten van vangplaten getoetst op aanwezigheid van *Pseudomonas* bacteriën

Totaal getoetst per locatie																					
Locatie	Houten, gemeentewerf						Houten, rondweg				Giessen, volkstuinen						Wageningen, Belmonte				Totaal
	H-01	H-02	H-03	H-04	H-05	H-06	H-07	H-08	H-09	H-10	G-01	G-02	G-03	G-04	G-05	G-06	W-01	W-02	W-03	W-04	
mineermot	20	20	20	20	20	18	18	19	16	16	14	11	16	11	9	7	9	63	14	26	367
vliegen	1	5	6	10	12	6	7	6	8	10	6	14	12	9	16	16	8	10	15	10	187
muggen	7	2	5	2	9	10	19	15	16	18	12	10	11	8	9	10	10	6	9	13	201
cicaden	13	2	11	1	2	2	2	0	2	4	7	4	8	2	4	7	4	2	2	20	99
luizen	2	6	11	0	0	0	5	11	9	2	11	6	8	5	1	2	11	8	3	0	101
sluiwespen	22	8	18	8	5	9	12	16	1	3	13	8	10	12	5	10	11	0	9	6	186
spinnen	2	0	5	4	8	8	8	11	7	5	12	4	8	7	7	12	3	0	0	2	113
pisbedden	4	0	5	10	10	2	1	5	0	1	4	2	8	2	2	14	2	0	1	6	79
zweefvliegen	1	0	0	3	1	14	1	1	5	1	0	0	1	0	2	2	1	0	3	4	40
oorswormen	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	2	2	2	3	1	0	0	0	15
springstaarten	0	5	1	7	0	4	6	1	0	2	0	0	0	0	0	0	10	0	20	0	56
kevers	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	2	1	0	0	4	2	1	0	1	0	24
wespen	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	7
tripsen	0	0	0	0	1	4	0	4	0	0	2	5	2	9	1	10	0	0	0	1	39
sprinkhanen	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
graafwespen	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
wantsen	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3
galwespen	0	0	0	1	0	4	9	12	1	7	10	3	6	5	7	7	0	0	0	0	72
gaasvliegen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
wintervlinder	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	12	10	42

■ Fluorescerende kolonies gevonden op King's B medium
■ Fluorescerende kolonies gevonden op King's B medium, na reinstrijk zwak positief met PRI1-antiserum (veel zwakker dan homologe reactie)

De verificatie met behulp van REP-PCR ('fingerprinting') op 11 kolonies die zwak reageerden met het PRI1-antiserum maakte duidelijk dat de patronen van de *Pseudomonaden* die in de verschillende insecten waren gevonden nooit identiek waren met het patroon van het kastanje-isolaat van *Pseudomonas syringae* PRI1 (zie figuur 28).

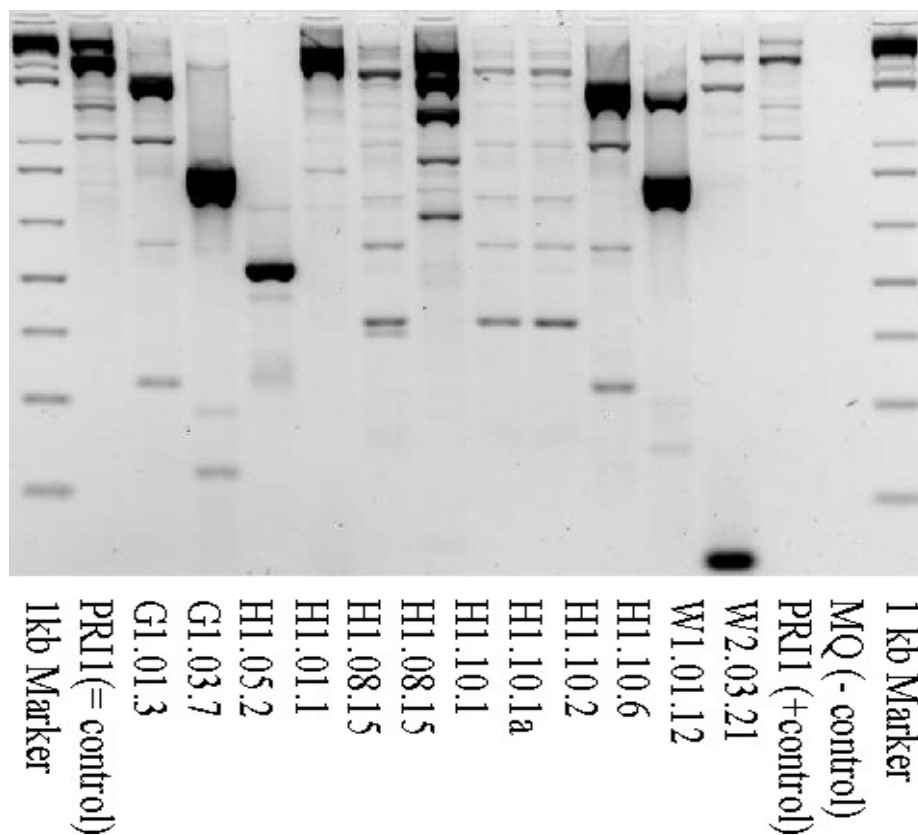
Vanaf de geveldde bomen van praktijklocatie Houten zijn vier kevers en één mier geanalyseerd op uitwendige aanwezigheid van *P. syringae*. Er werden enkele *Pseudomonas* bacteriën (resultaat vetzuuranalyse) geïsoleerd uit één van de kevers en de mier, die na moleculaire toetsing (BOX PCR) negatief waren. Er werd ook een spin ingezet, maar geen van de kolonies van de isolatieschaal waren verdacht voor de *P. syringae* bacterie.

Uit geen van de bemonsterde insecten afkomstig uit het Arboretum Belmonte in Wageningen, van de Klein-Amerikaweg in Heelsum en op de geveldde bomen, was het mogelijk het *P. syringae* bacterie te isoleren.

Conclusie

In insecten gevangen in september en november 2007 (en oktober 2006) werden wel *Pseudomonaden* aangetroffen, maar niet de *Pseudomonas syringae* die de kastanjeziekte veroorzaakt.

Isolaties van insecten (37), die gericht zijn gevangen op zieke bomen en dan ook nog met name op bloemen, werden ook in 2007, evenals 2006 negatief bevonden. Dit samen met het feit dat de *Pseudomonas syringae* bacterie algemeen in de omgeving van zieke bomen voorkomt (zie 3.1.2), suggereert dat insecten geen belangrijke rol spelen bij overdracht van de bacterie.



Figuur 28: Resultaten REP-PCR op isolaten uit insecten

3.1.5 Serumvalidatie

Projectleider: Alexander van Beuningen (PD)

Projectmedewerkers: Drs. Alexander van Beuningen (PD), Maria José Villalón, MSc. (PD), Dr. Jaap Janse (PD)

Inleiding

Binnen het onderzoek naar de bloedingziekte in paardenkastanje heeft Plant Research International (PRI) in 2006 een serum ontwikkeld voor immunofluorescentie microscopie (IF-microscopie). Het serum kan ingezet worden in een IF-screeningsmethode om *Pseudomonas syringae* cellen in extractpreparaten van paardenkastanje of insecten aan te tonen. Het is daarmee een praktisch hulpmiddel binnen het epidemiologisch onderzoek waarvoor grote aantallen monsters moeten worden onderzocht op de aanwezigheid van de *Pseudomonas syringae* bacterie.

De bruikbaarheid van een serum wordt grotendeels bepaald door de specificiteit (alleen het doelorganisme moet reageren met het serum), de gevoeligheid van de IF-microscopie methode (mede afhankelijk van het serum) en de werkverdunding van het serum waarbij een goede microscopische kleuring optreedt. Om betrouwbaarheid van het door PRI ontwikkelde serum in IF-microscopie te bepalen is deze gevalideerd. Hiervoor zijn een aantal reïnculturen en praktijkextracten uit de bast van paardenkastanje behandeld en beoordeeld.

Materiaal en methoden

Het PRI antiserum is een polykloonaal, indirect serum uit konijn, gericht tegen de *Pseudomonas syringae* bacterie (isolaat PRI 1 uit paardenkastanje). Als secundair antilichaam wordt het SwAR/IgG(H+L)/FITC

conjugaat van Nordic Immunology gebruikt. Ook is een FITC-geconjugeerde versie van het antiserum beschikbaar voor gebruik in directe-IF. Dit serum is alleen uitgetest in de bepaling van de titer. Als een extract in IF wordt getest tegen een verdunningsreeks van het antiserum, dan wordt de titer gedefinieerd als de laatste verdunning van het antiserum, waarbij het signaal van de fluorescerende cellen iets zwakker positief is.

In de serumvalidatie is gekeken naar specificiteit van het indirecte serum voor de *Pseudomonas syringae* bacterie, die bloedingziekte bij paardenkastanje veroorzaakt. In eerste instantie is van een groep van tien *P. syringae* isolaten uit kastanje (positief op basis van vetzuuranalyse en Box-PCR) de titer bepaald (stap 1), hierna (stap 2) is de verdere validatie uitgevoerd, waarbij meer isolaten en ook praktijkextracten zijn getest, te weten:

- Verschillende isolaten van de doelbacterie (positief voor VZA en BOX-PCR, pathovar kastanjeziekte)
- Pseudomonas syringae* isolaten (andere pathovars) die sterk verwant zijn aan de doelbacterie
- Bacterie-isolaten uit bastmonsters van paardenkastanje (onderdeel 3.1.2) die in identificatie met vetzuuranalyse sterk lijken op het doelorganisme maar hiervan afwijken (negatief in BOX-PCR)
- Bastextracten (afkomstig van onderdeel 3.1.2), die het doelorganisme bevatten (resultaat van uitweek en identificatie met vetzuuranalyse en BOX-PCR), en bastextracten waaruit de doelbacterie niet is geïsoleerd (mogelijk negatieve extracten, de *Pseudomonas syringae* bacterie kan ook onderdrukt zijn in groei).

Voor IF-microscopie is de methode voor de IF-detectie van bacterie bruinrot (aardappel) gevolgd zoals die is beschreven in de Council Directive 2006/63/EC. Als laatste validatiestap zijn de resultaten geëvalueerd a.h.v. vastgestelde prestatiekenmerken voor een serum.

In tabel 3 is een overzicht gegeven van de categorieën van monsters die met IF zijn onderzocht.

Tabel 3: Overzicht van monsteraantallen per categorie die zijn gebruikt in de validatie.

Herkomsten van het Testmateriaal	Aantal monsters
Isolaten van schaal (reinculturen)	
1.1 Verschillende isolaten van de doelbacterie uit NL (gekaracteriseerd met alleen vetzuuranalyse en Box-PCR)	50
1.2 Verschillende isolaten van de doelbacterie van andere collecties	19
2 Isolaten van andere bacteriesoorten met host <i>Aesculus</i>	1
3 Isolaten verwante soorten (<i>syringae</i> pathovars)	22
4 Isolaten van verschillende potentiële kruisreageerders* uit <i>Aesculus</i>	75
Extracten	
Extracten zijn willekeurig gekozen uit de extractenvoorraad	
1 Positieve monsters***	10
2 Kruisreagerende monsters*	10
3 Negatieve monsters**	20

* op basis van VZA en BOX-PCR

** op basis van uitkweken op King's B medium en Levan-medium

*** op basis van uitkweken op King's B medium en Levan-medium, en identificatie van kolonies met vetzuuranalyse en Box-PCR

Prestatiekenmerken en de prestatie-eisen voor een goed serum worden als volgt gedefinieerd:

Prestatiekenmerken	Prestatie-eisen
De sterkte van de reactie	Sterke reactie met een scherpe overgang bij de titer
De titers van positieve isolaten en extracten	≥ 1000
Het aantal negatieven tussen de positieve extracten	0 %
Het aantal kruisreageerders tussen de negatieven	$\leq 1\%$

De isolaten (uit de vriesdroogcollectie) zijn uitgeplaat en daarna reingekweekt op nutriënt agar (NA). Microscoppreparaten werden gemaakt van maximaal drie dagen oude cultures.

Bastextracten die met glycerol waren ingevroren werden eerst gecentrifugeerd om de glycerol te verwijderen. De monsters werden in kleine batches aangemaakt en serologisch behandeld. Per behandeling is een positief controle glaasje meegenomen (positieve controle). Na IF beoordeling werden de resultaten geëvalueerd.

Om extract te besparen werden de positieve extracten met een korte reeks (vier verdunningen van het antiserum; 1:1600,1:3200,1:6400,1:12800) behandeld, de monsters van isolaten en de negatieve extracten werden behandeld met een volledige reeks (1:100 t/m 1:25600).

Resultaten en discussie

Stap 1. Een schatting maken van de titer van het serum:

Tien isolaten van de doelbacterie die positief waren op basis van vetzuuranalyse en BOX-PCR (uit groep 1.2 van tabel 3), zijn behandeld met een volledige verdunningsreeks van het PRI serum (zowel direct als indirect). De resultaten (Tabel 4) verschaffen enig inzicht in de titer van het serum.

Tabel 4: Schatting van de titer

Datum Isolatie	Code isolaat	Indirect serum		Direct serum	
		Titer	duplo	Titer	duplo
14-8-2006	Belmonte 1	6400	6400	3200	3200
	Belmonte 2	6400	6400	6400	6400
22-8-2006	Belmonte 3	6400	6400	6400	3200
	Belmonte 12	6400	3200	6400	6400
30-8-2006	Belmonte 19	6400	3200	6400	6400
13-12-2006	B.V. 22	6400	6400	6400	3200
	B.V. 25	6400	6400	3200	3200
15-12-2006	B.V. 42	6400	12800	12800	3200
	B.V. 43	6400	6400	6400	3200
	B.V. 52	6400	3200	3200	3200

Gezien de resultaten kan gesteld worden dat de titer enigszins variabel is. Rond de 1:3200 en 1:6400 lijkt de titer te liggen. De resultaten zijn redelijk reproduceerbaar. Uitzonderingen zijn rood gemarkeerd. Er zijn microscopisch geen afwijkingen waargenomen in celmorfologie.

Stap 2. Verdere validatie van het indirecte serum

Isolaten *Pseudomonas syringae* groep 1.1 en 1.2

Deze isolaten zijn behandeld met een volledige verdunningsreeks. De waargenomen titers van de isolaten waren:

- 1:1600 of lager; 16 isolaten
- 1:3200; 7 isolaten
- 1:6400; 38 isolaten
- 1:12800; 1 isolaat

Opvallend was dat bij de preparaten met zeer weinig cellen een titer van 1600 of lager (3x) werd waargenomen.

Isolaten van verwante soorten groep 2 en 3

Deze isolaten zijn behandeld met een lange reeks en reageerden wel met het antiserum. Waargenomen titers zijn:

- 1:400; 3 isolaten
- 1:800; 9 isolaten
- <1600: 1 isolaat
- 1:1600; 9 isolaten
- 1:3200; 1 isolaat

Isolaten van kruisreageerders uit Aesculus groep 4

Dit zijn isolaten uit boomextracten die verdachte kolonies gaven na uitkweken. Vetzuuranalyse gaf een *Pseudomonas syringae* indicatie, in Box-PCR analyse waren ze negatief. Hiervan zijn 75 isolaten getest. Waargenomen titers zijn:

- <1:100; 9 isolaten
- 1:100; 3 isolaten
- 1:200; 11 isolaten
- 1:400; 15 isolaten
- 1:800; 11 isolaten
- 1:1600; 2 isolaten
- geen reactie; 24 isolaten

Extracten

Van alle boomextracten is 1 glaasje onverdund en 1 glaasje 100x verdund extract getest met IF. Reden van de verdunning is dat het serum mogelijk gevoelig kan zijn voor hoge celaantallen in het preparaat waardoor het fluorescerende signaal zwakker is. Dit wordt duidelijk door de onverdunde en het verdunde glaasje te vergelijken.

Positieve monsters

Tien positieve boomextracten waaruit de *Pseudomonas syringae* bacterie werd geïsoleerd (vetzuuranalyse en Box-PCR+) zijn met een volledige serum verdunningsreeks getest, zowel met direct als met het indirecte serum. De resultaten zijn te verzameld in tabel 5.

Tabel 5: Boomextracten met de *Pseudomonas syringae* bacterie getest in directe en indirecte IF.

indirect		1:100		1:1	
		Titer	Aantal cellen	Titer	Aantal cellen
PLUS	1	6400	1-10	400	500-1000
	2	3200	1-10	-	100-500
	3	3200	10-50	100	100-500
	4	12800	10-50	200	500-1000
	5	12800	-	800	10-50
	6	6400	1-10	400	10-50
	7	3200	1-10	-	10-50
	8	3200	10-50	400	100-500
	9	3200	10-50	-	100-500
	10	6400	10-50	100	100-500

direct		1:100		1:1	
		Titer	Aantal cellen	Titer	Aantal cellen
PLUS	1	12800	10-50	800	>1000
	2	6400	1-10	400	>1000
	3	12800	10-50	200	100-500
	4	6400	10-50	3200	500-1000
	5	6400	1-10	400	>1000
	6	25600	1-10	<100	>1000
	7	3200	1-10	-	-
	8	6400	10-50	100	100-500
	9	12800	50-100	400	>100
	10	12800	10-50	-	>1000

Kruisreagerende monsters

Tien boomextracten waaruit de *Pseudomonas syringae* bacterie niet kon worden geïsoleerd maar wel een kruisreagerende *P. syringae* soort is aangetroffen (indicatie met vetzuuranalyse en Box-PCR negatief) zijn met een volledige serum verdunningsreeks getest. Zeven extracten waren negatief in beide extract verdunningen en in drie extracten werden afwijkende cellen met afwijkende morfologie en lage titer (1:200 en 1:400) waargenomen.

Negatieve monsters

Twintig boomextracten waaruit geen *P. syringae* bacterie of kruisreageerder werd geïsoleerd zijn getest met een volledige verdunningsreeks. Tien extracten waren volledig negatief. En in tien extracten werden typische cellen met een goede titer waargenomen. De resultaten van deze monsters zijn weergegeven in onderstaande tabel 6.

Tabel 6: Negatieve extracten waarin typische cellen met een goede titer zijn waargenomen

		1:100			1:1		
		Titer	Aantal cellen	Atypisch ja/nee	Titer	Aantal cellen	Atypisch ja/nee
MIN	1	6400	1-10	JA	-	-	-
	2	-	-	-	1600	50-100	Nee
	3	6400	1-10	Nee	-	-	-
	4	3200	100-500	Nee	-	>>1000	-
	5	3200	0-1	Nee	3200	50-100	-
	6	-	-	-	1600	1-10	Nee
	7	3200	0-1	Nee	-	-	-
	8	12800	0-1	Nee	1600	50-100	Nee
	9	12800	0-1	Nee	1600?	-	Nee
	10	3200	1-10	Nee	1600?	-	Nee

Discussie

Het gevalideerde serum tegen de *Pseudomonas syringae* bacterie verantwoordelijk voor de kastanjeziekte blijkt binnen deze validatie zeer goed te voldoen aan de prestatie eisen. De titer van het serum ligt rond de 1:3200 en 1:4600. Deze titer wordt ook gevonden bij een groot aantal goed gekarakteriseerde isolaten van de kastanjeziekte uit Nederland en daarbuiten (groep 1.1. en 1.2). Uitschieters naar een lagere titer van 1:1600 die worden waargenomen in de groep van isolaten uit groep 1.1 (Nederlandse isolaten die alleen met BOX-PCR en vetzuuranalyse zijn gekarakteriseerd), houden mogelijk verband met het lage cel aantal dat op deze preparaatglaasjes aanwezig was. Het is verstandig om de IF-behandeling om deze reden te herhalen. Alle positief geïdentificeerde kastanje-isolaten worden dus aangetoond met IF, terwijl de *Pseudomonas syringae* pathovars (groep 3) en de kruisreagerende isolaten (groep 4, veelal andere *P. syringae*'s op basis van vetzuuranalyse) een sterk afwijkende titer hebben (slechts 1 pathovar heeft een titer van 1:3200, de rest allemaal een lagere titer). Daarmee is de specificiteit van het serum goed te noemen.

De geteste extracten die als positief worden bestempeld komen allemaal goed uit de IF-test. Ze hebben allemaal een titer van 1:3200 of hoger bij de 1:100 verdunde extracten. Het serum is wel erg gevoelig voor hoge cel aantallen in het preparaat, zo daalt de titer bij de onverdunde positieve extracten naar 1:800 of lager.

Kruisreagerende extracten, die op basis van isolatie en vetzuuranalyse *syringae* bacteriën bevatten, zijn allemaal negatief.

Bij de negatieve extracten zijn er tien extracten positief met goede titers, terwijl ze bij de isolatie d.m.v. uitplaten geen *P. syringae* kolonies hebben opgeleverd. Als het serum zo specifiek is als uit de overige resultaten blijkt, dan zou het kunnen zijn dat deze extracten ten onrechte negatief zijn en de *Pseudomonas syringae* bacterie niet is uitgegroeid op de isolatie schalen, mogelijk a.g.v. remming door saprofytische bacteriën. Misschien kan opnieuw uitplaten van deze extracten duidelijkheid verschaffen in de juistheid van de IF-resultaten.

Conclusie

Het serum is gezien de titer en specificiteit geschikt voor de screening van zieke boommonsters op de aanwezigheid van de *P. syringae* bacterie. Daarvoor kan het in toekomstige werkzaamheden worden ingezet.

3.2 Resistentie

3.2.1 Toetsing gevoeligheid Aesculussoorten, -hybriden en -cultivars

Projectleider: Dr. André van Lammeren (WUR)

Projectmedewerkers: Drs. Alexander van Beuningen (PD), Maria José Villalón, MSc. (PD), Henk Kieft (WUR), Jacqueline Donkers (WUR), Suzanne Breeuwsma (PPO), Dr. Jaap Janse (PD)

Inleiding

In het rapport n.a.v. onderzoek naar de veroorzaker van bloedingziekte in paardenkastanje wordt de landelijke inventarisatie van zieke paardenkastanje gedocumenteerd. Bij visuele inspectie is de ziekte tot nu voornamelijk bij de rode (*Aesculus x carnea*) en witte paardenkastanje (*A. hippocastanum*) aangetroffen. In rode en gele pavia kastanje (*A. pavia* en *A. flava*) werd de ziekte veel minder aangetroffen. Van de soorten *A. indica*, *A. glabra* en *A. parviflora* en van de hybride soort *A. x mutabilis* zijn slechts enkele exemplaren in Nederland aanwezig en hierin werd geen ziekte gemeld. Dit impliceert dat er mogelijk verschillen zijn tussen de kastanjesoorten en hybriden in resistentie/vatbaarheid voor de kastanjeziekte. Via infectieproeven met zaailingen zal dit beeld nader onderzocht worden.

Ook is het goed om te kijken of er vergelijkbare of andere verdedigingsmechanismen voorkomen binnen de diverse *Aesculus*-soorten (resistentieonderzoek starten). Hiertoe zijn na de kasproef ook de fysiologische en histologische aspecten van vatbaarheid/resistentie bestudeerd.

Door genetische selectie van weinig of niet vatbare soorten kan voor de lange termijn wellicht een gezonde cultivar worden gevonden.

Materiaal en methoden

A. Screening verschillende soorten/variëteiten

Aangezien het moeilijk is om aan jonge zaailingen van de gewenste soorten en variëteiten van paardenkastanje te komen, is besloten de proef met takken zonder symptomen uit te voeren. De takken werden verzameld in Arboretum Belmonte en Arboretum de Dreijen, beide in Wageningen, in het begin van oktober 2007 en wel van de volgende soorten, hybriden en cultivars:

Cultivars <i>Aesculus hippocastanum</i> :	Hybriden:	Soorten:
<i>A. hippocastanum</i> (Witte paardenkastanje)	<i>A. x carnea</i> (Rode paardenkastanje)	<i>A. flava</i> (Gele pavia)
<i>A. hippocastanum</i> 'Baumannii'	<i>A. x carnea</i> 'Plantierensis'	<i>A. parviflora</i> (Herfstpaardenkastanje)
<i>A. hippocastanum</i> 'Incisa'	<i>A. x mutabilis</i>	<i>A. pavia</i> (Rode pavia)
<i>A. hippocastanum</i> 'Memmingeri'		<i>A. turbinata</i> (Japanse Paardenkastanje)
<i>A. hippocastanum</i> 'Pyramidalis'		

Inoculatiemethode en gehandhaafde omgevingsfactoren

Ongeveer 1 meter lange takken werden gesnoeid en direct in een emmer water geplaatst voor vervoer naar de kas en directe inoculatie. Voordat de inoculatie werd uitgevoerd, was de kas (20°C) geconditioneerd d.m.v. een watervernevelaar tot een luchtvochtigheid boven de 80%. Verder is er geen conditionering van temperatuur of verlichting uitgevoerd. Deze omstandigheden zijn zo gebleven tot de beëindiging van de proef. Tijdens het experiment werden de emmers met de takken regelmatig met water aangevuld, indien schimmelgroei werd geconstateerd zijn takdelen, die zich onder de waterspiegel bevonden, met water gereinigd.

De inoculaties werden uitgevoerd met een bacteriesuspensie van ca. 10^7 cfu.ml⁻¹. Deze werd gemaakt van isolaat PD 4818 uit paardenkastanje (48 uur oude cultuur op Nutriënt agar, gekweekt bij 28°C) in steriel fosfaat buffer (PBS 0,01 M and pH 7,2).

Er werden drie takken per boomsoort/variëteit geïnoculeerd met een steriel scalpel d.m.v. drie sneden van ongeveer 0,5 cm in dwarslengte. In deze sneden werd de bacteriesuspensie gedruppeld met behulp van een steriele injectiespuit. Ook is naaldinoculatie uitgevoerd (3 prikwonden per behandeling) op een ander deel van de tak. De negatieve controle werd op dezelfde wijze als boven beschreven geïnoculeerd met steriele PBS-buffer. Vervolgens werd symptomenwikkeling nauwkeurig gevolgd gedurende 7 weken. Na deze tijd zijn herisolaties uit de geïnfecteerde takken uitgevoerd. Er werden stukjes weefsel verzameld rond de inoculatieplaats met een steriel scalpel. Na minimaal 20 minuten weken in steriel fosfaat buffer (PBS 0,01 M and pH 7,2) werden de extracten uitgeplaat via verdunningsplaatmethode op King's medium B en Levam agar. Typische kolonies werden reingekweekt en geïdentificeerd met vetzuuranalyse (VZA) en BOX-PCR.

De waargenomen symptomen zijn gefotografeerd en monsters zijn verzameld voor screening op de fysiologische en histologische aspecten (onderdeel B).

B. Screening fysiologische en histologische aspecten

Om te toetsen of verschillende kastanjesoorten een verschillende reactie vertonen op infectie met *P. syringae*, zijn takken van 2 cm dikte en 20 cm lengte in juni geïnjecteerd met PD5126 en PD4818 en op vaas gezet. Daarbij zijn *A. hippocastanum*, *A. pavia*, *A. flava*, *A. flava x pavia* en *A. parviflora* vergeleken. Na een week vertoonde alleen *A. hippocastanum* enige zwelling en exudaat ter plaatse van de injectie. Immunocytochemische detectie van bacteriën ter plaatse van de inoculatie was na 5 weken positief in alle gevallen. Het nadeel van het gebruik van takdelen op water is dat ze snel beschimmelen en daardoor veel bastscheuren krijgen. Hierdoor heeft de bemonstering plaats moeten vinden 6-7 weken na inoculatie.

Eind september is een tweede cultuur op water gestart bij de PD waarbij afgesneden gebladerde takken op water zijn gezet. Inoculatie met PD4818 is uitgevoerd op 1 oktober en planten zijn 6-7 weken later geëvalueerd op morfologische en anatomische kenmerken en vervolgens met antiserum en terugisolatie getoetst op aanwezigheid van bacteriën.

Resultaten en discussie

A. Screening verschillende soorten/variëteiten

De herisolaties uit de takken heeft in een relatief vroeg stadium van de infectie plaatsgevonden (6-7 weken na inoculatie). De met *Pseudomonas syringae* bacterie geïnoculeerde takken van witte en rode paardenkastanje lieten al 2 weken na de inoculatie eerste verschijnselen van aantasting zien. De bacterie kon in de meeste maar niet in alle gevallen uit het geïnoculeerde weefsel teruggeïsoleerd worden (Tabel 7).

Tabel 7: Resultaten van herisolaties van *P. syringae* uit *Aesculus* soorten en variëteiten van paardenkastanje

	Kastanjesoort/variëteit	Monster locatie	Tak symptomen ¹⁾	Uitbreiding	Kolonies	VZA ²⁾	BOX PCR	Totaal uitslag
Cultivars	<i>A. hippocastanum</i> (Witte paardenkastanje)	Belmonte	+++	2 cm	+ ³⁾	+	+	+
	<i>A. hippocastanum</i> 'Baumannii'	Belmonte	++	2 cm	+++	+	+	+
	<i>A. hippocastanum</i> 'Incisa'	Belmonte	+	4 cm	-	N.v.t.	N.v.t.	-
	<i>A. hippocastanum</i> 'Memmingeri'	Belmonte	+++	2 cm	+++	+	+	+
	<i>A. hippocastanum</i> 'Pyramidalis'	Belmonte	+++	5 cm	++	+	+	+
Hybriden	<i>A. x carnea</i> (Rode paardenkastanje)	Belmonte	+	2 cm	+/-	-	-	-
	<i>A. x carnea</i> "Plantierensis"	Belmonte	++	1 cm	+/-	+	-	-
	<i>A. x mutabilis</i>	Belmonte	-	geen	+++	+	+	+
Soorten	<i>A. flava</i> (Gele pavia)	de Dreijen	+/-	geen	+++	+	+	+
	<i>A. parviflora</i> (Herfstpaardenkastanje)	de Dreijen	-	geen	-	N.v.t.	N.v.t.	-
	<i>A. pavia</i> (Rode pavia)	Belmonte	+/-	geen	+++	+	+	+
	<i>A. turbinata</i> (Japanse paardenkastanje)	Belmonte	++	2 cm	+++	+	+	+

1) Takken Symptomen:

- = negatief of slechts een hele lichte necrose als overgevoeligheidsreactie
- + = lichte symptomen, lichte zwelling met necrose alleen rond inoculatieplek
- ++ = duidelijke symptomen, ingezonken weefsel rond inoculatieplek met enkele cm. uitbreiding
- +++ = sterke symptomen, echte bloedingen, vergelijkbaar met "natuurlijke" infectie

2) Match met *Pseudomonas syringae* groep

3) Kolonies:

- = geen typische kolonies
- +/- = twijfelachtige kolonies
- + = 100-500 typische kolonies
- ++ = 500-1000 typische kolonies
- +++ = > 1000 typische kolonies

Cultivars van *A. hippocastanum*

Geïnduceerde ziektebeelden door het *Pseudomonas syringae* isolaat uit kastanje bestonden in het geval van cultivars van *A. hippocastanum*, in meer of minder mate, uit de bekende bloedingen, met een sterke uitbreiding van aangetast, vochtig, roodverkleurd, necrotisch bastweefsel, dat ook bij natuurlijke infecties in jonge takken wordt waargenomen (Figuur 29, 30, 31, 32). Alleen bij *A. hippocastanum* 'Incisa' was dit beeld afwezig. Na de inzet van de monsters kon, behalve in het geval van cultivar 'Incisa' (waar geen verdachte kolonies zijn gevonden), de bacterie uit het aangetaste weefsel teruggeïsoleerd worden (bevestigd met identificatietoetsen VZA en BOX-PCR).



Figuur 29: Tak van *A. hippocastanum*, 6 weken na kunstmatige inoculatie met isolaat PD 4818, met open gebarsten ingezonken weefsel rond de inoculatieplaats (snijwonden).



Figuur 30: Afgeschilde tak van *A. hippocastanum* cv. "Memmingeri", 7 weken na kunstmatige inoculatie met isolaat PD 4818, met typische nat, roodbruin verkleurd weefsel en (enige) uitbreiding vergelijkbaar met natuurlijke infecties in jonge takken.



Figuur 31: Tak van *A. hippocastanum* cv. 'Memmingeri', 7 weken na kunstmatige inoculatie met isolaat PD 4818, met typische bloedingen rond de inoculatieplaats (prikwonden).



Figuur 32: Afgeschilde tak van *A. hippocastanum* cv. 'Pyramidalis', 7 weken na kunstmatige inoculatie met isolaat PD 4818, met symptomen die lijken op met natuurlijke infecties in jonge takken

Hybriden van *A. hippocastanum*

Terwijl de symptomen van de takken van de hybride rode paardenkastanje veelbelovend waren (Figuren 33, 34), viel de herisolatie van *Pseudomonas syringae* tegen. Er werden geen verdachte kolonies op de isolatieschalen van de twee hybriden teruggevonden. Mogelijke verklaring hiervoor kan zijn dat uit beide monsters veel saprofytische kolonies groeiden op de isolatieschalen, waardoor de *Pseudomonas syringae* bacterie in groei wordt geremd.

In tegenstelling tot de hybride *A. x carnea* waren de symptomen op de takken van de hybride *A. x mutabilis* niet verdacht (Figuur 35), maar werden er wel enkele honderden typische *P. syringae* kolonies gevonden. De reingekweekte, geselecteerde kolonie werd later d.m.v. VZA en BOX PCR, positief bevonden. Omdat hier het oorspronkelijk inoculatiepunt bemonsterd werd, is het mogelijk dat hier de oorspronkelijk geïnoculeerde bacteriën aangetroffen werden.



Figuur 33: Tak van *A. x carnea* cv. 'Plantierensis', 7 weken na kunstmatige inoculatie met isolaat PD 4818, met typisch ingezonken weefsel rond het inoculatieplaats (snijwonden). Ondanks de typische symptomen kon de *Pseudomonas syringae* bacterie niet teruggeïsoleerd



Figuur 34: Afgeschilde tak van *A. x carnea*, 7 weken na kunstmatige inoculatie met isolaat PD 4818, met bruine necrotische verkleuring, redelijk typisch aantastingsweefsel en uitbreiding. Ondanks de typische symptomen kon de *Pseudomonas syringae* bacterie niet teruggeïsoleerd worden.



Figuur 35: Afgeschilde tak van *A. x mutabilis*, 6 weken na kunstmatige inoculatie met isolaat PD 4818. Geen symptoomvorming rond de inoculatieplaats (snijwonden).

Andere soorten dan *A. hippocastanum*

De inoculatie van isolaat PD 4818 op verschillende soorten *Aesculus* heeft in alle gevallen, behalve bij *A. parviflora*, tot ontwikkeling van lichte ziektesymptomen geleid. Na het afschillen van de takken was de uitbreiding van de bacterie in het bastweefsel zeer gering. Er werd slechts wat lichtbruine necrose rond de inoculatieplek waargenomen. De herisolatie in *A. pavia*, *A. flava* en *A. turbinata* heeft een positieve uitslag opgeleverd (bevestigd d.m.v. VZA en BOX-PCR).

In rode en gele pavia kastanje (*A. pavia* en *A. flava*) werden geen duidelijke symptomen waargenomen, terwijl de bacterie wel kon worden geïsoleerd (Figuur 36, 37).



Figuur 36: Tak van *A. flava*, 6 weken na kunstmatige inoculatie met isolaat PD 4818. Slechts geringe zwelling rond de inoculatieplaats (snijwonden).



Figuur 37: Afgeschilde tak van *A. pavia*, 7 weken na kunstmatige inoculatie met isolaat PD 4818. Geen symptomen rond de inoculatieplaats (snijwonden).

Bij *A. parviflora* vond geen symptoomontwikkeling plaats en kon de *P. syringae* bacterie ook niet worden hergeïsoleerd. In *A. turbinata* trad sterke uitbreiding van de aantasting op (Figuur 38, 39) en werd de *P. syringae* bacterie in hoge aantallen teruggeïsoleerd.



Figuur 38: Afgeschilde tak van *A. turbinata*, 6 weken na kunstmatige inoculatie met isolaat PD 4818, met typische aantastingsweefsel en uitbreiding rond de inoculatieplaats (snijwonden).



Figuur 39: Afgeschilde tak van *A. turbinata*, 6 weken na kunstmatige inoculatie met isolaat PD 4818, met typische aantastingsweefsel en uitbreiding rond het inoculatieplaats (prikwonden).

Als alleen wordt gekeken naar de uitbreiding van de aantastingsplek, dan blijkt dat er alleen bij de hybride *A. x mutabilis* en de soorten *A. flava*, *A. parviflora* en *A. pavia* geen duidelijke aantasting van bastweefsel optreedt na inoculatie.

B. Screening histologische aspecten

Aansluitend op het bovenbeschreven onderzoek zijn de takken van dezelfde cultivars, soorten en hybriden na inoculatie gevolgd in hun morfologische en anatomische ontwikkeling. Ook is behalve de herisolatie van *P. syringae* nagegaan of bacteriën nog in het aangetaste weefsel aanwezig waren door gebruik te maken van PRI1-FITC antiserum.

Het bleek dat er een wisselende morfologische respons optrad bij de verschillende cultivars, hybriden en soorten (Figuur 40). In alle gevallen vertoonden de onderzochte *A. hippocastanum* cultivars een fenotype (Figuur 40A t/m E). De reacties varieerden in hevigheid, van zwarting van de wondsnesdes bij *A. hippocastanum* 'Baumannii' (Figuur 40A), inzakken van het infectiegebied bij *A. hippocastanum* 'Memmingeri' en 'Incisa' (Figuur 40B, C) tot het geheel verbruinen en necrotiseren van de geïnfecteerde zone bij de witte paardenkastanje (Figuur 40E). *Aesculus flava*, *A. x mutabilis*, *A. parviflora* en *A. pavia* reageerden het minst op de inoculatie (Figuur 40 H, I, J, K) maar wondhelingsreacties zoals optraden na verwonding zonder bacterie-inoculatie (zie paragraaf 3.1.1 Figuur 2B en 3E) bleven eveneens uit. De ontwikkeling rondom de verwonding is al besproken in de voorgaande paragraaf waarbij *A. hippocastanum* 'Memmingeri' (Figuur 30), *A. x carnea* (Figuur 34), *A. x mutabilis* (Figuur 35), *A. pavia* (Figuur 37) en *A. turbinata* (Figuur 38,39) zijn getoond.

Het materiaal is vervolgens anatomisch gekarakteriseerd (Figuur 41). Opvallend is dat *A. hippocastanum* 'Incisa' als respons op inoculatie een sterke xyleemvorming liet zien doordat het vaatweefselvormend cambium actief bleef (Fig. 41C), dat *A. hippocastanum* 'Baumannii' en *A. hippocastanum* 'Memmingeri' nog enige xyleemvorming vertoonden en dat *A. hippocastanum* 'Pyramidalis' en *A. hippocastanum* (witte paardenkastanje uit Belmonte) en *A. x mutabilis* een complete groeistop hadden. Er is dus tussen de cultivars een duidelijk verschillende reactie.

In enkele gevallen was er nauwelijks reactie op inoculatie. Bij *A. flava*, *A. parviflora*, *A. x carnea* 'Plantierensis' en bij *A. x carnea* bestond de reactie in het verwonde gebied slechts uit de vorming van een afsluitend periderm ter plaatse van de verwonding en weinig tot geen necrose van de bast.

De heftigste reacties op infectie zijn te zien in de *A. hippocastanum*-cultivars waarbij relatief veel weefselnecrose ontstaat. Van de andere soorten hebben met name *A. flava* en *A. parviflora* weinig necrose.

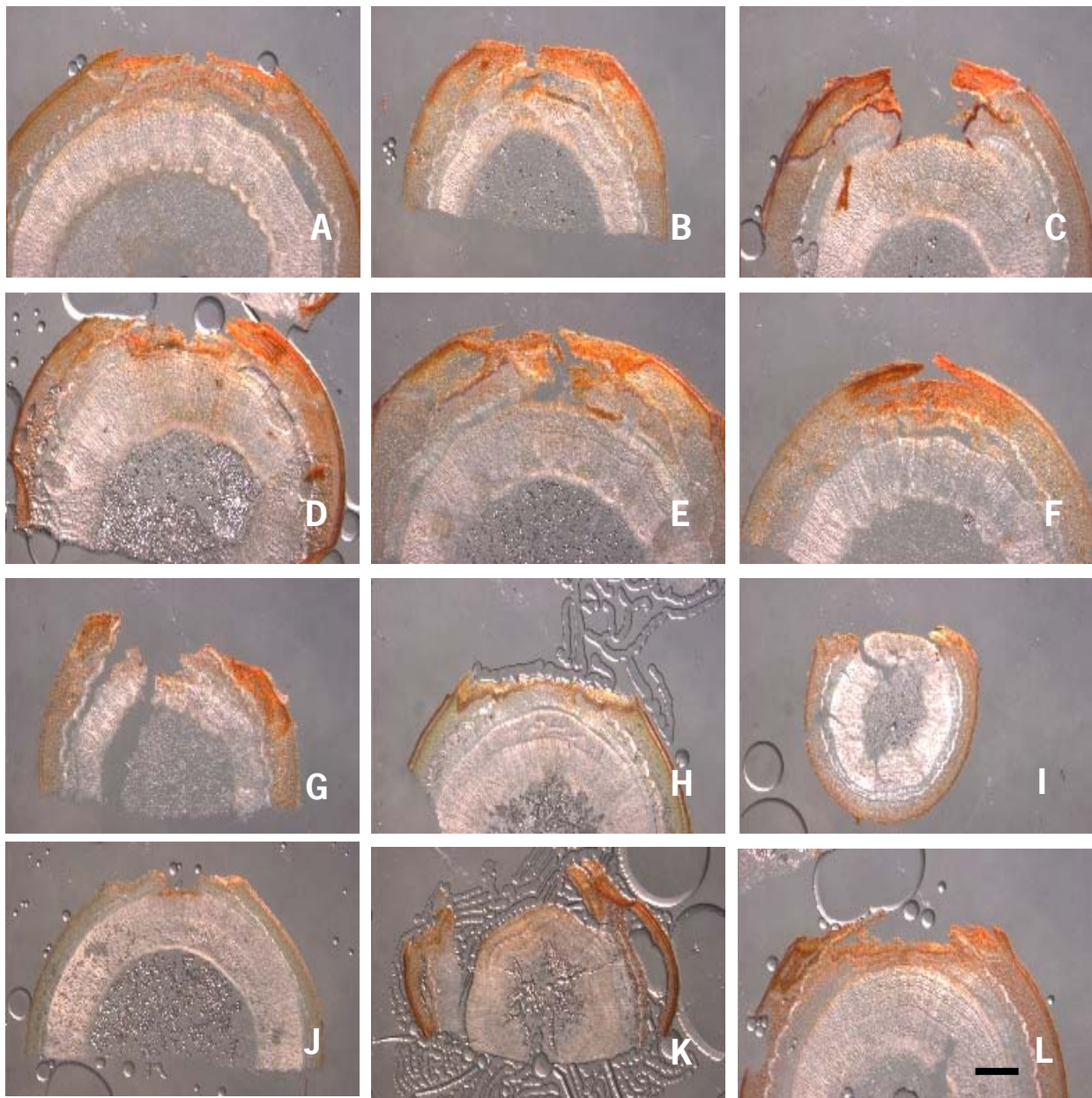
Met immunofluorescentie werd *P. syringae* aangetroffen in coupes van alle onderzochte planten (Figuur 42). Bij *A. pavia*, *A. parviflora* en *A. turbinata* zijn geen bacteriën in het levend weefsel aangetroffen, wel ex planta, *P. syringae* kwam veelvuldig voor in de overige monsters, deels ex planta maar ook in het weefsel grenzend aan de wond en op het wondoppervlak.

Figuur 40: Overzicht van morfologische reactie op infectie met *P. syringae* isolaat PD4818 op verschillende Aesculus-soorten, -hybriden en -cultivars. Takken zijn op water gezet en geïnoculeerd op 1-10-2007 en gefotografeerd op 20-11-2007.

A. <i>A. hippocastanum</i> 'Baumannii'	B. <i>A. hippocastanum</i> 'Memmingeri'	C. <i>A. hippocastanum</i> 'Incisa'
D. <i>A. hippocastanum</i> 'Pyramidalis'	E. <i>A. hippocastanum</i> (witte paardenkastanje uit Belmonte)	F. <i>A. x carnea</i>
G. <i>A. x carnea</i> 'Plantierensis'	H. <i>A. flava</i>	I. <i>A. x mutabilis</i>
J. <i>A. parviflora</i>	K. <i>A. pavia</i>	L. <i>A. turbinata</i>

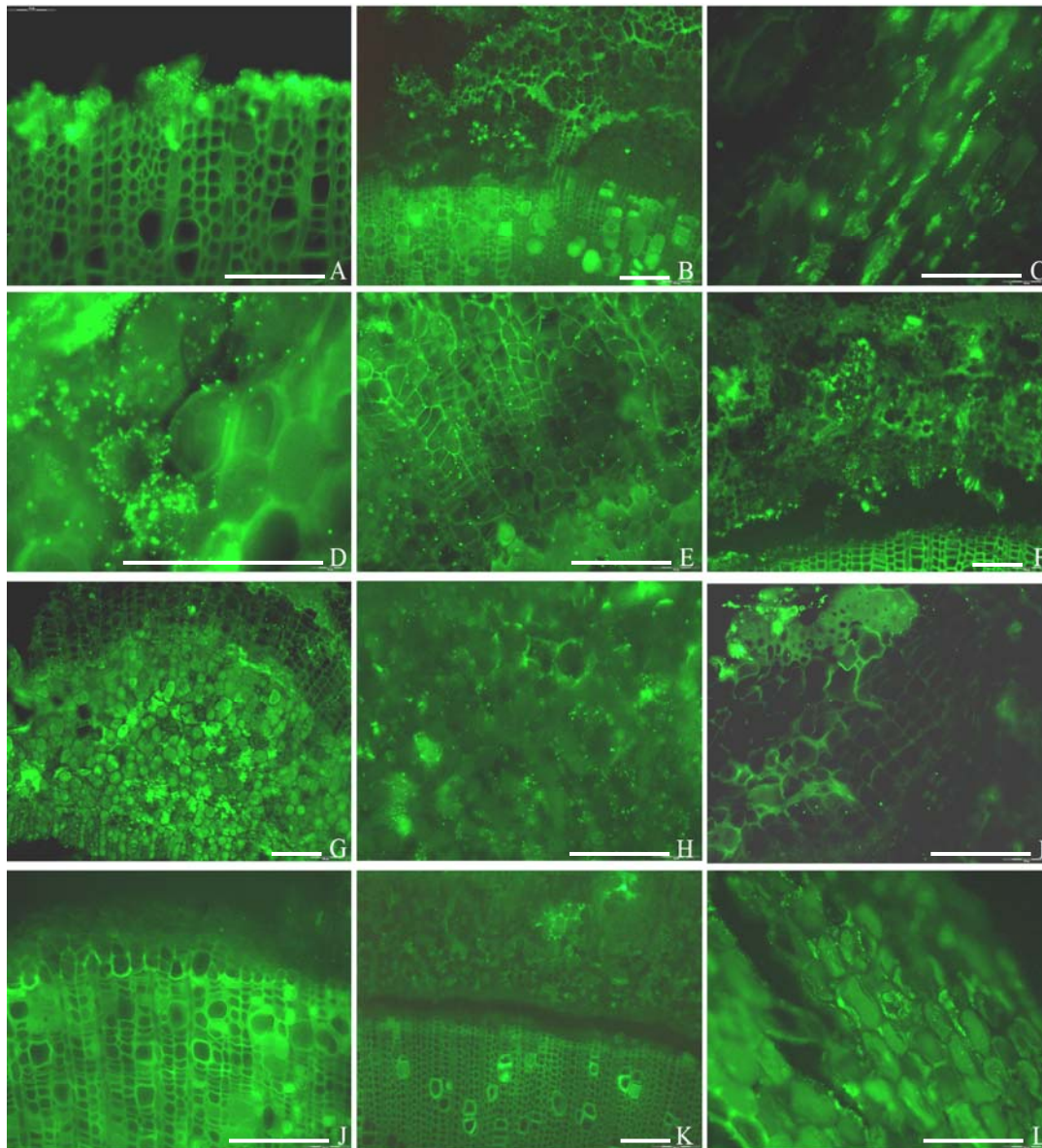


Figuur 40



Figuur 41: Overzicht van anatomische veranderingen als gevolg van infectie met *P. syringae* isolaat PD4818 op verschillende Aesculus-soorten, -hybriden en -cultivars. Takken zijn op water gezet en geïncubeerd op 1-10-2007 en gefotografeerd op 20-11-2007.

A. <i>A. hippocastanum</i> 'Baumannii'	B. <i>A. hippocastanum</i> 'Memmingeri'	C. <i>A. hippocastanum</i> 'Incisa'
D. <i>A. hippocastanum</i> 'Pyramidalis'	E. <i>A. hippocastanum</i> (witte paardenkastanje uit Belmonte)	F. <i>A. x carnea</i>
G. <i>A. x carnea</i> 'Plantierensis'	H. <i>A. flava</i>	I. <i>A. x mutabilis</i>
J. <i>A. parviflora</i>	K. <i>A. pavia</i>	L. <i>A. turbinata</i>



Figuur 42: Overzicht van immunocytochemische detectie van *P. syringae* in *Aesculus*-soorten, -hybriden en -cultivars.

A. <i>A. hippocastanum</i> 'Baumannii'	B. <i>A. hippocastanum</i> 'Memmingeri'	C. <i>A. hippocastanum</i> 'Incisa'
D. <i>A. hippocastanum</i> 'Pyramidalis'	E. <i>A. hippocastanum</i> (witte paardenkastanje uit Belmonte)	F. <i>A. x carnea</i>
G. <i>A. x carnea</i> 'Plantierensis'	H. <i>A. flava</i>	I. <i>A. x mutabilis</i>
J. <i>A. parviflora</i>	K. <i>A. pavia</i>	L. <i>A. turbinata</i>

A. *A.h.* 'Baumannii' met bacteriën op de wond tegen het xyleem, B. *A.h.* 'Memmingeri' met veel bacteriën in bast tot aan het xyleem, C *A.h.* 'Incisa' met alleen bacteriën buiten het laatstgevormde periderm, D. *A.h.* 'Pyramidalis' met veel bacteriën bij de wond, E. *A.h.* witte paardenkastanje, Belmonte met veel bacteriën, waarschijnlijk door een snijartefact over de coupe verspreid, F. *A. x carnea* met bacteriën tot aan het cambium, G. *A. x carnea* 'Plantierensis' met bacteriën vnl. buiten het nieuwgevormde periderm, H. *A. flava* met bacteriën buiten periderm t.p.v. de inoculatie, I. *A. x mutabilis* met bacteriën alleen t.p.v. wond buiten periderm, J. *A. pavia* zonder bacteriën in levend weefsel, K. *A. parviflora* met alleen bacteriën buiten periderm, L. *A. turbinata* met bacteriën in schors. De maatstreepjes in A-L geven 100 µm.

Tabel 8: Overzicht van morfologische en anatomische respons op infectie met *P. syringae* alsook de immunocytochemische detectie van *P. syringae* ter plaatse van infectie. Analyse 2 maanden na inoculatie. '+' t/m '+++': mate van door infectie geïnduceerde afwijking aan buitenzijde (morfologische afwijking) of binnenzijde (anatomische afwijking) van tak. '-': nagenoeg geen morfologische of anatomische aantasting waargenomen.

Soorten	Aantasting morfologisch	Aantasting anatomisch	Immunocytochemische detectie <i>P. syringae</i>
<i>A. hippocastanum</i> 'Baumannii'	+	+	Ja, ex planta en in hout bij wond
<i>A. hippocastanum</i> 'Memmingeri'	++	+	Ja, tot vlak bij cambium
<i>A. hippocastanum</i> 'Incisa'	+	-	Ja, alleen ex planta
<i>A. hippocastanum</i> 'Pyramidalis'	+	+	Ja, alleen bij wond
<i>A. hippocastanum</i> (witte paardenkastanje uit Belmonte)	+++	+	Ja, veel verspreid over coupe
<i>A. x carnea</i>	++	-	Ja, voornamelijk ex planta
<i>A. x carnea</i> 'Plantierensis'	-+	-	
<i>A. flava</i>	-	-	Ja, bij wond
<i>A. x mutabilis</i>	-	+	Ja, ex planta
<i>A. parviflora</i>	-	-	Ja, ex planta
<i>A. pavia</i>	-	-	Ja, ex planta
<i>A. turbinata</i>	+		Ja, ex planta

Tabel 8 geeft een overzicht van morfologische en anatomische respons op infectie met *P. syringae* alsook de immunocytochemische detectie van *P. syringae* ter plaatse van infectie. Uit de wondreacties blijkt dat *A. hippocastanum*-cultivars grotere gevoeligheid en sterkere respons op infectie vertonen dan soorten als *A. pavia*, *A. parviflora* en *A. flava*.

Conclusies en aanbevelingen

Screening verschillende soorten/variëteiten

De *Pseudomonas syringae* bacterie kan, behalve in *Aesculus hippocastanum* 'Incisa', zonder probleem teruggeïsoleerd worden uit alle cultivars van *A. hippocastanum*. In het geval van de cultivar 'Incisa' is de herisolatie niet gelukt, terwijl de symptomen duiden op infectie (uitbreiding waargenomen). Dit resultaat komt overeen met de verkregen resultaten uit eerdere uitgevoerde isolaties uit dezelfde cultivar in Arboretum Belmonte.

De proef met de hybriden heeft onverwachte resultaten opgeleverd. De *P. syringae* bacterie kon uit verkleurd weefsel van twee verschillende rode paardenkastanjes (de gewone en de cultivar 'Plantierensis') niet worden teruggeïsoleerd, terwijl de verschijnselen wel verdacht waren. Aan de andere kant is de isolatie bij *A. x mutabilis* gelukt hoewel de visuele symptomen op de takken niet leken op een infectie met aantasting van het bastweefsel. Dit is mogelijk te verklaren door overleving van de geïnoculeerde bacterie.

In rode en gele pavia kastanje (*A. pavia* en *A. flava*) werden slechts zeer zwakke symptomen en geen uitbreiding waargenomen, terwijl de bacterie vrij eenvoudig kon worden teruggeïsoleerd. In deze twee soorten werd de ziekte in de landelijke inventarisatie ook veel minder aangetroffen. De soort *A. parviflora* bleek in het experiment geheel niet te worden aangetast. De soort wordt in Nederland nauwelijks aangetroffen en hierin is tot heden de ziekte niet gemeld. *A. turbinata* (Japanse soort die in Nederland niet voorkomt buiten arboreta) blijkt zeer gevoelig voor infectie na inoculatie.

Omdat de herisolaties uit de verschillende takken relatief kort na de inoculaties uitgevoerd zijn, geven positieve herisolaties niet persé betrouwbare informatie over het aanslaan van de infectie. De bacterie kan zich na inoculatie best nog enige tijd handhaven zonder dat daadwerkelijk infectie optreedt. Verder bestaat nog de mogelijkheid van foute interpretaties door mislukte herisolaties. Het is wellicht dus het beste om de

mate van uitbreiding van de aantastingsplek te beschouwen als maat voor de vatbaarheid van de verschillende soorten, cultivars en hybriden. Om zeker te zijn dat de symptomen geïnduceerd worden door de geïnoculeerde bacterie, zal tevens herhaaldelijk moeten worden geherisoleerd. Er kan voorlopig geconcludeerd worden dat *A. x mutabilis*, *A. flava*, *A. parviflora* en *A. pavia* niet (of tenminste minder) vatbaar lijken te zijn voor de bloedingsziekte.

Om de tot nu toe verkregen resultaten te bevestigen, is het aan te bevelen deze proef te herhalen met alle hier gebruikte (of zelfs meer) vormen van *Aesculus* en met voorkeur op zaailingen.

Screening histologische aspecten

Uit de wondreacties blijkt dat *A. hippocastanum*-cultivars grotere gevoeligheid en sterkere respons op infectie vertonen dan soorten als *A. pavia*, *A. parviflora* en *A. flava*. (Voor een overzicht zie Tabel 03).

Binnen de groep cultivars van *A. hippocastanum* is er variabele gevoeligheid voor aantasting door *P. syringae*. Soms is er gehele stop van cambiumactiviteit. In andere gevallen leidt versterkte groei tot afsluiting van de wonden. Omdat de respons wisselend is maar in alle gevallen bacteriën (2 maanden na inoculatie) serologisch zijn teruggevonden kan er sprake zijn van genotypische variatie tussen de cultivars.

Een aantal soorten waaronder *A. pavia*, *A. flava* en *A. parviflora* vertonen geen morfologische reactie, behalve het vormen van een nieuw periderm op de plaats van verwonding. De bacterie is echter in alle gevallen 'ex planta' teruggevonden. Dit wijst op een ongevoeligheid voor het pathogeen. Anderzijds is een normale wondherstelreactie bij deze soorten ook niet gezien als bacteriën zijn geïnoculeerd. Dat geeft aan dat de bacterie, hoewel niet pathogeen, de herstelreactie blokkeert.

3.2.2 PPO-cascade in andere *Aesculus*-soorten en cultivars

Projectleider: Prof. Dr. Linus H.W. van der Plas (WUR)

Projectmedewerkers: Diaan Jamar (WUR)

Inleiding

Polyfenoloxydase-cascade

Onafhankelijk van de vraag op welke wijze de bloedingsziekte in paardenkastanjes wordt geïnitieerd, is het van belang om fysiologische en biochemische processen in en rond de 'wonden' te begrijpen en methoden te ontwikkelen om deze tot stilstand te brengen. In 2005 is onderzocht of een zichzelf versterkend proces van celafbraak en verbruining de waargenomen verschijnselen kunnen veroorzaken en vervolgens of door ingrijpen in dit proces aan deze verschijnselen een halt kan worden toegeroepen.

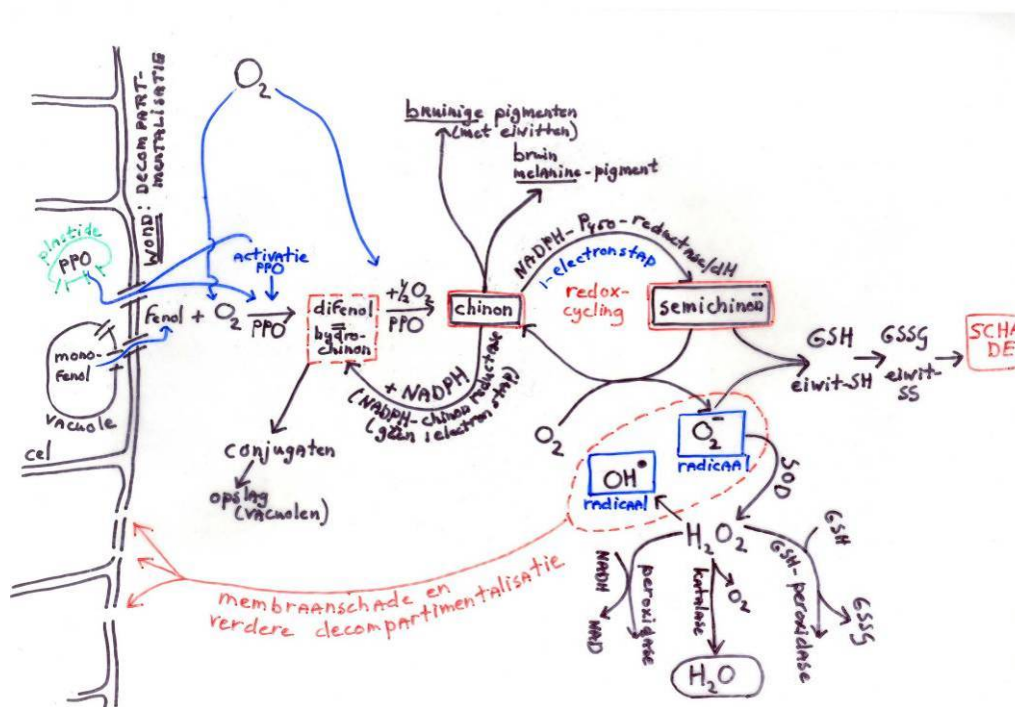
In dit proces zijn twee fasen te onderscheiden: (1) een initiatiefase en (2) een vervolgcascade; zie figuur 43. In de initiatiefase treedt er afbraak op van de membranen van cellen in de bast, met als gevolg compartimentalisatie van de celonderdelen en activeren van de reactie van polyfenoloxydase, waarbij fenolen (altijd ruim aanwezig in de stam als bouwstenen van lignine) met zuurstof worden omgezet in chinonen, die op hun beurt (direct of indirect met eiwitten) reageren tot bruin of rood gekleurde melanine/tannineachtige stoffen (linkerkant van figuur 43). Dergelijke reacties treden vaak op bij verwonding en zijn dan vaak beperkt van omvang.

De chinonen kunnen echter ook aanleiding geven tot een vervolgcascade, die bij kastanje een rol kan spelen bij de waargenomen symptomen van de 'bloedingsziekte' (rechterkant van figuur 1). Via een enzymatische tussenstap (redox cycling: vorming van semichinonen) kunnen er zuurstofradicalen ontstaan (en de nog schadelijker OH-radicalen) die, als ze niet tijdig worden weggewerkt, weer nieuwe membraanschade kunnen veroorzaken. Het gevolg is verdergaande compartimentalisatie, verdergaande polyfenoloxydase-activatie, vorming van nog meer chinonen en vervolgens nog meer schadelijke radicalen. Wanneer dit proces niet

gestopt wordt, breidt het zich verder uit en leidt dit tot bloeding en vorming van bruine pigmenten op steeds grotere schaal.

Het voorkómen van deze 'vervolgcascade' is essentieel voor elke plant. Daarvoor is gewoonlijk een aantal verdedigingsmechanismen werkzaam:

- het wegwerken van fenolen via conjugatie en opslag in de vacuole.
- het enzymatisch omzetten van chinonen zonder dat er redoxcycling en vorming van schadelijke semichinonen plaatsvindt.
- het wegwerken van de zuurstofradicalen (met het enzym SOD, superoxide-dismutase) en het voorkómen van de vorming van OH-radicalen (door waterstofperoxide te verwijderen met bijv. katalase of peroxidase).



Figuur 43: Schematische weergave proces celafbraak en verbruining.

Op basis van de gepostuleerde relatie tussen de PPO-cascade en het gevoelig zijn voor de kastanjeziekte, is het interessant om na te gaan of in *Aesculus hippocastanum*-accessies/cultivars cq. *Aesculus*-soorten, die niet of minder gevoelig zijn voor *Pseudomonas*, een veranderde PPO-cascade voorkomt. Uiteraard is het mogelijk dat de resistentie niet gerelateerd is met deze cascade en dan zullen PPO en fenolsubstraat ook in deze soorten/cultivars kunnen voorkomen in vergelijkbare hoeveelheden.

Gezien het feit dat aangetaste bomen van *A. flava* en *A. pavia* in het inventarisatieonderzoek nauwelijks werden aangetroffen, werd in eerste instantie gekeken in een eenvoudige visualisatie/schaaltjesopzet, of de PPO-reactie plaatsvindt met *pavia* en *flava*-materiaal. Vervolgens is ook gekeken naar de reactie in takken die kunstmatig waren geïnfecteerd met *Pseudomonas syringae*.

Materiaal en methoden

Bemonstering:

Om na te gaan of de reactie van de PPO-cascade verschilt, wanneer verschillende soorten/accessies van

Aesculus worden geïnfecteerd met *Pseudomonas*, is een proef opgezet, waarbij boomtakken van deze soorten/accessies op water werden gezet in een kas en vervolgens werden geïnfecteerd. Opgepotte toetsplanten van deze soorten/cultivars waren niet beschikbaar. Hiermee moet bij de vergelijking van de uitkomsten van deze proef met de eerdere proeven rekening worden gehouden.

Voor een beschrijving van de opzet en de anatomisch/morfologische en epidemiologische reacties wordt verwezen naar paragraaf 3.2.1, onderdeel B. Bij de meeste experimenten die in dit deel worden beschreven, is gemonsterd van niet-geïnfecteerde takken om de basiseigenschappen van de PPO-cascade voor de verschillende cultivars, kruisingen en *Aesculus*-soorten te karakteriseren. Bij de experimenten met geïnfecteerde takken is gemonsterd rond de plaats van inoculatie.

“Vivo”-lekkage-proef:

Onmiddellijk na het monstern werd een aantal stukjes gebruikt voor de ‘vivo-lekkage’-proef. Deze direct gebruikte stukjes werden in vieren gesneden, per behandeling samengevoegd en gezamenlijk geïncubeerd (geschud) gedurende 30 minuten in buffer (bij 4 °C). Na een half uur werd de buffer (met daarin al dan niet uitgelekt polyfenoloxydase en fenolen) over twee schaaltes verdeeld; aan één werd als substraat catechol toegevoegd, aan de ander niet. Vervolgens werd de kleurontwikkeling gedurende een aantal dagen vervolgd en regelmatig gefotografeerd.

Een deel van de ingevroren stukjes werd na 3 uur bij – 20 °C weer bij kamertemperatuur gebracht; vervolgens werden ze op identieke manier behandeld als de vorige batch (d.w.z. verdeeld in vieren, 30 minuten geschud bij 4°C in buffer, buffer daarna verdeeld over twee schaaltes, één met en één zonder catechol en vervolgens gevolgd in de tijd).

De rationale achter de “in vivo”-lekkageproef is, dat alleen als er cellen kapot zijn, de polyfenoloxydase en het fenol uit de stukjes lekken en kleurontwikkeling (verbruining) geven; met toegevoegd catechol wordt maximaal polyfenoloxydase-activiteit gemeten, zonder catechol alleen omzetting van eigen fenolen, indien aanwezig. Van de gedurende 3 h ingevroren stukjes zijn alle cellen kapot en deze geven maximale uitlek en maximale activiteit. De niet bevroren stukjes geven alleen kleur als de cellen om andere redenen lek zijn geraakt: bijvoorbeeld wanneer de celmembranen zijn aangetast door de ‘polyfenoloxydase -cascade’. Op deze wijze wordt een eenvoudige toetsingsmethode op vroege lekkage toegepast.

Kwantitatieve veranderingen in onderdelen van het polyfenoloxydase-cascade-systeem.

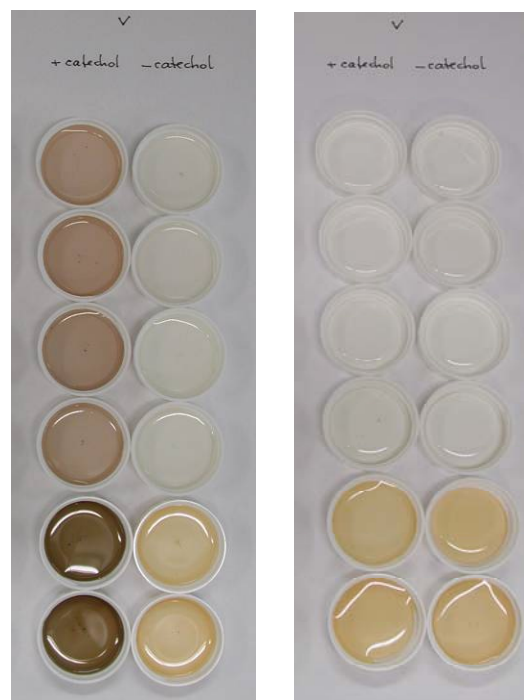
Om de veranderingen precies te kunnen volgen, en om deze veranderingen te kunnen kwantificeren zijn de activiteit van polyfenoloxydase en de hoeveelheid fenol, de beginpunten van het proces, in sommige experimenten ook kwantitatief bepaald.

Resultaten en Discussie

Monsters van bomen

Het bleek dat beide factoren, fenolsubstraat en PPO, verschilden wanneer het *A. flava* en *A. pavia* materiaal werd vergeleken met het *A. hippocastanum* materiaal, maar met name het voorkomen van fenolsubstraat leek in de eerste twee soorten grotendeels te ontbreken: *A. hippocastanum* geeft ook bruine reactieproducten zonder toegevoegd substraat op basis van de PPO-reactie met eigen fenolsubstraat, *A. flava* en *A. pavia* geven nauwelijks/geen zichtbare producten zonder toegevoegd fenolsubstraat (bij gebruik van verse takken).

Ook de PPO-reactie ontwikkelt zich trager, met als resultaat dat de verbruining bij *A. pavia* en *A. flava* wel op gang komt, maar na 20 uur nog duidelijk achterloopt bij die van *A. hippocastanum* (zie figuur 44).



Figuur 44:

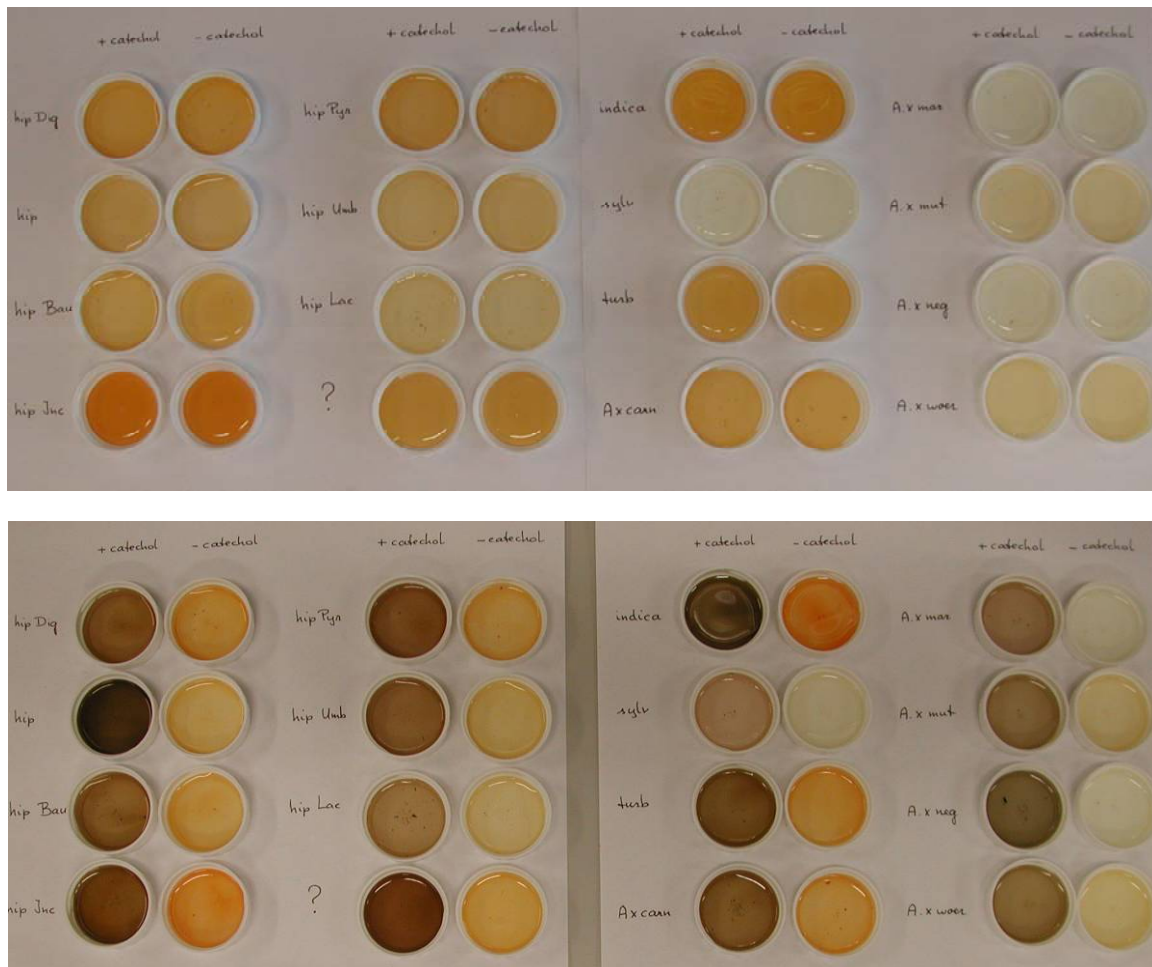
Visualisatie/schaaltjesproef in duplo van verse takken van *Aesculus flava* (bovenste 2 rijen), *Aesculus pavia* (middelste rijen) en *Aesculus hippocastanum* (onderste 2 rijen). Proef uitgevoerd op 13 september 2007.

PPO-reactie, met en zonder fenolsubstraat (catechol) op $t = 0$ (links) en $t = 20$ h (rechts).

PPO-reactie met eigen substraat is vrijwel afwezig in *A. flava* en *A. pavia*, maar duidelijk in *A. hippocastanum* (rechterschaltjes, - catechol); met toegevoegd substraat (+ catechol), vertonen alle soorten een verbruiningsreactie, die bij *A. flava* en *A. pavia* langzamer verloopt.

Bij een uitgebreidere test, waarin ook verschillende andere soorten en cultivars werden meegenomen, bleek fenolsubstraat duidelijk afwezig bij *A. sylvatica*, *A. x marylandica*, *A. x mutabilis*, *A. x neglecta* en *A. x woerlitzensis*, die allen geen bloeding vertoonden (figuur 45). Al deze typen vertoonden wel een PPO-reactie met catechol als toegevoegd substraat, hoewel minder snel dan controle *A. hippocastanum*. Zo was de PPO-activiteit van *A. x marylandica* in een cuvette-test 3-5 maal lager dan die van controle *A. hippocastanum*. Het lijkt voor de hand te liggen in de PPO-cascade-hypothese, dat *afwezigheid van fenolsubstraat* en een *verminderde PPO-activiteit* de ontwikkeling van de cascade tegenhoudt en een bijdrage kan leveren aan de vermindering van de aantasting.

Het blijkt echter nog niet mogelijk om deze redenering om te draaien: soorten/cultivars die niet of minder zijn aangetast (vergelijk bijvoorbeeld *A. indica*) kunnen toch duidelijk fenolsubstraat en PPO-activiteit vertonen, vergelijkbaar met *A. hippocastanum*.



Figuur 45:

Visualisatie/schaaltjesproef van verschillende soorten/cultivars van *Aesculus*. Proef uitgevoerd op 23 oktober 2007. PPO-reactie, met en zonder fenolsubstraat (catechol) op $t = 0$ (bovenste deelfiguur) en $t = 20$ h.

PPO-reactie met eigen substraat (- catechol) is vrijwel afwezig in 5 *Aesculus*-soorten/kruisingen (*sylvatica*, *x marylandica*, *x mutabilis*, *x neglecta* en *x woerlizensis*; rechterdeelfiguren) maar duidelijk in alle *A. hippocastanum* accessies; linkerdeelfiguren).

Met toegevoegd substraat (+ catechol), vertonen alle typen een verbruiningsreactie, die met verschillende snelheid verloopt. De verschillen in kleur bij de schaaltes zonder catechol, zijn een gevolg van verschillen in type fenolsubstraat.

Binnen de gemonsterde *A. hippocastanum*-cultivars, vertoonde alleen het gemonsterde exemplaar van de *cv. Laciniata* geen bloeding; hoewel het mogelijk is dat dit exemplaar toevallig niet was aangetast, waren ook de *Laciniata*-exemplaren uit het inventarisatieonderzoek van 2005 grotendeels niet aangetast. De PPO-activiteit en de hoeveelheid fenolsubstraat waren echter in de schaaltesproef misschien wat lager, maar verschilden niet duidelijk in deze test van de wel aangetaste *A. hippocastanum*-cultivars. De gemonsterde exemplaren van de andere geteste cultivars vertoonden bloeding, ook voor die cultivars die uit de inventarisatie als 'weinig aangetast' (bijv. *Pyramidalis*) naar voren kwamen.

Monsters van takken, kunstmatig geïnfecteerd met *Pseudomonas PD4818*

Figuur 46 laat zien dat de PPO-reactie met eigen substraat (- catechol, na invriezen; rij 2) vrijwel afwezig is in de *Aesculus*-soorten/kruisingen *x mutabilis*, *flava*, *parviflora* (onderste drie series van figuur 4B) en ook beperkt in *A. pavia* en *A. x carnea* 'Plantierensis'. Deze reactie is het sterkst in *A. x carnea*, *A. turbinata* en *A. hippocastanum* 'Memmingeri' en *A. hippocastanum* 'wit'.

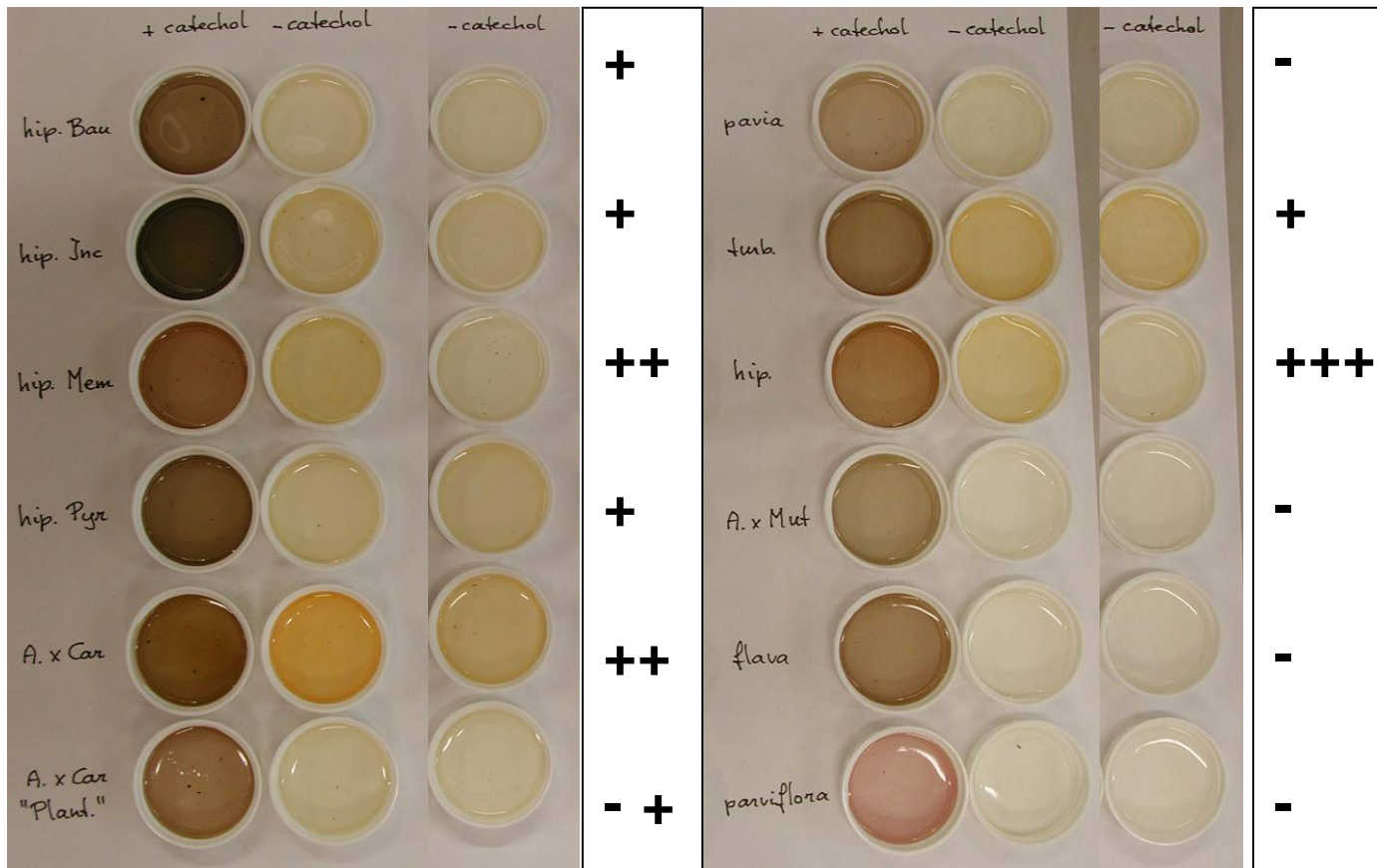
PPO-activiteit is in alle soorten/cultivars/kruisingen/types aanwezig, wanneer er overmaat substraat wordt

aangeboden (+ catechol, na invriezen, rij 1). De mate van bruin/zwartkleuring is variabel. *A. hippocastanum* 'Incisa' springt er uit, door zijn sterke kleuring; *x mutabilis*, *flava*, *parviflora* en *pavia* zijn (mogelijk) wat geringer in kleurontwikkeling dan het gemiddelde.

Het verschil in PPO-reactie met eigen substraat (- catechol) tussen de monsters waarvan alle cellen lek zijn gemaakt (rij 2) en de monsters, waarvan de cellen niet kunstmatig extra (NB. uiteraard met uitzondering van de cellen op het snijvlak, die zijn aangesneden bij de monsterring) zijn kapotgemaakt (rij 3), is vooral duidelijk in *A. x carnea*, *A. hippocastanum* 'wit' en mogelijk ook in *A. hippocastanum* 'Memmingeri'.

Wanneer deze resultaten worden vergeleken met de morfologische reacties, die zijn verbonden met de mate van aantasting (vergelijk paragraaf 3.2.1, onderdeel B; vergelijk de aanduidingen "-.", "- +", "+", "++" en "+++" in figuur 46), dan zouden de volgende relaties hiermee kunnen worden gelegd:

- De niet (*A. pavia*, *A. flava* en *A. parviflora* en *A. x mutabilis*) of slechts beperkt (*A. x carnea* 'Plantierensis') aangetaste soorten/cultivars/accessies/kruisingen vallen op door de (zeer) geringe hoeveelheid eigen fenolsubstraat, waardoor de PPO-reactie zonder toegevoegd catechol maar zeer beperkt plaatsvindt. Het PPO-enzym is wel aanwezig en actief, maar deze activiteit is (mogelijk) wel geringer dan bij de andere cultivars/soorten. Dit sluit aan bij de eerder in dit verslag beschreven waarnemingen.
- De sterk aangetaste/morfologisch sterk reagerende cultivars/accessies/soorten/kruisingen vertonen een duidelijke PPO-activiteit zowel met eigen als met extern fenolsubstraat. Bij de monsters, die veel intern substraat afgeven bij het kapotmaken van de cellen door vriezen (vergelijk rij 2 en rij 3; bijvoorbeeld *A. x carnea* en *A. hippocastanum* 'wit') valt op dat ze afkomstig zijn van typen die sterk aangetast zijn/sterk reageren; andere monsters (bijvoorbeeld afkomstig van *A. hippocastanum* 'Baumanni') geven door vriezen weinig extra substraat af en vertonen een minder sterke aantasting/morfologische reactie. Dit zou wellicht kunnen worden geïnterpreteerd, doordat *A. x carnea* veel fenol in de cellen heeft zitten (komt pas vrij door vriezen) terwijl dat bij *A. hippocastanum* 'Baumannii' niet het geval is: daar is wel fenol aanwezig is, maar vooral in de apoplast (bijvoorbeeld als lignine-bouwstof). Met name de typen die fenolen in de cellen beschikbaar hebben, zouden gevoelig kunnen zijn voor de PPO-cascade-effecten (zie inleiding) en het ontstaan van radicalen/toxische verbruiningsproducten.



Figuur 46: Visualisatie-/schaaltjesproef van verschillende soorten/cultivars van *Aesculus*, die op 1 oktober 2007 waren geïnfecteerd met *Pseudomonas*isolaat PD4818. Proef uitgevoerd 8 weken na infectie (op 24 november). De figuur toont de reactie na 24 uur. Voor beide deelfiguren A en B geldt dat er drie rijen schaaltes worden getoond:

- rij 1: PPO-reactie, met toegevoegd fenolsubstraat (+ catechol) aan lekvloeistof van ingevroren monsters (alle cellen kapot, overmaat substraat: maximale PPO-reactie)
- rij 2: PPO-reactie, zonder toegevoegd fenolsubstraat, aan lekvloeistof van ingevroren monsters (alle cellen kapot, alleen intern substraat: maximaal mogelijke PPO-reactie met intern substraat, maat voor totaal fenolsubstraat)
- rij 3: PPO-reactie, zonder toegevoegd fenolsubstraat, aan lekvloeistof niet-ingevroren monsters (alleen cellen kapot, die intactheid *in vivo* al verloren hadden + de monsterings-snijvlak-cellen: PPO-reactie beperkt tot gebruik van fenolsubstraat, dat uit deze cellen afkomstig is en wat in de apoplast/celwand beschikbaar is: maat voor apoplastisch fenolsubstraat).

Conclusies

Monsters van bomen

Voorzichtig kunnen de volgende conclusies getrokken worden op basis van gevonden waarnemingen:

- Ontbreken of grotendeels ontbreken van fenolsubstraat (te detecteren via een vries-dooi-cyclus) gaat samen met verminderde gevoeligheid/resistentie, maar er spelen ook andere factoren een rol: een aantal van de "resistente" soorten laten toch duidelijk een dergelijke vries-dooi-opgewekte fenolsubstraat-productie zien.
- PPO-activiteit is vaak wat lager in de minder gevoelige soorten, maar er wordt steeds een duidelijke PPO-reactie met toegevoegd substraat gevonden.
- Hoewel er interessante kleur- en activiteitsverschillen zijn tussen de verschillende *hippocastanum*-cultivars, is de relatie met gevoeligheid op basis van deze pilot-proef niet te leggen, vooral ook

omdat er maar één mogelijk minder gevoelige *hippocastanum* in het geteste assortiment aanwezig was.

Monsters van takken, kunstmatig geïnfecteerd met *Pseudomonas PD4818*

De (voorlopige) conclusies op basis van dit onderzoek:

- De aanwezigheid van intern fenolsubstraat, vooral in de cellen, is een belangrijke factor in het aanzetten van de schadelijke PPO-cascade en de productie van schadelijke radicalen/verbruiningsproducten.
- Afwezigheid van fenolsubstraat kan dus een eerste signaal zijn voor de aanwezigheid van resistentie/verminderde gevoeligheid.
- “Extra” aanwezigheid van fenolsubstraat in de levende cellen is dan een mogelijke extra factor die aanwijzingen kan geven voor vergrote gevoeligheid.
- PPO-activiteit wordt altijd gevonden in resistente en vatbare soorten/cultivars, hoewel er mogelijk een relatie is tussen vergrote gevoeligheid en vergrote PPO-aanwezigheid.

3.3 (A)biotische factoren

3.3.1 Inventarisatie groeiplaatsomstandigheden

Projectleider: Ir. Jitze Kopinga (Alterra)

Projectmedewerker: Bart Stoffer (Groenadvies Amsterdam), Leo Slingerland (PPO)

Inleiding

Reeds in 2005 en 2006 zijn landelijke inventarisaties uitgevoerd onder de Nederlandse gemeenten om de ernst en omvang van de ziekte in beeld te krijgen en om te achterhalen onder welke groeiplaatsomstandigheden de ziekte het meest optreedt. De gegevens werden daarbij aangeleverd door de plaatselijke groenbeheerders. De op deze manier verkregen gegevens waren door hun grote variabiliteit echter onvoldoende geschikt om betrouwbare relaties te kunnen bepalen tussen de invloed van (stress verhogende) groeiplaatsfactoren en de mate van aantasting.

Stressfactoren en hun invloed op de bloedingsziekte zijn derhalve nog onvoldoende bekend. Weliswaar heeft het in 2006 uitgevoerde groeiplaats- en stressfactorenonderzoek inzicht opgeleverd in de relatie tussen de conditie van de boom en de aantasting door de bloedingsziekte, maar hangende de resultaten van de tegelijkertijd uitgevoerde landelijke inventarisatie is een aantal aspecten daarin nog niet meegenomen. Voor het opstellen van een gedegen praktijkadvies is echter ook kennis noodzakelijk van een aantal van de relaties tussen stressfactoren die tot dusver buiten beschouwing zijn gebleven en het optreden van de bloedingsziekte.

In het onderzoek van 2007 is besloten om locaties uit de voorgaande inventarisaties meer gedetailleerd op groeiplaatsaspecten te onderzoeken. Aansluitend op het in 2006 uitgevoerde onderzoek is daarin wederom de conditie van de bomen meegenomen. Ook is in het bijzonder gekeken naar de eventuele invloed van aantasting door de paardenkastanjiemineermot (*Cameraria ohridella*) als mogelijk stressverhogende factor. Beheermaatregelen zoals snoei en de vochtleverantie gedurende periodes van droogtestress zijn eveneens in ogenschouw genomen evenals de mate van aantasting van de onderstam van hoog op onderstam vermeerderde cultivars en de wijze waarop op individuele bomen tot dusver op een aantasting hebben gereageerd met de vorming van wondovergroeingsweefsel.

Materiaal en methoden

De veldopnames zijn uitgevoerd in de periode 1 augustus – 15 september door twee groepen bomenonderzoekers: een groep van het bureau Groenadvies Amsterdam bv (hierna aangeduid als Groenadvies) en een groep van medewerkers van het Praktijkonderzoek te Lisse.

Uit de overzichten van de landelijke inventarisaties van 2005 en 2006 zijn objecten geselecteerd met rijbeplantingen of groepen van minimaal tien bomen. Hierbij waren objecten met bomen met verschillen in

mate van aantasting, dus ook objecten met zowel gezonde als aangetaste bomen.

Waar de standplaatsomstandigheden binnen een object plaatselijk varieerden en er ruim voldoende bomen in het object aanwezig waren, zijn onderverdelingen gemaakt in subobjecten van ook minimaal tien bomen per standplaatsituatie (o.a. verharding versus geen verharding).

Bij de selectie is enigszins rekening gehouden met de ligging c.q. “logistieke” bereikbaarheid vanuit het Westland (Amsterdam of Boskoop), Zuid Limburg, Groningen en Friesland (waar overigens ook wel interessante verschillen zijn) zijn zodoende buiten beschouwing gebleven.

Omwille van de “meetbaarheid” van de bomen zijn vooral objecten geselecteerd met bomen uit de middenzware klasse, d.w.z. met een stamdiameter van 20 à 25 tot 50 cm, waarvan verwacht mag worden dat ze hun wortelstelsel al buiten het plantgat hebben ontwikkeld. Jonge bomen zijn (mede) hierom buiten beschouwing gelaten.

Als boomsoort zijn de witte en rode paardenkastanje gekozen met daarvan respectievelijk de cultivars ‘Baumannii’ en ‘Briotii’. De laatste is in het verleden wel eens hoog op onderstam (van doorgaans de witte paardenkastanje) vermeerderd en een aantal objecten met deze zgn. hoog veredelde bomen is in dit onderzoek meegenomen om een indicatie te krijgen over de mate waarin de aantasting van de onderstam zich verhoudt tot die van de gehele boom.

Omwille van een uniforme beoordeling van de op te nemen aspecten is aan het begin van de reeks veldwaarnemingen tussen de afzonderlijk opererende meetploegen één en ander onderling afgestemd. Ook zijn alle objecten, en de opvallende kenmerken daarvan, fotografisch vastgelegd.

Er zijn in totaal 1497 bomen beoordeeld in 120 objecten (tabel 9), verspreid over 14 gemeenten. De objecten waren alle straat- of laanbeplantingen. Ongeveer de helft van het aantal bomen (48 %) was vrij van aantasting door de bloedingsziekte.

Onder de 1497 bomen waren van de witte paardenkastanjes (*Aesculus hippocastanum*) er 157 aangegeven als soort, 886 als de cv. ‘Baumannii’ en 22 als de cv. ‘Pyramidalis’. Van de rode paardenkastanjes (*Aesculus x carnea*) waren er 266 aangegeven als soort en 167 als de cv. ‘Briotii’.

Tabel 9: Overzicht van gemeenten, aantal objecten per gemeente en de opnamegroep

Gemeente	N-objecten	N-Bomen	Opnemer
Maarssen	2	24	Groenadvies
Amsterdam	27	333	Groenadvies
Gouda	4	57	Praktijkonderzoek
Haarlemmermeer	3	31	Groenadvies
Heerhugowaard	8	100	Groenadvies
Huizen	6	72	Groenadvies
Purmerend	4	53	Groenadvies
Rijswijk	1	14	Praktijkonderzoek
Rotterdam	29	349	Praktijkonderzoek
Schiedam	4	49	Praktijkonderzoek
Schijndel	4	52	Praktijkonderzoek
s'-Gravenhage	16	197	Praktijkonderzoek
's-Hertogenbosch	9	134	Groenadvies
Wassenaar	3	32	Praktijkonderzoek

Per object is vastgelegd:

1. Het aantal bomen en de exacte locatie van de bomen. (De bomen zijn zodanig in kaart gebracht (uniek nummer, oriëntatiepunt, etc.) dat ze als individu naderhand weer eenvoudig kunnen worden getraceerd t.b.v. bemonstering en vervolgonderzoek.)
2. De soort of cultivar.
3. De leeftijd (of het planttijdstip) van de bomen
4. De standplaats, ingedeeld in de categorieën: verharding, berm, plantvak, gazon en “overige”.
5. De grootte van het oorspronkelijke plantgat (oppervlakte van de plantspiegel).
6. De gemiddelde conditie/vitaliteit van het object. Dit is aangegeven als rapportcijfer dat varieert

- tussen 1 = “zeer slecht” tot 10 = “uitmuntend”.
7. De bodemopbouw, beschreven aan de hand van waarnemingen van een representatieve profielboring van de bewortelde bodemzone.
 8. De oorspronkelijke bodemsoort, ingedeeld in de categorieën: zand, zavel, klei en veen.
 9. Het vochtleverend vermogen van de groeiplaats. Dit is geschat op basis van bodemkenmerken van de profielboring. Voor bodems waar het grondwater in principe voor de boomwortels bereikbaar is, is dit uitgedrukt als “onbeperkt”, “beperkt gedurende korte tijd”, “beperkt gedurende langere tijd”, eventueel aangevuld met informatie over de aanwezigheid van grondwater. In situaties waar het grondwater te diep zit, is dit aangegeven als “hangwaterprofiel”.
 10. De frequentie waarin de bomen worden gesnoeid en het tijdstip van de laatst uitgevoerde snoei en het percentage van het kroonvolume dat daarbij is verwijderd, ingedeeld in de categorieën: “< 5%”, “5%”, “5-10%”, “10%”, en “>10%”.
 11. Overige in het verleden uitgevoerde beheermaatregelen, zoals bodemverbetering.

Per boom is vastgelegd:

1. De boomhoogte
2. De stamdiameter, opgemeten als stamomtrek op 1,3 m hoogte boven maaiveld (DBH). Waar nodig (bijvoorbeeld bij hoog op onderstam veredelde bomen) zijn twee afzonderlijke metingen van de stamomtrek geëxtrapoleerd naar de DBH.
3. De conditie van de boom, uitgedrukt als rapportcijfer dat varieert tussen 1 = “zeer slecht” tot 10 = “uitmuntend”.
4. Gemiddelde schotlengte, op basis van een schatting.
5. Gemiddelde bladsteellengte van het grootste blad per takscheut, eveneens op basis van een schatting.
6. De bladkleur, door visuele waardering aangegeven als: geel geelgroen, groengeel, lichtgroen, normaal groen en donkergroen. De categorieën zijn tijdens de opnames vastgelegd met kleurenfoto's van de boomkronen.
7. De mate waarin andere symptomen zoals bladvlekken en een verkleurde bladrand in de boom waarneembaar zijn, bij schatting uitgedrukt als percentage bladaantasting. Hierbij is een onderverdeling gemaakt naar bladrandnecrose door de invloed van (strooi)zout en bladvlekken als gevolg van een aantasting door de bladvlekkenziekte van paardenkastanje (*Guignardia aesculi*).
8. Aantasting door de paardenkastanjemineermot (*Cameraria ohridella*), uitgedrukt als rapportcijfer: 0 = geheel vrij t/m 10 = geheel aangetast. De waarderingen zijn vastgelegd met fotobeelden van de boomkronen.
9. Aantasting van het stamgedeelte door de bloedingsziekte, geschat als % van het stamoppervlak van de takvrije stam.
10. De aanwezigheid van de bloedingsziekte op de dikkere takken van de boom (wel of niet)
11. De aanwezigheid van recente aantastingen van de bloedingsziekte op de stam (wel of niet)
12. De aanwezigheid van oude aantastingen van de bloedingsziekte op de stam (wel of niet)
13. De aanwezigheid van wondovergroeiingsweefsel (wondcallus) rond de aantastingsplekken (wel of niet)
14. Bij bomen die op onderstam zijn veredeld: de DBH van de onderstam en de stamdiameter op ca 30 cm boven de entplaats.
15. Bij bomen die op onderstam zijn veredeld zijn de punten 9 t/m 13 voor de onderstam én voor de rest van de takvrije stam daarboven apart beoordeeld.

Omdat de populatie van de bomen met aantasting op bepaalde aspecten sterk afwijkt van een normale verdeling is bij de statistische verwerking van de resultaten c.q. toetsingen op significantie van eventuele verschillen gekozen voor toepassing parameter vrije methoden.

Resultaten

Algemeen

Tabel 10 geeft een overzicht van de periode waarin de opnamen zijn verricht evenals een aantal overige kenmerken van de bomen en de objecten. Gegevens over het tijdstip van het jaar waarin de bomen voor het laatst zijn gesnoeid konden niet voor alle locaties worden achterhaald. Data betreffende het planttijdstip van de bomen konden vaak ook niet worden achterhaald en zijn bij de verdere verwerking buiten beschouwing gelaten. Soms ontbreken er van de in totaal 1497 opgenomen bomen ook van andere parameters gegevens, maar dat heeft verder weinig invloed op de statistische verwerkbaarheid van de data. Overigens bleek dat er t.a.v. de waardering van sommige parameters tussen de beide meetploegen soms substantiële verschillen zijn die mogelijk zijn toe te schrijven aan verschillen in de wijze van observatie. Omdat dit ondermeer geldt voor het percentage aantasting van de stam door de bloedingsziekte is een aantal statistische bewerkingen afzonderlijk uitgevoerd voor de data van beide meetploegen.

Tabel 10: Overzicht van de opnameperiode, overige boomkenmerken en de objecten met bijbehorende standaardafwijking (STDV= standaardafwijking van het gemiddelde)

Parameter	N-bomen	Minimum	Maximum	Gemiddeld	STDV
Datum (Julian day)	1467	218	250	233.2	10.4
Gemiddelde conditie	1416	3	9	6.8	1.2
Tijdstip laatste snoei	747	1995	2007	2003	2.9
Planttijdstip (jaar)	185	1888	1969	1933	21.7
Conditie per boom	1497	0	10	6.6	1.4
Stamontrek (cm)	1462	29	316	126.3	50.9
Boomhoogte (m)	1495	5	21	10.9	3.3
Schotlengte (cm)	1484	0	45	8.6	5.8
Bladsteellengte (cm)	1496	2	48	12.7	4.3
Aantasting Cameraria	1495	0	7.5	1.2	1.8
Aantasting van de stam (%)	1475	0	90	3.9	12.1

De conditie van de bomen en de mate van aantasting

Er is een zeer significante negatieve correlatie tussen de conditie van de boom en de mate van aantasting door de bloedingsziekte (R-Spearman = -0.183 bij $p = 0.000$ en $N=1475$).

Wanneer alleen de bomen met recente aantastingen worden bekeken is de correlatie niet meer significant (R-Spearman = -0.200 bij $p = 0.097$ en $N=70$).

Bij bomen met alleen oude aantastingen is de correlatie echter wél weer significant (R-Spearman = -0.237 bij $p = 0.000$ en $N=438$), evenals bij bomen met zowel jonge als oude aantastingen (R-Spearman = -0.164 bij $p = 0.008$ en $N=263$).

Ook de conditie-indicatoren schotlengte en de bladsteellengte vertoonden beide een significant negatieve correlatie met de aantastingsgraad. Voor de schotlengte was dit R-Spearman = -0.078 bij $p = 0.003$ en $N=1462$ en voor de bladsteellengte was dit R-Spearman = -0.161 bij $p = 0.000$ en $N=1474$.

Bij bomen met alleen recente bloedingen vertoonde de aantastingsgraad geen significante correlatie met de schotlengte of bladsteellengte.

Bij de bladkleur als conditie-indicator blijkt dat de zwaarder aangetaste bomen gemiddeld een gelere bladkleur hebben dan de lichter aangetaste bomen (tabel 11). Omdat een gele(re) bladkleur doorgaans wijst op een suboptimale voorziening van voedingselementen (zoals stikstof) ligt dit in de lijn van de bevindingen van het in 2006 uitgevoerde conditieonderzoek.

Tabel 11: Overzicht aantastingsgraad in verschillende categorieën van bladkleur (STDV = standaardafwijking van het gemiddelde. Sign. = significantie voor de verschillen van de gemiddelden waarbij waarden met gelijke letters niet significant van elkaar verschillen, getoetst volgens Mann-Whitney).

Bladkleur	N-bomen	Gemiddeld	STDV	Minimum	Maximum	Sign.
geel	30	5.9	14.1	0	70	bc
geelgroen	117	7.6	17.9	0	90	ab
groengeel	61	11.0	22.6	0	90	a
lichtgroen	366	3.7	12.0	0	80	c
groen	654	3.2	9.9	0	80	c
donkergroen	243	2.5	9.2	0	70	c

De gevonden negatieve correlatie tussen de conditie van de bomen en de mate c.q. omvang van aantasting door de bloedingsziekte geeft aan dat de huidige slechtere conditie van de bomen het gevolg is van een ernstige oude aantasting. Of bomen met een goede conditie ook minder kans lopen om te worden aangetast door de bloedingsziekte komt niet naar voren. De gevonden significante trend geldt namelijk alleen voor bomen die oude aantastingen hebben, al dan niet in combinatie met jonge aantastingen. Van bomen met alleen recente aantastingen is er weliswaar een negatieve trend tussen de conditie van de bomen en de mate van aantasting, maar deze is niet meer significant. De conditie van de bomen zonder aantasting (N=704, gemiddeld 6,8 +/- 1,3) verschilt niet significant van de conditie van de bomen met alleen jonge aantastingen (N=69, gem. 7,0 +/- 1,2).

Groeiplaatsfactoren en de mate van aantasting

Tabel 12 geeft een overzicht van de gemiddelde verschillen in aantastingsgraad van de bomen onder verschillende mate van vochtlevering van de bodem, de standplaats en oorspronkelijke grondsoort. Het blijkt dat alleen de verschillen in de oorspronkelijke grondsoort aanleiding geven tot verschillen in aantastingsgraad.

Tabel 12: Gemiddelde verschillen in aantastingsgraad van bomen onder verschillende mate van vochtlevering van de bodem, de standplaats en oorspronkelijke grondsoort (STDV = standaardafwijking van het gemiddelde. Sign. = significantie voor de verschillen van de gemiddelden waarbij waarden met gelijke letters niet significant van elkaar verschillen, getoetst volgens Mann-Whitney).

Vochtlevering	N-objecten	Gemiddeld	STDV	Minimum	Maximum	Sign.
beperkt (lang)	2	1.5	1.3	0.5	2.4	a
beperkt (kort)	11	1.7	3.4	0	11.8	a
hangwater	17	2.4	4.0	0	13.8	a
onbeperkt	81	4.3	8.1	0	43.6	a

Standplaats	N-objecten	Gemiddeld	STDV	Minimum	Maximum	Sign.
berm	17	0.9	0.9	0	2.4	a
gazon	31	6.5	11.0	0.1	43.6	a
plantvak	14	3.3	4.9	0	16.7	a
verharding	49	3.8	6.9	0	26.2	a
anders	6	4.5	7.0	0.5	18.4	a

Grondsoort	N	Mean	STDV	Minimum	Maximum	Sign.
zand	76	2.6	4.5	0	20.3	a
zavel	8	1.1	0.8	0	2.2	ab
klei	15	7.0	10.6	0	32.8	bc
veen	18	9.1	13.1	0.1	43.6	c

Voor bomen in de verharding is getoetst op een correlatie tussen de plantgatgrootte en de aantastingsgraad. Er was geen significante correlatie.

Bomen met symptomen van bladrandnecrose hadden gemiddeld genomen een hogere aantastingsgraad (5,3 %) dan bomen zonder bladrandnecrose (3,7 %). Dit verschil was echter niet significant ($p=0,06$).

De significante verschillen in gemiddelde aantastingsgraad per object die zijn gevonden op de standplaatsen in een klei- of veengebied en die in een zandgebied komen overeen met de eerder gevonden trend van de landelijke inventarisaties in 2005 en 2006. Evenals toentertijd kunnen ze nog het meest aannemelijk worden verklaard door de bestaande regionale variatie in het aantastingsbeeld. Er zijn geen verbanden te leggen tussen de gemiddelde aantastingsgraad en de gemiddelde vochtleverantie die men normaliter van zand- klei- of veenbodems mag verwachten.

Het ontbreken van duidelijke verschillen in aantastingsgraad van de bloedingsziekte bij verschillende situaties van vochtleverantie van de bodem houdt in dat speculaties over de invloed van droogtestress op de ziekte onvoldoende kunnen worden bevestigd noch ontkracht.

Bomen in een onverharde standplaats hebben gemiddeld een hogere aantastingsgraad dan bomen die in de verharding staan. Dit komt overeen met de resultaten van de eerder uitgevoerde landelijke inventarisaties. Voor dit verschil is vooralsnog geen plausibele verklaring te geven, maar de verschillen in aantastingsgraad per plantplaatstype zijn overigens (nog) niet significant en wanneer men de groeiplaatstypen hergroepeert in alleen de categorieën “verhard” en “onverhard” zijn de verschillen slechts marginaal.

Paardenkastanjemineermot

Er was een lichte correlatie tussen de mate waarin de stam was aangetast door de bloedingsziekte en de aantasting van de boom door de mineermot (R-Spearman = 0,059 bij $p = 0,023$ en $N=1473$).

Bij bomen waarvan ook de onderste takken waren aangetast door de bloedingsziekte was geen enkele correlatie tussen de aantasting door de bloedingsziekte en die door de mineermot (R-Spearman = 0,000 bij $p = 0,998$ en $N=125$). Bij bomen met alleen recente aantastingen van de bloedingsziekte was een lichte, maar niet significante negatieve correlatie aanwezig (R-Spearman = -0,196 bij $p = 0,104$ en $N=70$) met de aantasting door de mineermot. Bij bomen met alleen oude aantastingen was deze significant positief (R-Spearman = 0,131 bij $p = 0,006$ en $N=436$) en bij bomen met zowel recente als oude aantastingen was eveneens een significante positieve correlatie aanwezig (R-Spearman = 0,159 bij $p = 0,010$ en $N=263$).

Wanneer men niet de aantastingsgraad door de bloedingsziekte maar de enkel de conditie van de boom in ogenschouw neemt, dan is de correlatie tussen de aantasting door de mineermot en de conditie van de boom significant positief (R-Spearman = 0,182 bij $p = 0,000$ en $N=1495$).

Dit betekent dat de mineermot meer aanwezig was in de bomen met een goede conditie dan in bomen met een minder goede conditie. Dit zou kunnen wijzen op een kennelijke voorkeur van de mineermot voor goed groeiende bomen boven minder goed groeiende bomen.

Het vormt echter nog geen aanwijzing dat de mineermot een mogelijke vector van de bloedingsziekte is omdat het dan meer in de lijn van de verwachtingen ligt dat juist minder vitale bomen zwaarder met de mineermot zouden zijn bezet.

In hoeverre de paardenkastanjemineermot een rol speelt bij de bloedingsziekte is derhalve nog steeds een intrigerende vraag. De (lichte) correlatie die is gevonden tussen de aantasting door de mineermot en de mate van aantasting door de bloedingsziekte doet een samenhang vermoeden, maar de aard daarvan is nog niet duidelijk en wordt bovendien gerelativeerd door de positieve correlatie tussen de conditie van de boom en de bezetting met de mineermot.

Ook bij bomen met alleen recente aantastingen van de bloedingsziekte was er sprake van een negatieve (weliswaar niet significante) correlatie in plaats van een positieve die men eerder zou verwachten wanneer de mineermot een vector van de ziekte zou zijn. Toch zijn de correlaties bij bomen met oudere aantastingen wél positief, maar ook dit geeft evenmin een aanwijzing voor de eventuele betrokkenheid van de mineermot bij de bloedingsziekte. Het gegeven dat een aantasting door de mineermot per boom jaarlijks varieert, laat niet toe om daar verder onderbouwde uitspraken over te doen.

Bladvlekkenziekte

De aantastingsgraad door de bloedingsziekte van bomen die tevens symptomen van de bladvlekkenziekte vertoonden was gemiddeld 1,6 % (N=269). Bij bomen zonder symptomen van de bladvlekkenziekte was die 4,5 % (N=1204). Dit verschil was echter niet significant (toets: Mann-Whitney). Wanneer de gezonde bomen buiten beschouwing werden gelaten was de gemiddelde aantastingsgraad voor de bomen met bladvlekkenziekte 2,7 % (N=157) en van de bomen zonder bladvlekkenziekte 8,8 (N=612) en was het verschil wél significant (Mann-Whitney $p=0,000$). Wanneer de gegevens worden opgesplitst per groep veldwerkers, komt echter naar voren dat bij Groenadvies de aantastingsgraad bij bomen met bladvlekkenziekte 2,8 % (N=155) bedraagt en bij bomen zonder bladvlekkenziekte 2,2 % (N=233). Dit verschil is dan niet meer significant (Mann-Whitney $p = 0,061$). Bij beoordeling door de PPO-veldwerkers is de aantastingsgraad van de bomen met bladvlekkenziekte 1% (N=2) en die van bomen zonder bladvlekkenziekte 12,8% (N=379). Dit lijkt een groot verschil, maar is evenmin significant. Overigens is aantasting door de bladvlekkenziekte maar bij 270 bomen vastgesteld. Weliswaar was de conditie van de aangetaste bomen iets minder dan die van de niet aangetaste bomen ($p=0,027$, Mann-Whitney), maar dit komt vooral naar voren in de bladkwaliteit (bladsteellengte en -kleur) en niet in de takscheutlengte. De invloed van de bladvlekkenziekte lijkt als conditionerende factor voor de bloedingsziekte én als stressverhogende factor vooralsnog van ondergeschikt belang.

Er is geen aanleiding om te veronderstellen dat bomen die gevoelig zijn voor de bladvlekkenziekte ook meer gevoelig zijn voor de bloedingsziekte. Dit blijkt uit het onderzoek althans niet naar voren te komen. Eerder zijn er aanwijzingen dat bomen zonder bladvlekkenziekte gemiddeld genomen meer last hebben van de bloedingsziekte. Gezien de verschillen in de waarnemingen door de verschillende meetploegen mag hieraan vooralsnog geen bijzondere betekenis worden toegekend, afgezien van de vraag of er in ieder geval een plausibele verklaring voor een aanwezige trend kan worden gevonden en vertaald naar een advies voor de groenbeheerder.

Beheermaatregelen en aantastingsgraad

Slechts van enkele objecten kon worden achterhaald dat er in het verleden groeiplaatsverbeteringen zijn uitgevoerd. Het tijdstip en de aard van de maatregelen konden daarbij niet altijd worden achterhaald en het aspect groeiplaatsverbetering is derhalve verder buiten beschouwing gelaten.

Over het tijdstip van de laatst uitgevoerde snoei en de hoeveelheid kroonvolume dat daarbij is verwijderd zijn alleen door Groenadvies gegevens aangeleverd. Analyse van de gegevens leverde geen significante verschillen op in aantastingsgraad tussen de achterliggende jaren, met uitzondering van het jaar 2001 dat met een gemiddelde aantastingsgraad van 6,25 % beduidende hoger lag dan die van de overige jaren waarin de gemiddelde aantastingsgraad onder 2% lag. Er waren echter slechts twee objecten met snoeitijdstip 2001 en hieraan kan verder weinig (statistische) betekenis worden toegekend. Ingedeeld naar de intensiteit van de laatst uitgevoerde snoei waren er onderling geen significante verschillen in de mate van aantasting.

In hoeverre in het verleden uitgevoerde snoei qua tijdstip en intensiteit van invloed is geweest op de mate waarin de bomen zijn aangetast door de bloedingsziekte kon niet met enige zekerheid worden vastgesteld. Vooralsnog kan dan ook niet worden aangegeven in hoeverre het snoeien van de bomen een aantasting door de ziekte in de hand werkt of juist niet.

Verschillen ent-onderstam

Er zijn bij de opnames 13 objecten waarin in totaal 141 bomen stonden die hoog op stam zijn vermeerderd. Bij 137 bomen betrof het de cv. 'Briotii'. In het algemeen waren de verschillen in aantastingsgraad tussen ent en onderstam vrij gering, maar soms ook vrij groot.

Tabel 13: Een selectie bomen met opvallende verschillen aangetroffen.

Plaats	Locatie	Onderstam	Ent
Den Haag	Nassauplein	0	10
Schiedam	Rembrandtlaan	1	10
Den Haag	Nassauplein	0	40
Den Haag	Marie Heinenweg	20	0
Schiedam	Rembrandtlaan	25	0
Den Haag	Marie Heinenweg	30	0
Schiedam	Rembrandtlaan	40	2
Den Haag	Nassauplein	50	1
Rotterdam	Asserweg	60	0
Den Haag	Van Zeggelenlaan	60	1
Rotterdam	Asserweg	70	0

Opvallend zijn de verschillen die bij hoog veredelde bomen soms zijn waargenomen in aantastingsgraad tussen de ent en de onderstam (tabel 13). Omdat het in alle gevallen gaat om de cv. 'Briotii', kan dit in belangrijke mate worden toegeschreven aan genetische verschillen in de populatie aan onderstammen. Als regel zijn in het verleden zaailingen van de witte paardenkastanje als onderstam gebruikt voor de vermeerdering van cultivars van zowel de witte als de rode paardenkastanje, maar het is niet uitgesloten dat er incidenteel ook onderstammen van zaailingen van de rode paardenkastanje zijn gebruikt. De bevindingen betekenen dat er binnen de soort *Aesculus hippocastanum*, en wellicht ook *Aesculus x carnea*, een genetische diversiteit aanwezig is waarnaar bij de toekomstige selectie van mogelijk voor de bloedingsziekte tolerant uitgangsmateriaal kan worden uitgekeken. Of deze diversiteit voldoende is om te zijner tijd voldoende betrouwbaar tolerant uitgangsmateriaal op te leveren is in dit stadium nog niet aan te geven. Het verdient echter aanbeveling om bij een verdere screening naar de fysiologische achtergronden van de ziekteresistentie ook alvast materiaal te betrekken dat afkomstig is, c.q. kan worden geoogst voor vermeerdering van een aantal van de in dit onderzoek aangetroffen onderstammen.

Wondcallusvorming

In totaal zijn 771 aangetaste bomen beoordeeld op de eventuele vorming van wondovergroeingsweefsel rond de aantastingsplekken. Het blijkt dat 450 bomen wondovergroeingsreacties te zien gaven en 321 bomen niet. De eerste groep had een gemiddelde aantastingsgraad van 9,9 % en de tweede groep 4,1 %. Wanneer alleen de groep bomen in ogenschouw wordt genomen, die wel oude maar geen recente aantastingen hadden was er geen wondcallusvorming bij 136 bomen met een gemiddelde aantastingsgraad van 5,0 % en bij 303 bomen met een gemiddelde aantastingsgraad van 11,9 % was wél wondcallusvorming.

Bij bomen met zowel oude als recente aantastingen vertonen 243 bomen met een gemiddelde aantastingsgraad van 4,8 % geen wondcallusvorming en hebben 445 bomen met een gemiddelde aantastingsgraad van 10,0% wél wondcallus. Van de bomen met oude aantastingen hebben de bomen die callusvorming vertoonden een betere gemiddelde conditie dan bomen die geen callusvorming vertoonden. Dit gaat ook op voor de conditie-indicatoren schotlengte en bladsteellengte. Of de verschillen wel of niet significant waren verschilde echter per meetploeg (tabel 14).

Voor wat betreft de wondcallusvorming komen twee trends naar voren. Ten eerste lijkt er een positief verband te zijn tussen de mate van aantasting (uitgedrukt als percentage van het oppervlak van de stam) en de vorming van wondovergroeingsweefsel. Ten tweede lijkt er een positief verband te zijn tussen de conditie van de boom en de mate waarin wondovergroeingsweefsel wordt gevormd. Omdat beide verbanden met name bij de cv. 'Baumanni' (in totaal 878 bomen) zijn gevonden kan dit in ieder geval niet worden verklaard door genetische verschillen.

Voor het positieve verband tussen de mate van aantasting door de bloedingsziekte en de mate van callusvorming bestaat in de literatuur nog geen heldere boomfysiologische verklaring. Het mag echter niet worden uitgesloten dat bij een zwaardere mate van aantasting eventuele vorming van wondovergroeingsweefsel door een waarnemer eenvoudiger wordt opgemerkt.

Tabel 14: Verschillen van de gemiddelde aantastingsgraad van de bomen, onderverdeeld naar de conditie, schotlengte en bladsteellengte van de bomen én de observaties voor wondcallusvorming van de twee meetploegen. (STDV = standaardafwijking van het gemiddelde. Sign. = significantie voor de verschillen van de gemiddelden waarbij waarden gelijke letters niet significant van elkaar verschillen, getoetst volgens Mann-Whitney).

Meetploeg	Parameter	Wondcallus	N	Gemiddeld	STDV	Sign.
Groenadvies + Praktijkonderzoek	Conditie	nee	243	6.3	1.6	a
		ja	445	6.4	1.3	a
	Schotlengte (cm)	nee	239	7.4	5.7	a
		ja	445	8.9	5.8	b
	Bladsteellengte (cm)	nee	242	12.6	4.5	a
		ja	445	11.9	3.7	b

Meetploeg	Parameter		N	Gemiddeld	STDV	
Groenadvies	Conditie	nee	183	6.5	1.7	a
		ja	139	6.7	1.2	a
	Schotlengte (cm)	nee	179	7.6	6.2	a
		ja	139	9.0	7.2	b
	Bladsteellengte (cm)	nee	182	13.6	4.6	a
		ja	139	13.6	4.1	a

Meetploeg	Parameter		N	Gemiddeld	STDV	
Praktijkonderzoek	Conditie	nee	60	5.4	1.0	a
		ja	306	6.3	1.3	b
	Schotlengte (cm)	nee	60	6.9	3.6	a
		ja	306	8.8	5.0	b
	Bladsteellengte (cm)	nee	60	9.8	2.7	a
		ja	306	11.1	3.1	b

Voor het positieve verband tussen de conditie van de boom en de mate waarin wondcallusweefsel wordt gevormd bestaan in de literatuur voldoende verklaringen en dit is inmiddels een algemeen bekend gegeven. Een intrigerend aspect, dat in het kader van deze studie nog niet is onderzocht, is in hoeverre een snelle en omvangrijke vorming van wondovergroeiingsweefsel een indicatie is voor het afgrenselingsvermogen van de boom wanneer het gaat om het tegengaan van aantasting van het hout door secundaire houtrot veroorzakende schimmels.

Voor de groenbeheerder is dit een belangrijk aspect. Met name in 2007 zijn veel door de bloedingsziekte aangetaste bomen verwijderd omdat ze als gevolg van juist deze secundaire aantastingen te gevaarlijk werden om ze nog enige tijd te handhaven. Ten behoeve van de systematiek van veiligheidscontrole van de groenbeheerders én het opstellen van een meer toegesneden advies over het omgaan met eenmaal aangetaste bomen verdient het aanbeveling om meer inzicht te krijgen in de betekenis van de vorming van wondovergroeiingsweefsel voor de overlevingskansen van door bloedingsziekte aangetaste bomen. Dit geldt dan zowel voor de overlevingskansen met betrekking tot eventueel herstel van de ziekte als de periode waarin aangetaste bomen nog zonder noemenswaardige beheerproblemen kunnen blijven staan.

Conclusies en aanbevelingen

De in 2007 uitgevoerde "verfijning" van de in 2005 en 2006 uitgevoerde inventarisaties heeft slechts in beperkte mate meer inzicht gegeven in de eventuele invloed van groeiplaatsgebonden stressfactoren en in het verleden uitgevoerde beheermaatregelen.

Nog steeds is onvoldoende naar voren gekomen in hoeverre aspecten zoals droogtestress, zoutschade, standplaatsituatie, aantasting door de paardenkastanjiemermot (*Cameraria ohridella*) en in het verleden uitgevoerde beheersmaatregelen bijdragen, of hebben bijgedragen aan het ziektebeeld. Aantasting door de bladvlekkenziekte (*Guignardia aesculi*) lijkt vooralsnog geen verband te houden met aantasting door de bloedingsziekte en lijkt als stressverhogende factor van ondergeschikt belang.

Het is niet aannemelijk dat een op een vergelijkbare wijze uitgevoerde uitbreiding van de inventarisatie in de toekomst nog substantieel nieuwe inzichten verschaft in de eventuele invloed van de onderzochte groeiplaatsfactoren en het gevoerde boombeheer. Voor wat betreft de in het verleden uitgevoerde beheermaatregelen kan dit deels worden toegeschreven aan het feit dat de aard en omvang en het tijdstip waarop ze zijn uitgevoerd vaak niet eenvoudig zijn te achterhalen. Het lijkt dan ook niet zinvol om deze onderzoekswijze verder voort te zetten.

Er zijn sterke aanwijzingen naar voren gekomen dat de aard en ernst van aantasting door de bloedingziekte mede wordt bepaald door genetische verschillen tussen de individuen van één soort. Het verdient aanbeveling om de gevonden verschillen mee te nemen in het vervolgonderzoek naar de resistentiefysiologie. Op basis daarvan kan wellicht worden vastgesteld in hoeverre het de moeite loont om binnen de soort nog te zoeken naar voldoende resistent uitgangsmateriaal voor de teelt en toepassing van de (witte) paardenkastanje.

Er zijn diverse plausibele verklaringen denkbaar voor de gevonden trend dat bomen met een zware mate van aantasting of bomen met een goede conditie gemiddeld genomen waarneembaar reageren op de aantasting door de vorming van wondovergroeingsweefsel rond de aantastingplekken. Belangrijker is wellicht de vraag in hoeverre uit de vorming van wondovergroeingsweefsel kan worden afgeleid of een door bloedingziekte aangetaste boom wordt gekoloniseerd door houtparasitaire schimmels die bedreigend zijn voor de veiligheid van de boom, waardoor de boom voortijdig moet worden geveld. Dit belang betreft enerzijds de systematiek van boomveiligheidscontrole van de groenbeheerders en anderzijds de praktische haalbaarheid van de op te stellen adviezen voor het beheer van eenmaal aangetaste bomen. Aanbevolen wordt om de betekenis van de vorming van wondovergroeingsweefsel rond de aantastingplekken nader te onderzoeken.

3.3.2 Kastanjemineermot als stressfactor

Projectleider: Drs. Alexander van Beuningen (PD)

Projectmedewerkers: Maria José Villalón, MSc. (PD), Dr. Jaap Janse (PD)

Inleiding

Voor veel ziekten bestaat er een verband tussen de conditie van de boom en de vatbaarheid voor aantastingen, waarbij als regel geldt dat verzwakte bomen vatbaarder zijn dan gezonde bomen. Kastanjabomen blijken niet uitsluitend last te hebben van de bloedingziekte, maar ze lijden ook onder andere stressfactoren, zoals de schade die ontstaat door vraat van de kastanjemineermot (*Cameraria ohridella*). De larven van de kastanjemineermot tasten de bladeren zodanig aan dat de fotosynthese van grote delen van het blad onmogelijk wordt. Het is mogelijk dat deze en andere stressfactoren de kans vergroten dat pathogenen zoals *Pseudomonas syringae* de paardenkastanje kunnen infecteren. Het verband tussen de aanwezigheid van kastanjemineermotaantasting en optreden van de kastanjeziekte is in openbaar groen voornamelijk niet aangetoond, maar ook niet verworpen. In dit onderzoek is een experiment opgezet om te kijken of de infectie-incidentie en -mate omhoog gaan onder invloed van mineermotinfectie. Als dit verband bestaat kan het zinvol zijn de kastanjeziekte te bestrijden/onderdrukken via mineermotbestrijding.

Materiaal en methoden

Aangezien het niet mogelijk bleek om jonge zaailingen van witte paardenkastanje in de kas door de kastanjemineermot aangetast te krijgen, is besloten de proef uit te voeren met takken uit de praktijk zonder symptomen van bloedingziekte maar met aantasting van mineermot. Er werden takken met twee verschillende aantastinggradaties gebruikt: hoog (meer dan 80% bladaantasting door kastanjemineermot) en laag (ca. 10 % bladaantasting door kastanjemineermot). De takken werden in de Rondweg in Houten 21 september 2007 verzameld en dezelfde dag in de kas geïnoculeerd.

Ongeveer 1 meter lange takken (drie per aantastingsniveau) werden gesnoeid en in de kas in een emmer water geplaatst voor inoculatie met *P. syringae*. Voorafgaand aan de inoculatie was de kas geconditioneerd d.m.v. een watervernevelaar tot een luchtvochtigheid boven de 80%. Verder is er geen conditionering van temperatuur of verlichting uitgevoerd. Deze omstandigheden zijn zo gebleven tot de beëindiging van de proef.

Er werden tien takken geïnoculeerd met een steriel scalpel d.m.v. drie sneden van ongeveer 0,5 cm in dwarslengte. In deze sneden werd bacteriesuspensie (ca. 10^7 cfu.ml⁻¹) gedruppeld met behulp van een steriele injectiespuit. Ook is naaldinoculatie uitgevoerd op een andere deel van de tak. Bacteriesuspensies werden gemaakt van isolaat PD 4818 uit paardenkastanje (48 uur oude cultuur op Nutriënt agar, gekweekt bij 28°C) dat werd opgelost in steriele fosfaat buffer (PBS 0,01 M and pH 7,2). Deze buffer is ook gebruikt voor inoculatie van de negatieve controle. Vervolgens werd symptoomwikkeling nauwkeurig gevolgd. Tijdens het experiment werden de emmers met de takken regelmatig met water aangevuld, indien schimmelgroei werd geconstateerd zijn takdelen die zich onder de waterspiegel bevonden met water gereinigd.

De eindbeoordeling kon pas na minimaal 12 weken plaatsvinden. Dit is de gebruikelijke tijd voor terugisolatie. Om toch een indruk te krijgen van de resultaten binnen de projectperiode zijn na 8 weken twee takken beoordeeld. De overige takken zullen op een later tijdstip worden geanalyseerd.

Herisolaties werden uit de geïnfecteerde takken uitgevoerd op King's medium B en Levan agar. Typische kolonies werden reingekweekt en geïdentificeerd met vetzuuranalyse en BOX-PCR.

Resultaten en discussie

Acht weken na inoculatie werden monsters uit de takjes ingezet. Voor deze proef werd er slechts één tak van elke soort aantasting ingezet. Bij de beide niveaus van aantasting door *Cameraria ohridella* (licht en zwaar), werd de *Pseudomonas syringae* bacterie teruggeïsoleerd en positief gekarakteriseerd m.b.v. VZA en BOX-PCR. De periode na inoculatie (8 weken) was redelijk kort in vergelijking met de gebruikelijke tijd (12 weken), die normaal in acht wordt genomen voor terugisolatie. Om deze reden zullen de resterende takken nog onderzocht worden om de verkregen resultaten te bevestigen en beter onderscheid te kunnen maken tussen het zich handhaven van de bacterie in de tak en daadwerkelijke infectie.

Na het afschillen van de tak met hoge (meer dan 80%) bladaantasting van kastanjemineermot werd er nat glazige tot necrotisch bastweefsel aangetroffen. De aantasting door de *P. syringae* bacterie liep erg diep tot op het hout met een aanmerkelijk uitbreiding van ca. 5 cm onder het inoculatie-punt en 2-3 cm omhoog (Figuur 47).



Figuur 47: Met *P. syringae* bacterie geïnfecteerde tak met hoge aantasting

In de tak met lage aantasting van kastanjemineermot was de uitbreiding kleiner: ca. 1 cm boven en onder het inoculatie-punt. Het soort afstervende weefsel, dat zichtbaar werd na afschillen van de bast, was gedeeltelijk glazig maar in het algemeen veel droger dan in de tak met hoge mineermotaantasting (zie Figuur 48). In deze tak ging de aantasting door de bacterie wel erg diep, tot aan de kern van het hout (Figuur 49).

In het geval van hoge aantasting door kastanjemineermot was het aantal kolonies, dat werd aangetroffen op de isolatieschaal, meer dan honderd keer zo hoog als bij lage aantasting.



Figuur 48: Tak met lage aantasting van kastanjemineermot: gedeeltelijk glazig, afgestorven weefsel met een droog uiterlijk als gevolg van *P. syringae*.



Figuur 49: De verbruining als gevolg van *P. syringae* loopt door tot diep in het merg van de tak bij een tak met hoge aantasting door mineermot.

Conclusie en aanbevelingen

Uit het onderzoek lijkt dat er wel verschillen zijn in aantasting en herisolatie van *P. syringae* tussen takken met lichte en zware mineermotbesmetting. De korte periode tussen de inoculatie en terugisolatie en het zeer geringe aantal waarnemingen in acht genomen, kan helaas uit de tot nu toe verkregen resultaten nog geen enkele aanwijzing verkregen worden dat *Cameraria ohridella* een belangrijke stressfactor is bij de aantasting van paardenkastanje door de *Pseudomonas syringae* bacterie. Het is wenselijk deze proef opnieuw uit te voeren, dit keer echter met jonge zaailingen.

3.4 Beheersing

Projectleider: Prof. Dr. Linus H.W. van der Plas (WUR)

Projectmedewerkers: Dr. André van Lammeren (WUR), Ing. H. Kieft (WUR), Jacqueline Donkers (WUR), Diaan Jamar (WUR), Suzanne Breeuwsma (Praktijkonderzoek), Leo Slingerland (Praktijkonderzoek), Dr. ir. Ria Derkx (Praktijkonderzoek)

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 toegespitst 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* en *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 ontwikkeling van de componenten van het verbruiningsstelsel tussen behandelde en onbehandelde jonge bomen, die met *P. syringae* worden geïnoculeerd (toetsplanten). Dit biedt dan de mogelijkheid om een vergelijking te maken met de macro-ontwikkelingen van de ziekteverschijnselen tijdens het vervolg van de veldproef in 2007.

Hiermee kan dan meer gericht worden ingegrepen in de ziekteontwikkeling.

Doel

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

Het volgen van de effecten van wondbehandelingsmiddelen tegen de kastanjeziekte op toetsplanten in de kas (3.4.1) en in het veld (3.4.2).

3.4.1 Effecten van remstoffen onder kasomstandigheden

Inleiding

In 2005 is aangetoond dat een zichzelf versterkend proces van celafbraak en verbruining (polyphenoloxidase-cascade; zie inleiding 3.2.2) kan leiden tot bloedingsverschijnselen. Met name fenolen en het polyfenoloxylase-enzym bleken inderdaad in monsters uit de stam van kastanje te worden

aangetroffen. Daarna heeft het onderzoek zich gericht op het testen van mogelijkheden om in te grijpen in het proces:

- De initiatiereactie kan worden geblokkeerd door het enzym polyfenoloxydase te remmen en door de vorming van chinon tegen te gaan
- De vervolgcascade kan worden geremd door zuurstofradicalen en waterstofperoxide weg te vangen.

Een aantal stoffen blijkt in beide processen in te grijpen. Deze stoffen (bijv. ascorbinezuur) zijn voor de toepassing extra interessant. Na selectie en testen van een aantal remmers en combinaties hiervan in het laboratorium op stukjes kastanje afkomstig uit buitenkant van de stam is een beperkt aantal behandelingen uitgekozen om in een biotoets met zaailingen in de kas te testen en te beoordelen op morfologische effecten. Van de zaailingen zijn vervolgens monsters geanalyseerd op veranderingen in de PPO-cascade als gevolg van de behandelingen.

Materiaal en methoden

Als herhaling van de toetsplantenproef van 2006 zijn zaailingen geïnfecteerd met *P. syringae* isolaat PD5126 en wekelijks behandeld met een reeks van remstoffen om het effect ervan vast te stellen op de uitbreiding van de aantasting. Zaailingen zijn per inoculatieplaats voorzien van drie ondiepe sneden waarop de bacteriesuspensie is aangebracht of ze zijn geïnjecteerd. Deze inoculatie vond plaats op diverse tijden in juni – oktober 2007.

Overzicht van de gebruikte middelen en combinaties:

Planten geïnfecteerd met PD5126 en behandeld met water.

Planten geïnfecteerd met PD5126 en behandeld 25 mM ascorbinezuur (asz).

Planten geïnfecteerd met PD5126 en behandeld 25 mM citroenzuur (cz).

Planten geïnfecteerd met PD5126 en behandeld 5 mM cysteine (c).

Planten geïnfecteerd met PD5126 en behandeld met 25 mM asz, 25 mM cz, 5 mM c (combi).

Planten geïnfecteerd met PD5126 en behandeld 25 mM azijnzuur.

Planten geïnoculeerd met buffer en behandeld met water.

Aan de middelen is 0.5% uitloeier toegevoegd en ze zijn met een kwastje opgebracht.

Monstering:

Er werden monsters genomen verspreid over een periode van drie maanden te beginnen op 5 dagen na de inoculatie datum; deze monsters bestonden uit een stamstukje van 1 cm lengte rond de inoculatieplaats. Hiervan werd de helft, waarin de inoculatie plaatsgevonden had, gebruikt.

“Vivo”-lekkage-proef:

De methode gebruikt bij de *in-vivo*-lekkage-proeven is uitgebreid beschreven in 3.2.2.

Kwantitatieve veranderingen in onderdelen van het polyfenoloxydase-cascade-systeem.

Voor de gebruikte methodes wordt verwezen naar 3.2.2

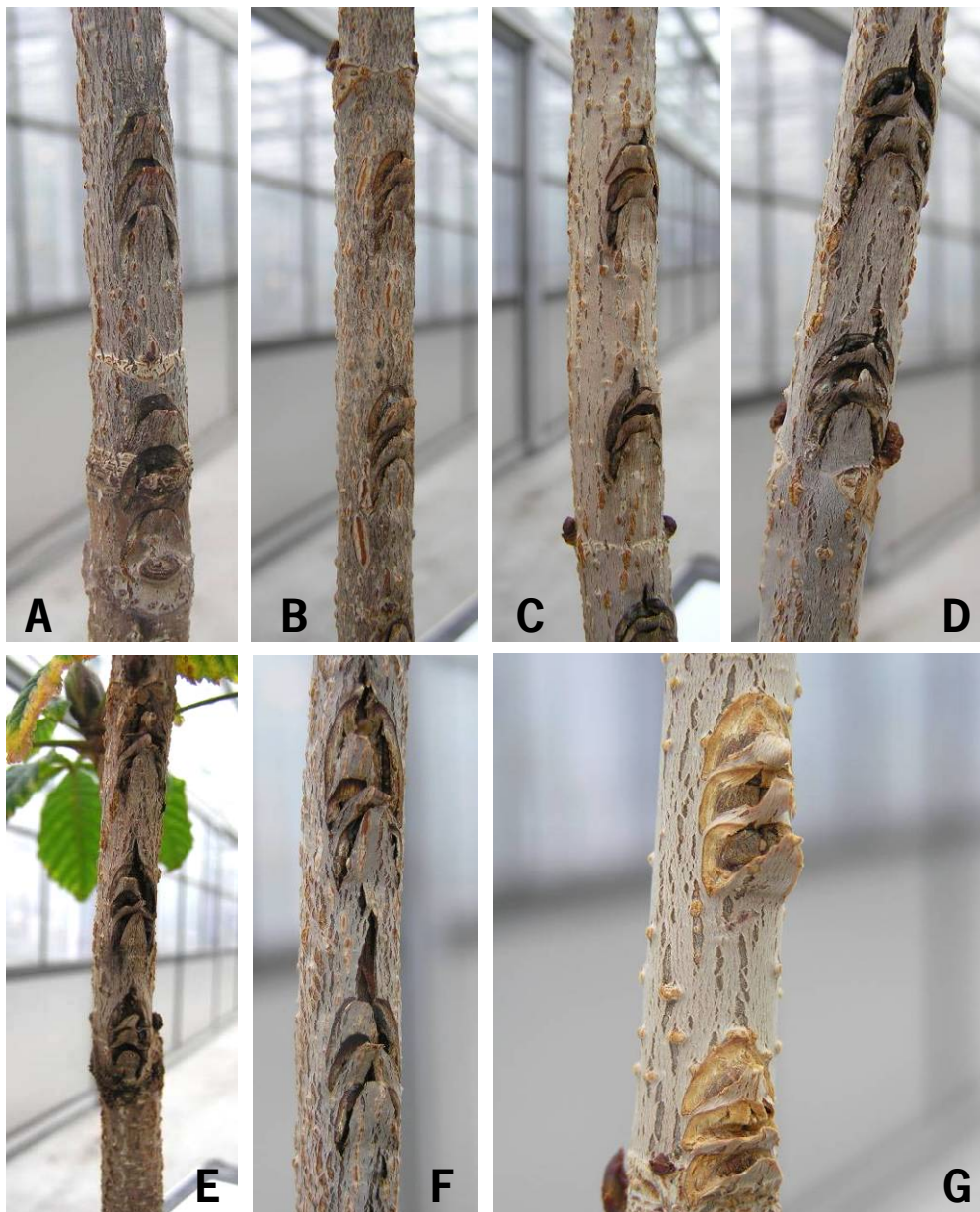
Morfologische en anatomische analyse

Zaailingen zijn op diverse tijdstippen in de zomer van 2007 geïnfecteerd op snedes in de stam en wekelijks behandeld met de verschillende middelen. Tegelijk met het monstereven voor de fysiologische bepalingen is de morfologische ontwikkeling bij de verschillende behandelingen gefotografeerd. Daarnaast zijn monsters genomen voor anatomische analyse. Stengeldelen van 2-3 cm lengte zijn met een snoeischaar gemonsterd en vervolgens gefixeerd in een mengsel van 3% paraformaldehyde, 0.05% glutaraaldehyde in 0,1M fosfaatbuffer, pH 7.0. Coupes zijn gemaakt met een sledemicrotoom, gespoeld in buffer en ingesloten in glycerine gelatine voor observatie met de lichtmicroscop.

Resultaten

Morfologische effecten:

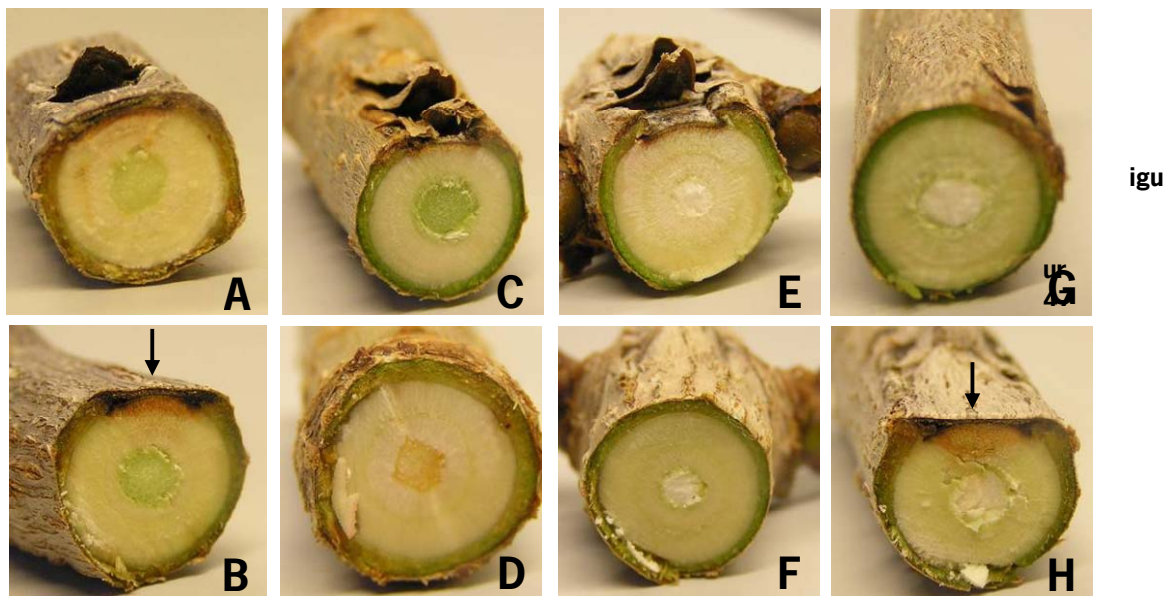
Het morfologische effect van de behandelingen op een termijn van 3 maanden is in figuur 50 weergegeven. Controleplanten, alleen geïnoculeerd met buffer en behandeld met water, vertoonden nooit weefselnecrose maar vormden duidelijk wondweefsel waardoor de sneden 'open gaan staan' (figuur 50G). Tussen de inoculatieplaatsen was de stam normaal ontwikkeld en vertoonde groeischeurtjes in de epidermis en periderm. In geval van inoculatie met PD5126 was dat nooit het geval. Normaal herstel op de plaats van inoculatie bleef achterwege en plaatselijk necrotiseerde het weefsel en werd zwart. Bovendien was er in een aantal gevallen uitbreiding van de necrose naar onder en boven toe in de stam wat zich uitte als 'inzakken' van het stamoppervlak en door scheuren in de bast. Indien stammetjes behandeld werden met de verschillende remstoffen was de reactie afhankelijk van de behandelingsmethode: indien behandeld met citroenzuur, cysteïne en azijnzuur was er sterke necrose tussen de inoculatiegebieden, vergelijkbaar met de controle waarbij de geïnoculeerde planten met water werden nabehandeld (respectievelijk figuur 50D, E, F en A). Maar bij planten die behandeld werden met de combinatie van ascorbinezuur, citroenzuur en cysteine of met ascorbinezuur alleen, bleef het weefsel boven en onder de wonden (meer) intact (figuur 50B, C). Het lijkt dat deze twee behandelingen een zekere bescherming geven tegen uitbreiding van de necrose. Figuur 51 geeft op doorsnede aan in hoeverre de necrose vanaf de wond zich uitbreidde bij de verschillende behandelingen. Figuur 51A, C, E en G zijn doorsneden ter hoogte van de inoculatieplaats. In alle gevallen, dus onafhankelijk van de behandelingsmethode, was hier weefsel genecrotiseerd. Figuur 51B, D, F en H tonen de dwarse doorsnede op 1 cm afstand onder de inoculatieplaats. Necrotisering was sterk bij de behandelingen met water en citroenzuur, hetgeen geleid heeft tot het inzakken van het oppervlak van de stam (Figuur 51B en H), terwijl behandeling met een combinatie van middelen en alleen met ascorbinezuur necrose voorkwam (Figuur 51D en F). Op doorsnede was geen 'inzakking' te zien en het bastweefsel was minder of niet aangetast. Aangezien behandeling met citroenzuur of cysteine alleen geen positief effect heeft, lijkt het erop dat de aanwezigheid van ascorbinezuur in het mengsel bepalend is voor de remmende werking.



Figuur 50: Overzicht van het effect van wekelijkse behandeling met verschillende remstoffen van stammetjes van paardenkastanjezaailingen, 3 maanden na infectie met *P. syringae*-isolaat PD5126. (Infectie op 23-7-2007, fotografie op 31-10-2007)

- A. Infectie met isolaat PD5126 en wekelijkse behandeling met water.
- B. Infectie met isolaat PD5126 en wekelijkse behandeling met combinatie van remstoffen.
- C. Infectie met isolaat PD5126 en wekelijkse behandeling met ascorbinezuur.
- D. Infectie met isolaat PD5126 en wekelijkse behandeling met citroenzuur.
- E. Infectie met isolaat PD5126 en wekelijkse behandeling met cysteïne.
- F. Infectie met isolaat PD5126 en wekelijkse behandeling met azijnzuur.
- G. Inoculatie met buffer en wekelijkse behandeling met water.

Merk op dat al de met bacteriën geïnfecteerde stammetjes necrose op de wond vertonen terwijl de controle (G) veel wondweefsel heeft gevormd. Binnen de behandlingsvarianties blijken citroenzuur (D) cysteïne (E) en azijnzuur (F) geen gunstig effect te sorteren (verkleuring, inzakken van stamoppervlak en scheuren in de bast), terwijl de combinatie van middelen (B) en behandeling met ascorbinezuur (C) een verbetering opzichte van de behandeling met water (A) te zien geven.



Figuur 51: Overzicht van infectieproces 3,5 maanden na inoculatie met *P. syringae*-isolaat op stammetjes van zaailingen van de paardenkastanje en wekelijkse behandeling met verschillende remstoffen. De bovenste rij foto's geeft de plaats van inoculatie via een drietal sneden. De onderste rij geeft de doorsnede 1 cm onder de inoculatieplaats.

A-B Geïnfecteerd met PD5126 en behandeld met water.

C-D Geïnfecteerd met PD5126 en behandeld met combinatie van remmingsmiddelen.

E-E Geïnfecteerd met PD5126 en behandeld met ascorbinezuur.

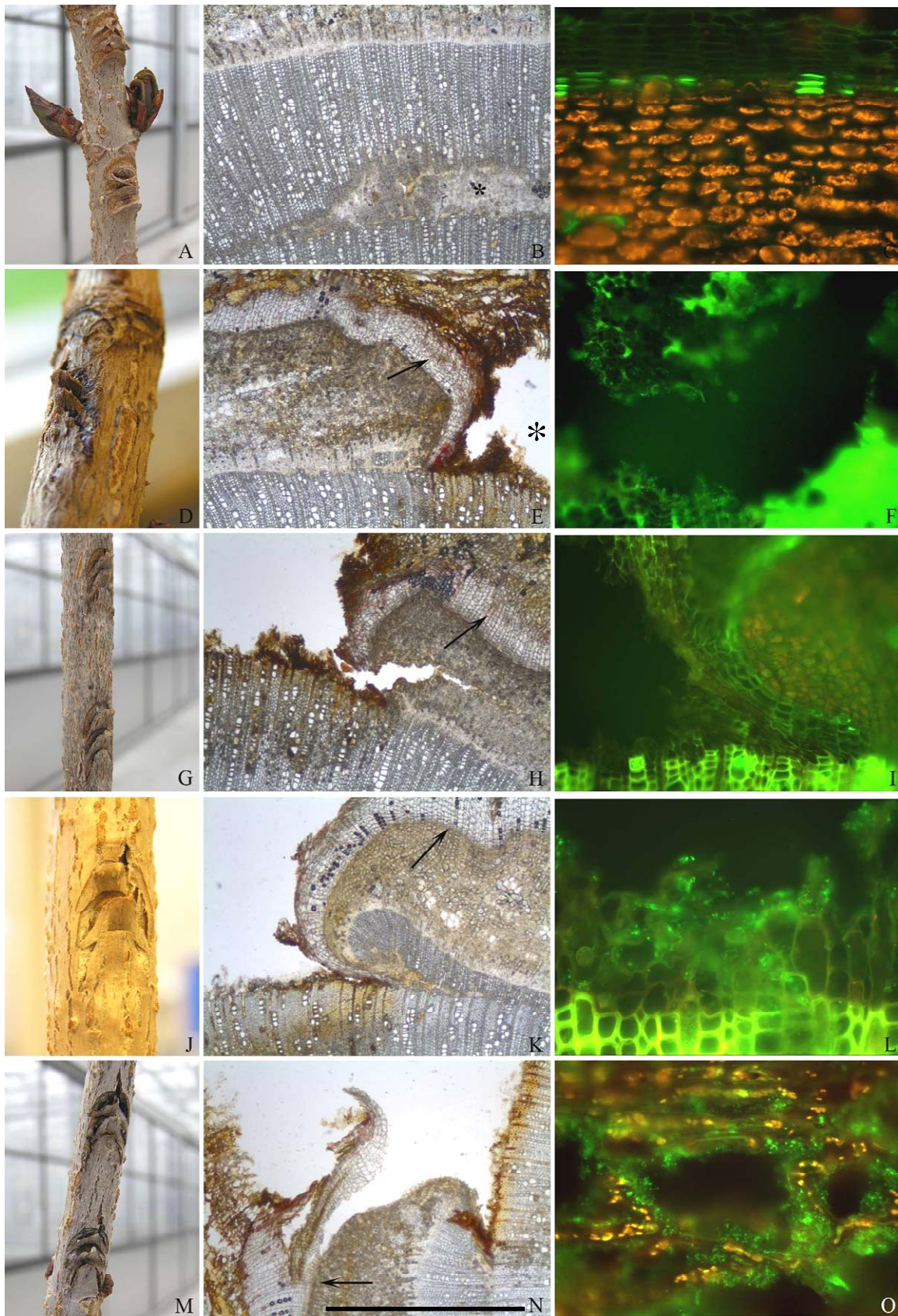
G-H Geïnfecteerd met PD5126 en behandeld met citroenzuur.

Merk op dat bij alle monsters ter plaatse van de wond necrose optreedt (A, C, E en G), maar dat 1 cm onder de wond bij behandeling met combinatie van remmingsmiddelen (D) en met ascorbinezuur (F) weinig tot geen necrose optreedt maar wel bij de behandeling met water en citroenzuur (B, pijl en H, pijl).

Inoculatieplaatsen van de verschillend behandelde zaailingen zijn anatomisch onderzocht. Figuur 52 toont een overzicht van de resultaten waarin de morfologische ontwikkeling van de stam, de anatomische dwarse doorsnede en de detectie van *P. syringae* zijn samengebracht. Het blijkt dat planten geïnoculeerd met water (controle plant) geen necrose maar direct herstel vertonen (figuur 52A-C). Zij vormen nieuw xyleem en floëem ter plaatse van de wond (figuur 52A en B). In figuur 52B is in het xyleem het restant van weefselverstering zichtbaar. Direct daaroverheen is nieuw secundair xyleem gevormd. Figuur 52C is een detail van de schors met intact weefsel zonder bacteriën.

Inoculatie met PD5126 en wekelijkse behandeling met water leidt tot necrose ter plaatse van de wond (figuur 52D-F). Terzijde van de wond is in het floëem en in de schors een nieuw periderm gevormd dat de wond afschermt van het overig weefsel (figuur 52E, pijl). Merk op dat ter plaatse van de wond geen nieuw xyleem is gevormd op het bestaande xyleem (*). Merk tevens op dat na verwonding in het weefsel terzijde van de wond ook geen xyleem meer is gevormd. Dat betekent dat activiteit van het vaatweefselvormende cambium is gestopt. Bacteriën zijn op het wondvlak en buiten het nieuwgevormde periderm gevonden (figuur 52F).

Bij gebruik van remmingsmiddelen is peridermvorming in alle opzichten vergelijkbaar met de behandeling met water (Zie figuur 52H, K en N). Altijd vormt de geïnfecteerde plant een barrière waardoor een deel van het floëem en schors buitengesloten wordt ('ex planta'). Vaak blijkt het vasculair cambium weer actief te worden terzijde van de verwonding, zij het in veel mindere mate dan bij niet geïnfecteerde planten (de controle van figuur 52A-C). Nieuw secundair xyleem en nieuw secundair floëem worden gevormd en zorgen voor de overgroeiing van de wond (figuur 52H, K en N). Bacteriën worden in geval van geïnfecteerde planten in alle wonden aangetroffen onafhankelijk van het type behandeling met remstoffen. Bij het gebruik van de combinatie van middelen (asz+cz+c) en alleen ascorbinezuur zijn het er echter weinig (figuur 52I en L), bij gebruik van water en citroenzuur zijn het er veel (figuur 52F en O).



Figuur 52

Figuur 52: Overzicht van morfologische (kolom 1) en anatomische (kolom 2) veranderingen in de stam van paardenkastanjezaailingen als gevolg van inoculatie met buffer (A-C) of met *P. syringae* PD5126 (overige afbeeldingen) en wekelijkse behandeling met water (D-F), met een combinatie van ascorbinezuur, citroenzuur en cysteine (G-I), met ascorbinezuur (J-L) en met citroenzuur (M-O). Kolom 3 toont immunocytochemie op *P. syringae*. In het geval van de controle is er direct herstel van het cambium en verdere ontwikkeling van xyleem op de plaats van de wond (B*). In alle andere gevallen ontstaat een zich niet herstellende wond, nieuw periderm (pijlen) dat bacteriën ex planta houdt, en zijdelings van de wond nieuw secundair xyleemweefsel. In geval van behandeling met een combinatie van remstoffen (I) en ascorbinezuur (L) worden relatief weinig bacteriën aangetroffen, terwijl monsters behandeld met citroenzuur (O) veel bacteriën bevatten. De controle is geheel vrij van *P. syringae* (C). Maatstreep is 100 µm voor B,E,H,K,N.

Effect van remmingsmiddelen op de polyphenoloxidase -cascade in zaailingen

Het positieve effect van de behandelingen met ascorbinezuur en combinaties met ascorbinezuur past in de hypothese dat het *tijdig ingrijpen in de PPO-cascade* het ziekteproces vertraagt, waardoor de plant de gelegenheid krijgt om zich te herstellen cq. de bacteriën buiten te sluiten bijvoorbeeld door de vorming van effectief periderm.

Gekeken is of dit tot uiting komt in de *PPO-activiteit* en de *fenolhoeveelheid* in de 'stam' (die bij deze toetsplanten nog dun is en mogelijk niet representatief voor de reactie van volwassen bomen): in principe zijn er theoretisch twee mogelijkheden:

- een behandeling met ascorbinezuur onderbreekt de activiteit van de cascade *zonder* invloed te hebben op de aanwezigheid van de *onderdelen van de cascade* (bijvoorbeeld de hoeveelheid PPO en fenolsubstraat); dan zal, zodra het ascorbinezuur is 'uitgewerkt'/verdwenen, de cascade weer zijn effect kunnen hernemen en kan de aantasting doorgaan.
- een behandeling met ascorbinezuur heeft ook effect op de *aanwezigheid* van de cascadeonderdelen, bijvoorbeeld doordat (na herhaaldelijke behandeling?) de hoeveelheid fenol en/of de hoeveelheid/activiteit van het PPO op een lager niveau komt. Dan zou het effect van de behandeling langer kunnen duren en meer duurzaam zijn.

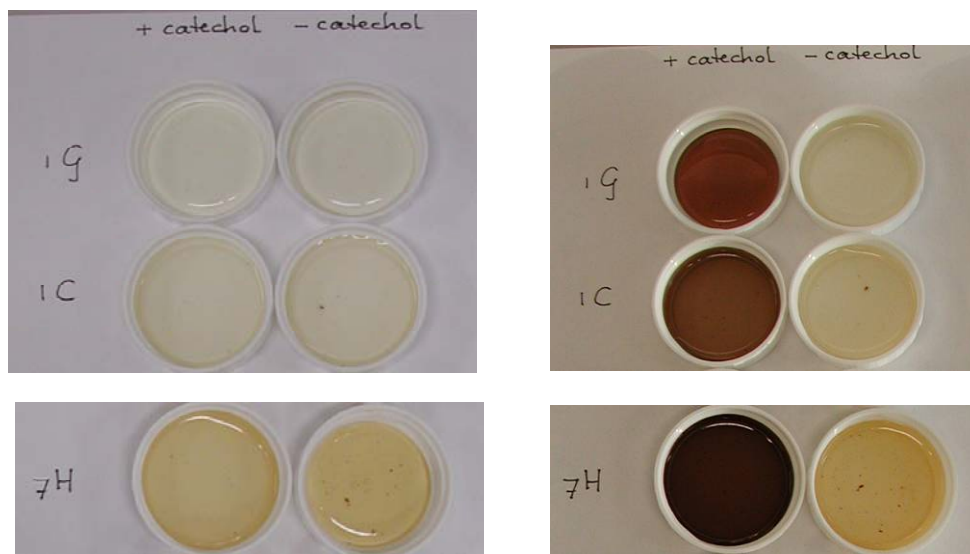
Uit het onderzoek kan voorzichtig worden geconcludeerd dat er in de toetsplanten na de wekelijkse ascorbinezuurbehandeling inderdaad minder PPO-activiteit aanwezig is.

De activiteit in alle geïnfecteerde toetsplanten die een behandeling hadden gehad met ascorbinezuur (25 mM) was 0,0048 units (n = 5), terwijl geïnfecteerde toetsplanten met behandelingen zonder ascorbinezuur een gemiddelde activiteit van 0,010 units (n = 6) lieten zien, dat wil zeggen ongeveer tweemaal zo hoog. Dit is gebaseerd op gemiddelden van alle ascorbinezuur respectievelijk niet-ascorbinezuur bevattende behandelingen onafhankelijk van de 'bijmengsels'. Voor betere uitspraken moeten meer planten worden gemonsterd, wat nog niet mogelijk was.

Twee planten, die niet geïnfecteerd werden lieten een activiteit van 0,0075 units zien. De proefduur was echter relatief kort (3 à 4 maanden). Na langere tijd kunnen er duidelijkere verschillen verwacht worden.

Grotendeels komen dezelfde verschillen terug in de 'visualisatie'/schaaltjesproef (zie onderstaande figuur 53). Bij een eerder uitgevoerde test (twee maanden na inoculatie) waren noch de verschillen in anatomische reactie noch in PPO-hoeveelheden duidelijk te zien.

Hoewel er duidelijk fenol kon worden aangetoond (wat ook bleek uit het feit dat de PPO-visualisatieproef, ook zonder toegevoegd catechol een (beperkte) kleuring geeft op basis van het eigen aanwezige fenolsubstraat, zie figuur 53) waren er niet steeds duidelijke verschillen te zien na de periodieke ascorbine-behandeling. Dit kan een gevolg zijn van het feit dat fenolen ook andere functies hebben in de naburige cellen, waardoor verschillen op de infectieplaats niet eenvoudig kunnen worden waargenomen: totale afwezigheid cq. vermindering van fenolsubstraat zou kunnen wijzen op een verminderde potentie van de cascade, maar de omgekeerde conclusie kan niet worden getrokken uit de aanwezigheid van fenolen: de nu aanwezige fenolen zitten mogelijk in andere cellen van de (dunne) stammonsters.



Figuur 53: Visualisatie/schaaltjesproef van ascorbinezuurbehandelde (1G, 1C) en controle (7H) kastanje-toetsplanten, geïnfecteerd met *Pseudomonas* PD5126 op 23 juli 2007. Proef uitgevoerd op 13 november.

PPO-reactie, met en zonder fenolsubstraat (catechol) op t = 0 (linkerfoto's) en t = 18 h (rechterfoto's). Gebruikt is levloeistof van monsters na vriesbehandeling (alle cellen kapot).

PPO-reactie met eigen substraat is beperkt na acrobaatbehandeling (rechterschaaltjes op elke foto, - catechol); met toegevoegd substraat (+ catechol), vertonen beide een verbruiningsreactie, die bij de monsters van de ascorbaatbehandelde toetsplanten langzamer verloopt.

In dit voorbeeld is de hoeveelheid eigen fenolsubstraat (zoals weergegeven door de bruine kleur van de schaaltes zonder toegevoegd fenolsubstraat, - catechol) kleiner in de ascorbinezuur behandelde toetsplanten.

Conclusies

Inoculatie met *P. syringae* PD5126 remt groei van secundair xyleem en secundair floem aanzienlijk en induceert peridermvorming.

Behandeling met ascorbinezuur en een combinatie van ascorbinezuur, citroenzuur en cysteine lijken uitbreiding van necrose te remmen. Aangezien behandeling met citroenzuur of cysteine alleen geen positief effect heeft, lijkt het erop dat de aanwezigheid van ascorbinezuur in het mengsel bepalend is voor de helende werking.

De behandelingen met ascorbinezuur resulteerden in een mogelijke verlaging van de PPO-activiteit.

Ondanks behandeling met remmingsmiddelen blijven bacteriën aanwezig op het wondoppervlak en buiten de nieuw geïnduceerde peridermlagen.

3.4.2 Effecten van remstoffen in de praktijk

Inleiding

In 2005 is een proef gestart langs de rondweg van de gemeente Houten waarin effecten onderzocht worden van middelen die wellicht de symptomen van de bloedingsziekte kunnen vertragen of zelfs tot stilstand brengen. Deze middelen kunnen ingrijpen in fysiologische en biochemische processen die het gevolg zijn van aantasting door een ziekteverwekkende bacterie en leiden tot celafbraak en verbruining. De geteste remstoffen zijn ascorbinezuur, cysteine, citroenzuur en NaF. In 2005 was namelijk in het laboratorium gebleken dat deze middelen in staat waren de bruiningsreactie van zieke stukjes bastmateriaal sterk te vertragen of zelfs te stoppen. Als deze middelen ook op volwassen bomen in het veld werken, is het wellicht mogelijk dat ziekteverschijnselen in het veld zich niet verder uitbreiden, hoewel de ziekteverwekker niet aangepakt wordt. Omdat de remstoffen op verschillende wijzen aangrijpen in de processen die leiden tot celafbraak en bruinverkleuring, zijn naast afzonderlijke middelen ook combinaties

van middelen toegepast. Mogelijk kunnen middelen elkaars werking versterken, waardoor effecten op de langere termijn verkregen kunnen worden. De behandelingen die in juli 2005 gestart zijn, zijn in 2006 en 2007 voortgezet. Gedurende twee en een half jaar zijn de bomen, *Aesculus hippocastanum* 'Baumannii' nauwlettend gevolgd. Deze proef sluit aan bij de voorgaande proef met zaailingen in de kas

Materiaal en methoden

Opzet veldproef gemeente Houten

In 2005 zijn de geselecteerde middelen ascorbinezuur, cysteine, citroenzuur en NaF op twee verschillende manieren toegepast op bomen langs de rondweg van de gemeente Houten, namelijk gemengd met een lanoline-pasta of als spuitvloeistof, waarbij verschillende uitvloeiers aan de spuitvloeistoffen werden toegevoegd om de opname van de middelen te verbeteren. Middelen in lanolinepasta werden op zieke plekken op de stam gesmeerd. Spuitvloeistoffen werden vanaf de grond tot aan het begin van de kroon gespoten. Controle bomen werden behandeld met lanolinepasta zonder toevoegingen of met water met daaraan toegevoegd verschillende uitvloeiers zonder middelen. Elke behandeling werd in vijfvoud uitgevoerd. In totaal werden 140 zieke bomen met een stamdiameter van ongeveer 30 cm behandeld. In 2005 werden de bomen vier keer behandeld tussen 1 juli en eind augustus. In december 2005 zijn de bomen nog een keer behandeld.

In 2006 zijn de spuitbehandelingen voortgezet. Tussen eind maart en eind september 2006 zijn de bomen maandelijks behandeld (in totaal zeven keer). In 2007 zijn zowel pastabehandelingen als behandelingen met spuitvloeistoffen uitgevoerd. Tussen eind juli en eind oktober zijn de bomen vier keer behandeld.

Waarnemingen 2005, 2006 en 2007

Tabel 15: Waarnemingen aan de kastanjes, *Aesculus hippocastanum* 'Baumannii' van de veldproef in Houten.

Waarneming	september 2005	juli 2006	oktober 2006	juli 2007	oktober 2007
Mate van aantasting	X		X	X	X
Bastscheuren	X	X		X	X
Callusvorming			X	X	X
Actieve bloeding			X		X
Kroon		X		X	
Conditie				X	
% blad					X

Tabel 15 geeft een overzicht van alle waarnemingen die sinds de start van de proef in 2005 gedaan zijn. De mate van aantasting is gescoord in een schaal van 0 t/m 3 (0 = niet aangetast, 1 = licht, 2 = matig, 3 = zwaar).

Bastscheuren als gevolg van aantasting zijn gescoord als wel of niet aanwezig (0 = niet, 1 = wel).

Onderscheid is gemaakt tussen scheuren in de bast als gevolg van groei en scheuren als gevolg van aantasting. Alleen de laatste zijn gescoord.

De mate van callusvorming is gescoord in een schaal van 0 t/m 3 (0 = goed, 1 = matig, 2 = licht, 3 = geen).

Actieve bloeding aan de buitenzijde van de stam is gescoord als wel of niet aanwezig (0 = niet, 1 = wel).

Bij beoordeling van de kronen is onderscheid gemaakt naar de kleur van de kroon (0 = donkergroen, 1 = middelgroen, 2 = lichtgroen, 3 = geelgroen).

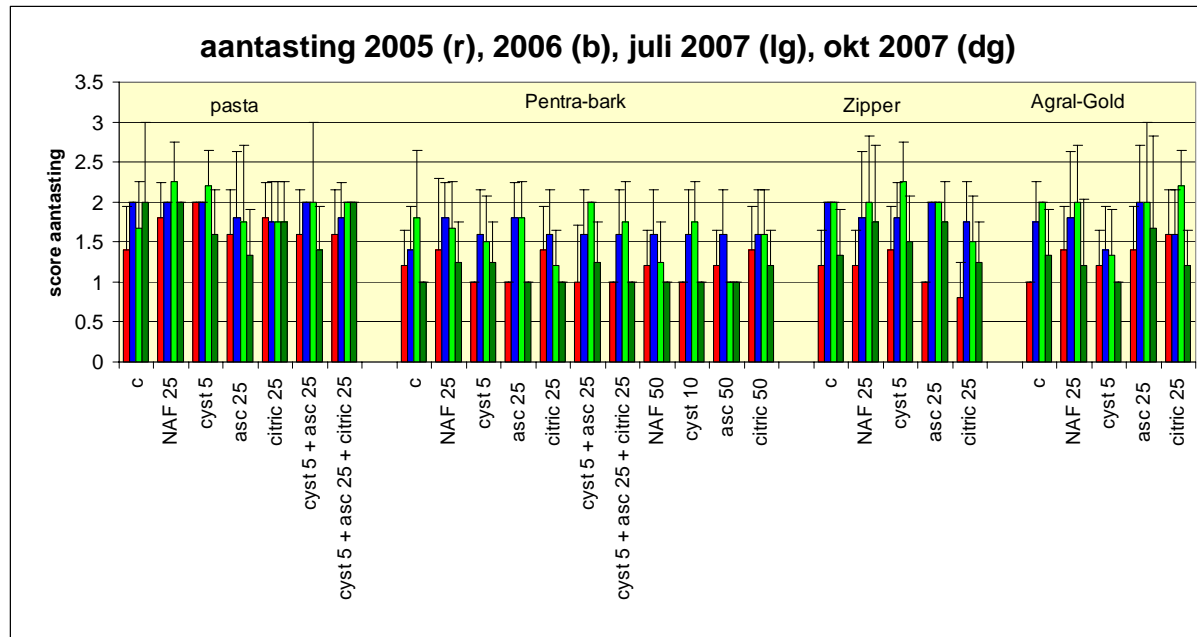
De conditie van de bomen is gescoord in een schaal van 0 t/m 5 (0 = goed, 1 = redelijk, 2 = matig, 3 = slecht, 4 = zeer slecht, 5 = dood).

In oktober 2007 is voor alle bomen een schatting gemaakt van het percentage waarmee een boom nog in het blad zat.

In 2007 zijn binnen de veldproef in Houten bomen gerooid. Het ging hierbij om het rooien van vier bomen wegens het plaatsen van een mast en het rooien van 22 bomen wegens een slechte conditie. In 2006 waren al eerder twee bomen gerooid omdat deze een gevaarlijke situatie gaven. Alle resultaten zijn geanalyseerd met variatieanalyse.

Resultaten en discussie

Mate van aantasting



Figuur 54: Effecten van verschillende behandelingen met de remstoffen NaF, cysteïne, ascorbinezuur en citroenzuur op de mate van aantasting in 2005 (rood), 2006 (blauw), juli 2007 (lichtgroen) en oktober 2007 (donkergroen).

Beoordeling aantasting: 0 = geen aantasting, 1 = licht, 2 = matig, 3 = zwaar

Gemiddelde van 5 bomen geeft weergegeven score. De verticale lijnen geven de standaardafwijkingen van de verschillende behandelingen weer.

De remstoffen (getallen geven de concentratie in mM weer) werden toegediend in een lanolinepasta (alleen in 2005 en 2007) of als spuitvloeistof met verschillende uitvloeiers (Pentra-Bark, Zipper, Agral-Gold) (in 2005, 2006 en 2007).

C geeft telkens een controlebehandeling zonder remstoffen weer, dus alleen pasta of water met de verschillende uitvloeiers.

Op elk van de vier waarnemingsmomenten tussen 2005 en 2007 was de mate van aantasting van de bomen die met remstoffen behandeld waren, niet significant lager dan die van controle bomen (figuur 54). Over het algemeen was de mate van aantasting groter in 2006 dan in 2005. Dit gold zowel voor bomen die niet met remstoffen waren behandeld als voor bomen die wel waren behandeld. Van 2006 tot 2007 nam de mate van aantasting bij ongeveer 40% van de behandelingen toe, in de overige gevallen bleef deze gelijk of nam zelfs af. In 2007 waren tekenen van herstel bij vele behandelingen te zien. In oktober waren veel bomen minder zwaar aangetast dan in juli. Bij de bomen die met remstoffen behandeld waren, was het herstel in 2007 over het algemeen niet groter dan bij de controle bomen. Dit gold zowel voor de pastabehandelingen als voor de spuitbehandelingen met de verschillende uitvloeiers.

Wanneer de mate van aantasting eind 2007 en eind 2005 vergeleken wordt, is te zien dat de mate van aantasting van de onbehandelde bomen sterker toegenomen was dan die van bomen die met de

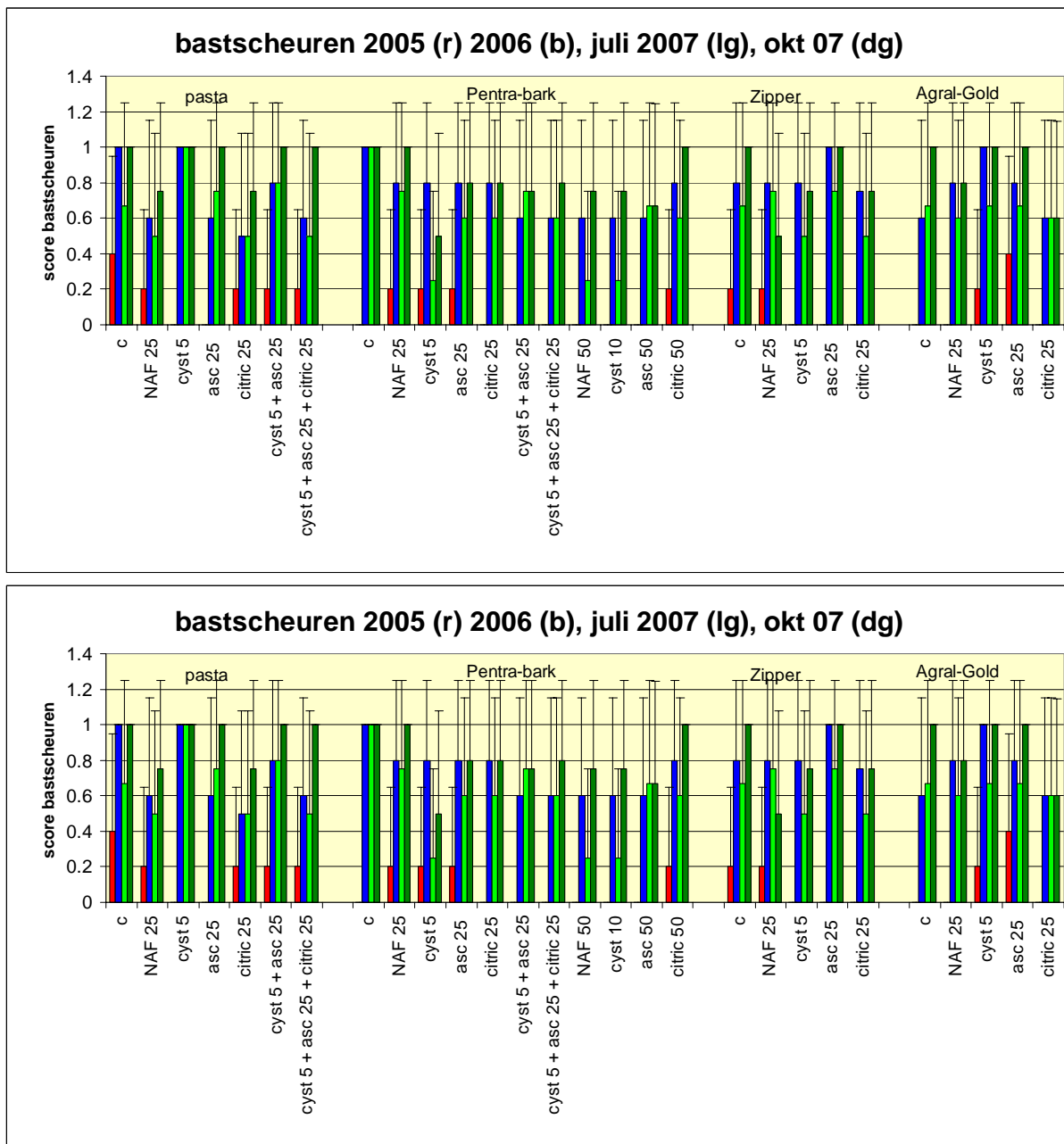
verschillende middelen in pasta behandeld waren (tabel 16). Bij de spuitbehandelingen met Agral-Gold was een zelfde beeld te zien. De verschillen tussen onbehandelde bomen en bomen die met remstoffen behandeld waren, waren in een aantal gevallen significant, waarbij de best scorende middelen in combinatie met pasta (cysteïne al dan niet in combinatie met ascorbinezuur) afweken van die in combinatie met Agral-Gold (NAF, citroenzuur). Verschillen tussen middelen waren echter relatief klein. In combinatie met de uitvloeiers Pentra bark en Zipper waren er geen significante verschillen tussen onbehandelde bomen en bomen die met middelen behandeld waren (tabel 16).

Tabel 16: Verschil in de mate van aantasting tussen september 2005 en oktober 2007. Hoe hoger de score hoe hoger de mate van aantasting + = verslechtering tussen 2005 en 2007; - = verbetering tussen 2005 en 2007. Zie verder bijschrift figuur 54.

Middel	Pasta	Pentra bark	Zipper	Agral Gold
Geen	+ 1.0 b	- 0.2 a	+ 0.5 a	+ 1.0 b
Cyst	- 0.4 a	+ 0.4 a	+ 0.4 a	+ 0.6 ab
Asc	+ 0.4 ab	0.0 a	+ 1.0 a	+ 0.5 ab
NAF	+ 0.5 ab	+ 0.2 a	+ 0.8 a	- 0.2 a
Citric	+ 0.2 ab	- 0.2 a	+ 0.8 a	- 0.4 a
Cyst + asc	- 0.2 a	+ 0.6 a		

Bastscheuren

De mate van het voorkomen van bast scheuren nam enorm toe van 2005 tot 2006 (figuur 55). Bij vergelijking tussen 2006 en 2007 lijkt aanvankelijk de mate van het voorkomen van bast scheuren bij de meeste behandelingen af te nemen. Enerzijds kan dit komen doordat bast scheuren weer dichtgroeien door callusvorming. Anderzijds zijn de slechtste bomen gerooid, waardoor gemiddelde waarden van de resterende bomen kunnen toenemen. Tussen juli 2007 en oktober 2007 nam de mate van het voorkomen van bast scheuren bij vele behandelingen weer toe. Behandelingen met remstoffen scoorden daarbij over het algemeen niet significant beter dan de controle behandelingen. Dit gold in combinatie met pasta alsook met alle uitvloeiers.

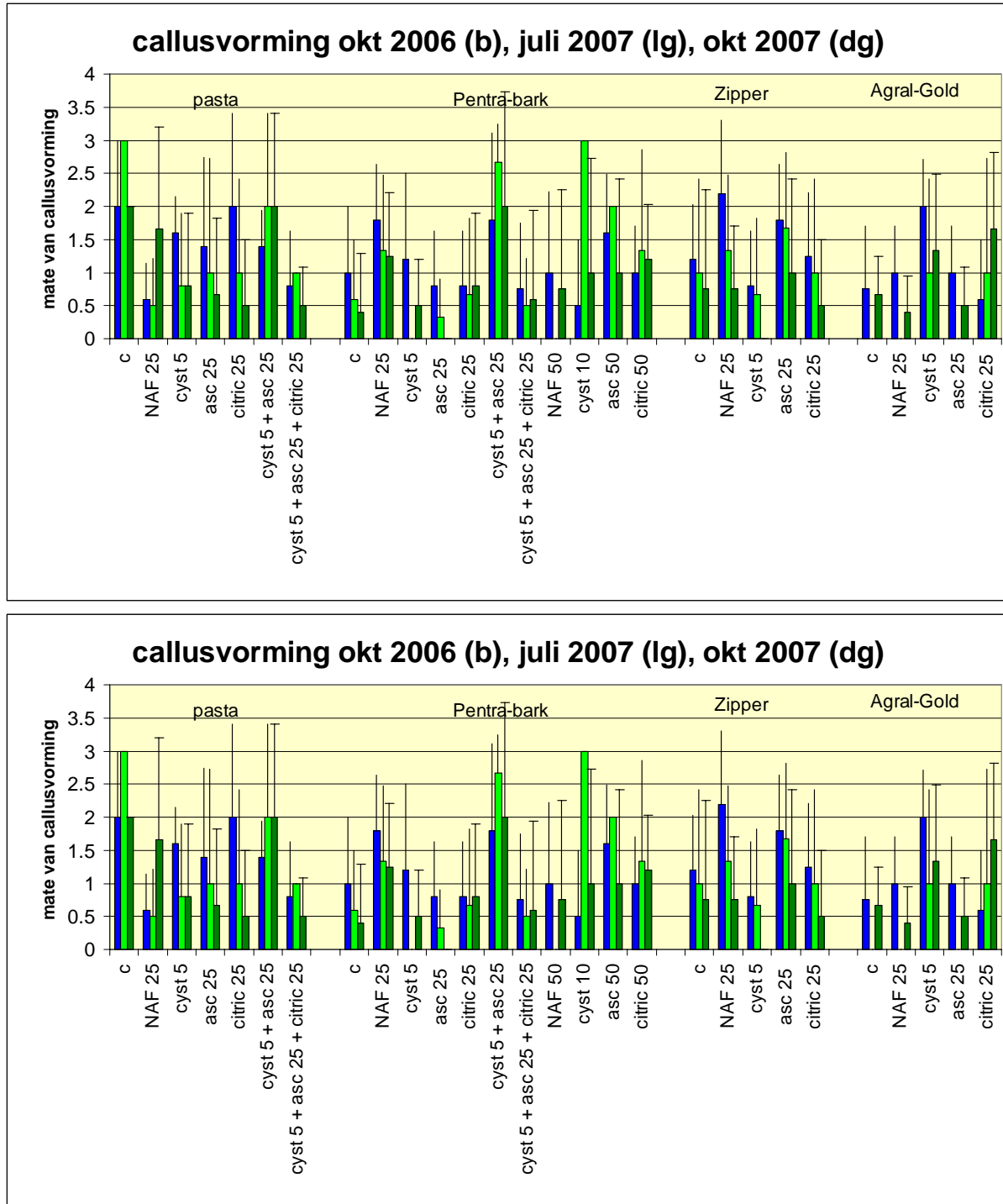


Figuur 55: Effecten van verschillende behandelingen met de remstoffen NaF, cysteine, ascorbinezuur en citroenzuur op de mate van bastscheuren in 2005 (rood), 2006 (blauw), juli 2007 (lichtgroen) en oktober 2007 (donkergroen).
 Beoordeling bastscheuren: 0 = geen, 1 = wel.
 Gemiddelde van 5 bomen geeft weergegeven score. De verticale lijnen geven de standaardafwijkingen van de verschillende behandelingen weer. Zie verder bijschrift figuur 54.

Callusvorming

Net als in 2006 was duidelijk te zien dat aangetaste bomen tekenen van herstel lieten zien in 2007. In een deel van de bastscheuren, die als gevolg van de bloedingsziekte waren ontstaan, was callusvorming te zien. Soms was een scheur al weer voor het overgrote deel dichtgegroeid. Bij de pastabehandelingen was de callusvorming van bomen die met remstoffen behandeld waren, in een aantal gevallen significant beter dan die van onbehandelde bomen (figuur 56). Bij de bomen die met spuitvloeistoffen behandeld waren, scoorden

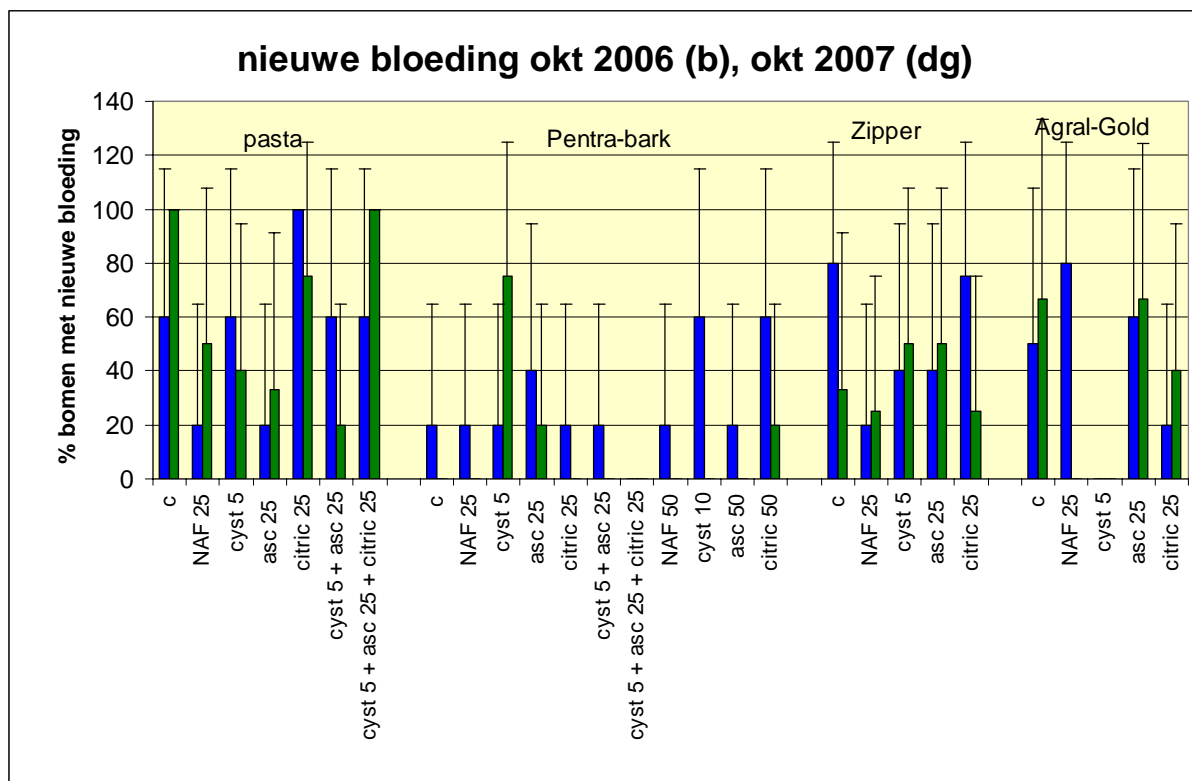
de controle behandelingen al goed. Mogelijke effecten van de remstoffen waren daardoor niet te zien.



Figuur 56: Effecten van verschillende behandelingen met de remstoffen NaF, cysteine, ascorbinezuur en citroenzuur op de mate van callusvorming in 2006 (blauw), juli 2007 (lichtgroen) en oktober 2007 (donkergroen). Beoordeling callusvorming: 0 = goed, 1 = matig, 2 = licht, 3 = geen
Gemiddelde van 5 bomen geeft weergegeven score. De verticale lijnen geven de standaardafwijkingen van de verschillende behandelingen weer. Zie verder bijschrift figuur 54.

Nieuwe (actieve) bloeding

Terwijl in 2005 al vroeg in het jaar actieve bloeding te zien was, was in juli 2006 en in juli 2007 geen actieve bloeding aan de buitenkant van de stam zichtbaar (niet getoond). In het najaar van 2006 en 2007 was dat wel het geval (figuur 57). In 2006 liet bijna 40% van de bomen actieve bloeding zien in het najaar, in 2007 was dat bij 33% van de toen resterende 112 bomen in de proef. De meeste actieve bloeding kwam voor bij de pastabehandelingen. Van de controle bomen (pasta zonder remstoffen) lieten in 2007 alle bomen actieve bloeding zien. Bomen die met cysteïne, ascorbinezuur of een combinatie van cysteine en ascorbinezuur behandeld waren, lieten significant minder nieuwe bloeding zien. Bij spuitbehandelingen in combinatie met Pentra bark, waren nauwelijks nieuwe bloedingsverschijnselen te zien, maar dit gold ook voor de controle, waaraan geen remstoffen waren toegevoegd. Over effecten van middelen in spuitvloeistoffen met Zipper en Agral Gold was weinig te zeggen. Duidelijke effecten waren niet te zien. Opvallend was wel dat bomen die bespoten waren met cysteine in combinatie met Agral Gold zowel in 2006 als in 2007 geen actieve bloeding lieten zien.



Figuur 57: Effecten van verschillende behandelingen met de remstoffen NaF, cysteïne, ascorbinezuur en citroenzuur op het percentage bomen (op een totaal van 5) met nieuwe bloedingsverschijnselen in oktober 2006 (blauw) en oktober 2007 (donkergroen). De verticale lijnen geven de standaardafwijkingen van de verschillende behandelingen weer. Zie verder bijschrift figuur 54.

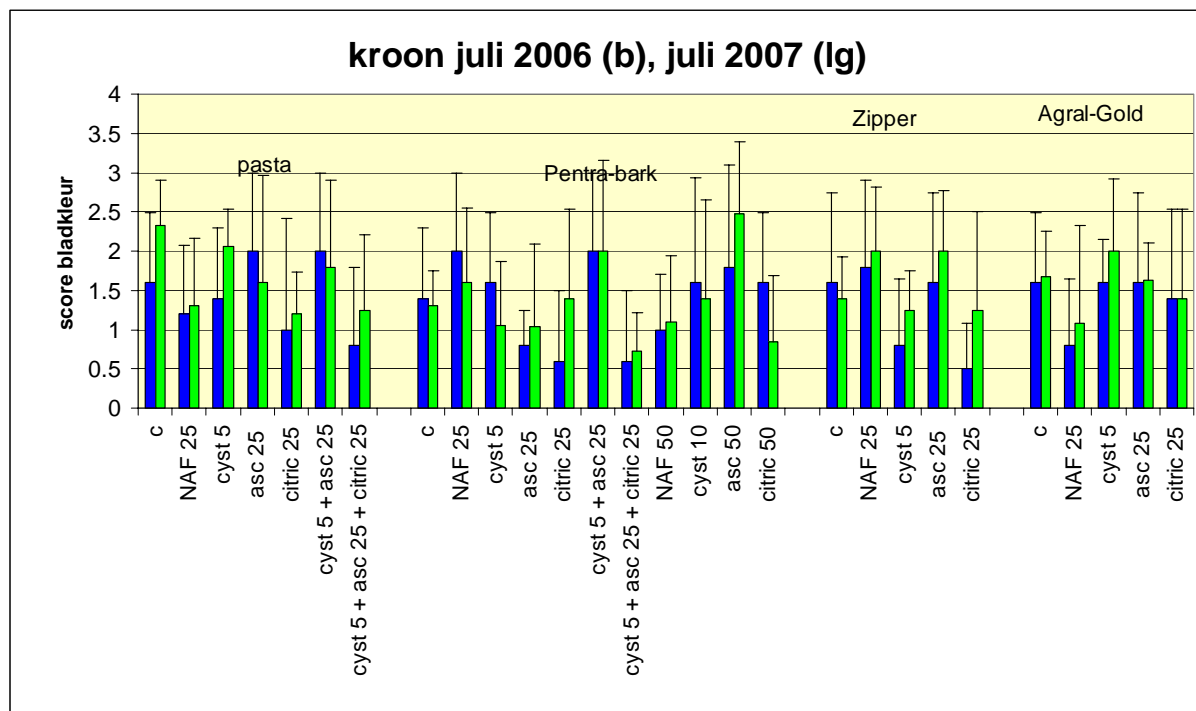
Kroon (bladkleur)

Waarnemingen van de bladkleur gaven een grillig beeld (figuur 58). De bomen die met remstoffen behandeld waren, gaven geen significant betere kroon te zien dan de onbehandelde bomen.

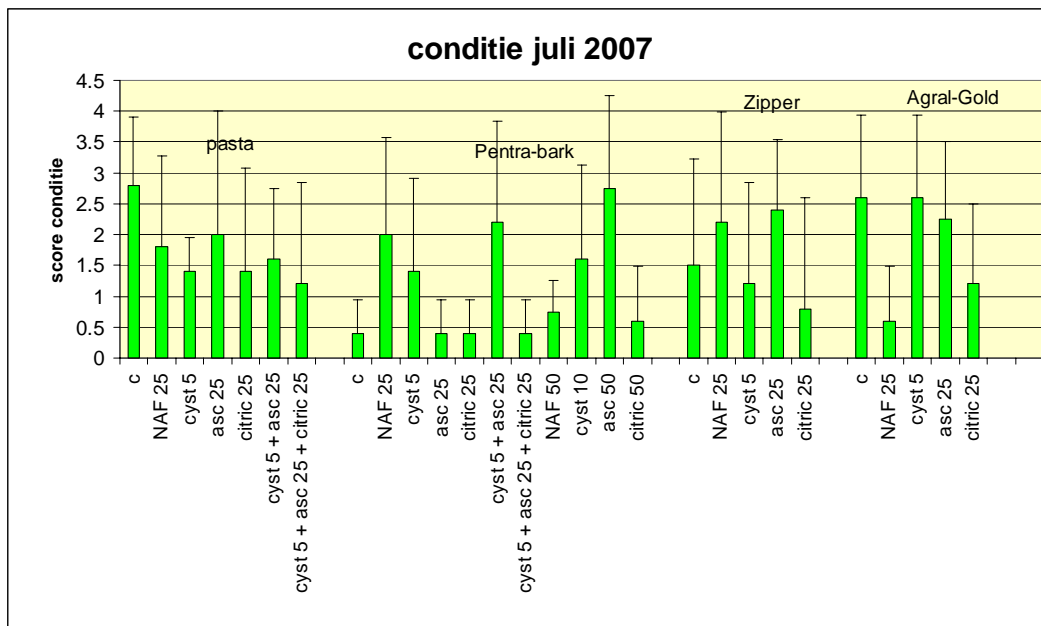
Conditie

De conditie van de bomen is alleen gescoord in juli 2007. Bij de pastabehandelingen hadden alle geteste remstoffen een positief effect op de conditie van de bomen (figuur 59). Door de enorme variatie waren de

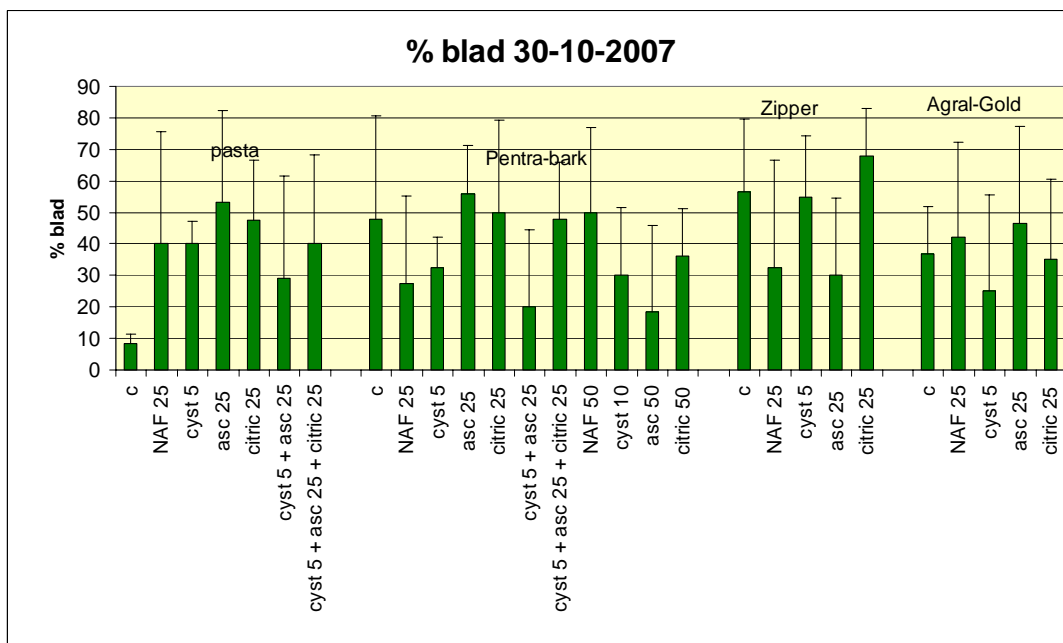
gemiddelden echter niet significant verschillend. Bij de spuitbehandelingen was een dergelijk effect niet te zien. Het lijkt erop dat de conditie ook invloed heeft op het tijdstip van bladval in de herfst. Bomen met een slechte conditie lieten vaak vroeger het blad vallen. Bij de pastabehandelingen is duidelijk te zien dat alle remstoffen een positief effect hadden op het percentage blad eind oktober 2007 (figuur 60). Door de enorme variatie was dit echter niet significant. Bij de spuitbehandelingen was er geen effect van de middelen op het percentage blad. Uit figuur 61 blijkt dat er een duidelijk verband is tussen de conditie van de boom en het tijdstip van bladval. Bomen met een slechtere conditie (hoge score) zitten slechter in het blad dan bomen met een goede conditie.



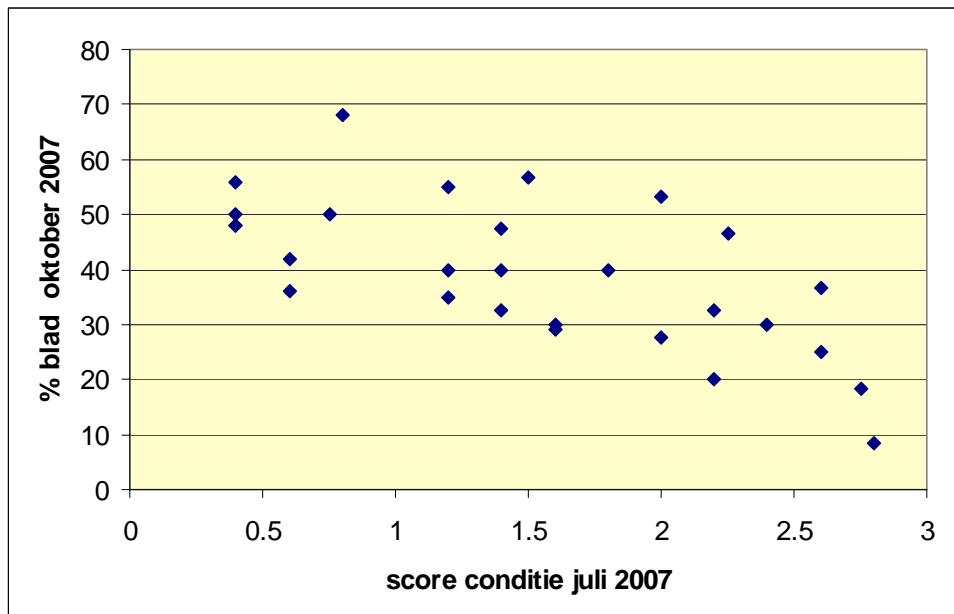
Figuur 58: Effecten van verschillende behandelingen met de remstoffen NaF, cysteine, ascorbinezuur en citroenzuur op de kleur van het blad in juli 2006 (blauw) en juli 2007. Beoordeling kroon: 0 = donkergroen, 1 = middelgroen, 2 = lichtgroen, 3 = geelgroen. De verticale lijnen geven de standaardafwijkingen van de verschillende behandelingen weer. Zie verder bijschrift figuur 54.



Figuur 59: Effecten van verschillende behandelingen met de remstoffen NaF, cysteine, ascorbinezuur en citroenzuur op de conditie van de boom in juli 2007. Beoordeling conditie: 0 = goed, 1 = redelijk, 2 = matig, 3 = slecht, 4 = zeer slecht, 5 = dood. De verticale lijnen geven de standaardafwijkingen van de verschillende behandelingen weer. Zie verder bijschrift figuur 54.



Figuur 60: Effecten van verschillende behandelingen met de remstoffen NaF, cysteine, ascorbinezuur en citroenzuur op het percentage waarmee bomen op 30 oktober 2007 nog in het blad zitten. De verticale lijnen geven de standaardafwijkingen van de verschillende behandelingen weer. Zie verder bijschrift figuur 54.



Figuur 61: Relatie tussen de conditie van de boom in juli 2007 en het percentage bomen dat in oktober 2007 nog in het blad zit.

Discussie en conclusies

Terwijl de mate van aantasting van de bomen over het algemeen toenam van 2005 tot 2006, was in 2007 een stuk herstel te zien. Dit bleek niet alleen uit een afnemende mate van aantasting in 2007, maar ook uit callusvorming in de bastscheuren. Het percentage bomen met actieve bloeding leek in 2007 te zijn afgenomen, maar dit kan deels toe te schrijven zijn aan het rooien van de meest zieke bomen begin 2007. Tussen juli 2007 en oktober 2007 nam de mate van bastscheuren wel bij vele behandelingen toe. Binnen de behandelingen was sprake van een enorme variatie in resultaten. Daar komt nog bij dat de aantastinggraad van de bomen verschillend was bij aanvang van de behandelingen in 2005. Toch lieten de resultaten een aantal trends zien. Bij de pastabehandelingen resulteerden behandelingen met remstoffen in een aantal gevallen in betere resultaten dan de controle behandeling waarbij pasta zonder middelen gebruikt was. Zo kwam naar voren dat de mate van aantasting van onbehandelde bomen tussen 2005 en 2007 toegenomen was, terwijl een aantal remstoffen juist zorgde voor een afname van de mate van aantasting. Cysteïne, al dan niet in combinatie met ascorbinezuur scoorde daarbij het beste. In combinatie met pasta hadden diverse middelen een significant positief effect op de callusvorming en het verminderen van nieuwe actieve bloeding. Hoewel ook positieve effecten van middelen op de kroon en conditie werden waargenomen, waren de hier gevonden verschillen niet significant door de grote spreiding. Op de mate van het voorkomen van bastscheuren was geen positief effect te zien. Citroenzuur leek niet of minder effectief dan de andere middelen. Bij de spuitbehandelingen was een grilliger beeld te zien dan bij de pastabehandelingen. In combinatie met Agral-Gold bleken een aantal middelen een positief effect te hebben op het verminderen van de aantasting tussen 2005 en 2007. Middelen die in dit geval het beste werkten (NaF en citroenzuur), kwamen niet overeen met de middelen die in combinatie met pasta het beste werkten. Waarnemingen in 2008 moeten duidelijk maken of deze verschillen dan weer te zien zijn. Verschillen in effectiviteit tussen de middelen waren immers relatief klein. In combinatie met de andere geteste uitloeiers (Pentra bark en Zipper) gaven de remstoffen geen verminderde aantasting tussen 2005 en 2007. Effecten op de mate van callusvorming, de mate van actieve bloeding, de kleur van het blad en de conditie waren bij de spuitbehandelingen niet duidelijk. Vaak gaven onbehandelde bomen verbeteringen in diverse opzichten en werd dit niet verder verbeterd door de remstoffen. Hoewel vooral bij de pastabehandelingen positieve effecten van diverse remstoffen te zien waren, is het nog te vroeg hieruit een praktijkadvies te distilleren, dat veilig en met een behoorlijke slagingskans toegepast kan worden. Vanwege de variatie in ernst van aantasting tussen de bomen aan het begin van de proef is het

mogelijk dat behandelingen die in staat zijn de bruiningsreactie te vertragen of te stoppen in het ene geval wel afdoende werken en in het andere geval niet.

Aanbevelingen

Omdat bomen in de veldproef in Houten inmiddels twee en een half jaar behandeld en gevolgd zijn, is het waardevol deze bomen ook in 2008 te blijven volgen om te zien of ingezette tekenen van herstel zich voortzetten of dat er toch weer een terugval optreedt. Wat betreft het behandelen van de bomen, is het zinvol aan te sluiten bij de resultaten van de zaailingen die ziek gemaakt zijn en vervolgens behandeld met remstoffen. Daarnaast kunnen nieuwe inzichten uit de proef met het modelsysteem getest worden op volwassen bomen in het veld, waarbij ook aandacht nodig is voor het vergelijken van blijkbaar vatbare en minder vatbare bomen.

4 Communicatie

Coördinator/woordvoester: Dr.ir. Marijke Dijkshoorn-Dekker (PPO)
Adviseur: Drs. Bouke de Vos (WUR)

De kastanjeziekte heeft het karakter van een maatschappelijke issue. Meerdere gemeenten, vooral de grote vier, hebben zich op politiek-bestuurlijk niveau hard gemaakt voor een grootschalige aanpak van deze ziekte. In 2005 heeft de minister van LNV een eerste onderzoeksprogramma laten uitvoeren, waaruit naar voren kwam dat de veroorzaker vermoedelijk een bacterie was behorend tot de groep *Pseudomonas syringae*. Een vervolgonderzoek in opdracht van het ministerie in 2006 heeft dit bevestigd. Vervolgens heeft de minister van LNV gevraagd verder onderzoek te verrichten naar het vinden van oplossingsrichtingen om de kastanjeziekte te beheersen. Zij heeft hiervoor 245.000 euro beschikbaar gesteld.

Er is behoorlijke belangstelling bij de gemeenten, onder de media en onder het grote publiek. Aesculaap heeft zich er voor ingezet om daar adequaat op te reageren en ook pro-actief op in te spelen. Omdat het om een onbekende ziekte gaat, die bovendien veel onrust veroorzaakt, is het belangrijk dat de resultaten van het onderzoek eenduidig en vooral duidelijk en feitelijk worden gecommuniceerd, zonder mee te gaan in ongefundeerde speculatie. Aesculaap heeft ervaren dat dit communicatiedoel veel inspanning en de nodige regie vergt. Daarom is gekozen voor een adequate en stelselmatige actieve informatievoorziening naar alle betrokken partijen, inclusief het grote publiek, en de communicatie onder verantwoordelijkheid te brengen van de programmacoördinator.

Aanpak

Binnen Aesculaap en haar communicatieteam is afgesproken dat de informatie in volgorde van betrokkenheid van de verschillende partijen naar buiten gaat. Dat zijn allereerst de Aesculaapleden en de opdrachtgever, het ministerie van LNV. Vervolgens gaat de informatie naar iedereen die zich heeft ingezet: gemeenten die hebben meegewerkt aan de inventarisatie, de VNG, de Nederlandse Bond voor Boomkwekers en de Bomenstichting. Zij krijgen een elektronische brief, die verschijnt voorafgaand aan de andere communicatiemiddelen. Daarna wordt het nieuws via website en andere middelen vrijgegeven voor overige belanghebbenden.

Uitvoering

In de beginperiode van Aesculaap was de communicatie vooral gericht op het uiteenzetten van de resultaten van het onderzoek van 2006. Vervolgonderzoek van 2007 is in augustus van start gegaan. In het afgelopen jaar was het belangrijk de juiste informatie regelmatig en adequaat vrij te geven over de stand van zaken in het onderzoek en ernst en omvang van het probleem.

De informatie vanuit het onderzoek is in 2007 naar buiten gegaan door middel van een elektronische nieuwsbrief en via media en vermeldingen op de website. Op de website is ook het onderzoeksprogramma gepresenteerd van 2007.

Aesculaap heeft haar eigen website: www.kastanjeziekte.wur.nl. De website wordt regelmatig van verse inhoud en de laatste stand van zaken voorzien. Er wordt daarbij gelet op de toegankelijkheid van de informatie en hoe verschillende doelgroepen bereikt kunnen worden/ aan hun informatie kunnen komen (wetenschappers, particulieren, gemeenten, partijen in het groen).

De website wordt nog steeds veelvuldig bezocht. Op deze site is ook de e-mailbox: kastanjeziekte@wur.nl te vinden. Menigeen vindt deze ingang om eventuele vragen te stellen, foto's toe te sturen of te informeren. Het gaat hierbij voornamelijk om particulieren. Aesculaap is sindsdien veelvuldig via verschillende kanalen (telefoon, Internet, email, bezoeken, brieven) benaderd door media en particulieren. Dat heeft het afgelopen jaar geleid tot bijna 100 artikelen in de Nederlandse kranten en aantal optredens op radio en televisie.

Verder zijn er in het kader van het onderzoeksprogramma diverse presentaties gehouden onder andere op

een bijeenkomst van Landschapsbeheer voor alle gemeenten in Groningen.

Aantallen artikelen

Voor het aantal artikelen is gezocht in LexisNexis Academic. Dat leverde voor 2005 totaal 307 hits op. Dat is zeker niet volledig, want in LexisNexis zijn niet alle dagbladen inbegrepen (geen Nederlands Dagblad en De Limburger/Limburgs Dagblad). Ruwgeschat hebben deze bladen samen ook 15 keer geschreven (= ca. 5% van het zoekresultaat. Bovendien zaten in 2005 het AD en zijn regionale kopbladen (incl. Utrecht, Den Haag en Groene Hart) een deel van het jaar niet in LexisNexis; hun aandeel voor die tijd wordt geschat op 25. Totale schatting artikelen in 2005 350 stuks.

Voor 2006 is de score 129 artikelen. Daarbij opgeteld een schatting voor de artikelen die niet in LexisNexis worden opgenomen zal het totale aantal artikelen in 2006 liggen rond de 140 stuks.

In 2007 is de score 100 artikelen (artikelen die niet in LexisNexis zitten, zijn hier niet in meegenomen). In 2005 waren er twee keer zoveel artikelen als in 2006 en 2007. Dat laat zich goed verklaren: het is in ieder geval geen gevolg van de inspanningen van Aesculaap. Het grote verschil zit in het feit dat de kastanjeziekte in 2005 nog echt nieuw was en dit jaar niet meer en dat in 2006/2007 het wachten is (geweest) op een bestrijdings- of beheersingsstrategie.

Producten

Producten opgeleverd gedurende het programma Aesculaap:

- Een web-site www.kastanjeziekte.wur.nl waar alle actuele ontwikkelingen en onderzoeksresultaten zijn te vinden, inclusief achtergrondinformatie
- het bedienen van verschillende media, schrijvende pers, televisie en radio op regionaal en nationaal gebied.
- 1 brief richting gemeenten standpunt Aesculaap ten aanzien van alternatieve middelen/methoden
- het beantwoorden van vele vragen van particulieren/gemeenten en andere partijen in het groen door middel van www.kastanjeziekte@wur.nl
- centraal persoverzicht
- het houden van presentaties op verschillende bijeenkomsten
- vakbladartikelen
- elektronische nieuwsbrieven