

## Het vaststellen van de gevoeligheid van wilgen voor de watermerkziekte: problemen en perspectieven

*Determination of the susceptibility of willows to the Watermark disease: problems and prospects.*

M. de Kam

Rijksinstituut voor onderzoek in de bos- en landschapsbouw "De Dorschkamp", Wageningen

### 1 Inleiding

Een belangrijk punt bij de aanleg van wilgebeplantingen is de gevoeligheid voor de watermerkziekte van de te planten klonen. Regelmatig wordt De Dorschkamp hierover dan ook om advies gevraagd. De bedoeling van dit artikel is een overzicht te geven van alles wat bekend is omtrent de gevoeligheid van wilgen voor deze ziekte. Daarbij komen ook de methoden ter sprake, die worden toegepast om die resistentie vast te stellen en de problemen die daarbij moeten worden opgelost.

### 2 Toetsproefresistentie en veldresistentie

Het vaststellen van de gevoeligheid van een plant voor een bepaalde ziekte kan op verschillende manieren gebeuren. Een veelgebruikte methode is, om het ziekteverwekkende organisme (schimmel of bacterie) geforceerd op of in dat deel van de plant te brengen, waar de symptomen te verwachten zijn. Zo kan men populieren toetsen op gevoeligheid voor bacteriekanker, door de verwekker (de bacterie *Xanthomonas populi*, een bastparasiet) via een wondje in de bast te brengen. De gevoeligheid van iepen voor iepenziekte wordt getoetst door een sporesuspensie van de schimmel *Ophiostoma ulmi*, een vaatparasiet, in de vaten van een gezonde iep te brengen. De reactie van de plant op zo'n "inoculatie" nemen we dan als maat voor de gevoeligheid. Aan zo'n werkwijze zitten verschillende voor- en nadelen, die hier niet allemaal kunnen worden behandeld. Duidelijk zal echter zijn, dat de resultaten van zo'n kunstmatige inoculatieproef niet zonder meer kunnen worden toegepast op de situatie in het veld. Toch is juist dát, waarin we geïnteresseerd zijn: hoe groot is het risico, dat een boom in het bos, in de stad, etc. ziek wordt. Er is eigenlijk maar één manier om daar goed achter te komen, en wel door gedurende lange tijd nauwkeurige veldwaarnemingen te verrichten. Zo weten wij van de populierekloon 'Robusta' dat deze zelden ernstig door bacteriekanker wordt aangeast. We kunnen dat zeggen omdat 'Robusta' al tientallen jaren massaal wordt gekweekt onder zeer uiteenlo-

### Summary

*The susceptibility of willow clones to Watermark disease should be considered when establishing willow plantations. A review is given on resistance research in willow to Watermark disease. Resistance of plants to pathogens may be determined by field observations ("field resistance") and by artificial inoculations ("experimental resistance"). Both methods are discussed and it is advocated that they are used in combination to test the resistance.*

*In the case of Watermark disease caused by the bacterium *Erwinia salicis*, the correlation between field resistance and experimental resistance is insufficient, which is demonstrated with some examples. The development of a method to test the susceptibility of willows to *E. salicis* is reported. The presence and spread of bacteria after artificial inoculation is determined by taking advantage of the fact that metabolic products of this bacterium are transported by the transpiration stream to the leaves, where they are detected serologically.*

*In conclusion, the advice is to stop the cultivation of extremely susceptible clones like *Salix alba* 'Liempde', 'Drakenburg' and 'Lichtenvoorde', to remove diseased trees as soon as possible and to cut the branches of pollard willows each 4 years.*

pende omstandigheden en in zo'n geval is de uitspraak gerechtvaardigd "dat 'Robusta' voldoende veldresistentie tegen bacteriekanker bezit". Naar analogie van dit voorbeeld kunnen we van de Liempdse wilg zeggen, dat deze een lage veldresistentie tegen de watermerkziekte heeft, omdat gebleken is, dat deze kloon op allerlei groeiplaatsen massaal door deze ziekte wordt aangetast (Jansen, 1969).

De grote vraag is: hoe lang moet een boom gezond blijven voordat met redelijke zekerheid gezegd kan worden dat hij voldoende veldresistent is. Op deze vraag kan niet één algemeen antwoord gegeven worden, omdat dat voor elk pathogeen en voor elke boomsoort of kloon verschillend kan zijn. In het geval van de watermerkziekte moeten we minstens 15 jaar geduld

Tabel 1 Aantasting van 21 wilgeklonen in het voorjaar van 1979, na inoculatie in het najaar van 1977.

Table 1 Attack of 21 willow clones in spring 1979 after inoculation in autumn 1977.

kloon nr.	naam	totaal ge'inoc.	aangetast <sup>1)</sup>		totaal aangetast
			V	IS	
404	'Drakenburg'	18	4	3	7
405	'Liempde'	24	0	0	0
433	S. alba	18	0	3	3
440	'Belders'	24	3	4	7
441	'Tinaarlo'	18	0	0	0
443	S. alba	18	0	0	0
448	S. alba	18	2	3	5
453	S. alba	18	0	0	0
467	S. alba	18	1	5	6
469	S. alba	18	0	0	0
503	S. alba	18	3	0	3
509	S. alba	18	0	0	0
510	S. alba	18	0	0	0
511	S. alba	18	0	0	0
516	S. alba	18	0	0	0
538	S. daphnoides	18	0	0	0
594	Salix sp.	18	0	0	0
595	Salix sp.	18	0	0	0
596	Salix sp.	18	0	0	0
639	S. alba	18	0	0	0
661	S. alba	18	0	0	0

1) V = verwelking, IS = alleen inwendige symptomen.  
wilting exclusively internal symptoms.

Tabel 2 Relatie tussen het aantal zieke planten uit tabel 1 en het gebruikte inoculum<sup>1)</sup>.

Table 2 Relation between the number of diseased plants mentioned in Table 1 and the inoculum used.

sel.nr.	perssap	isol. 69	isol. 71	isol 103	69, 71, 103 combinatie	totaal
404	5/6		0/6		2/6	7/18
433	2/6		0/6		1/6	3/18
440	3/6	3/6		0/6	1/6	7/24
448	4/6			0/6	1/6	5/18
467	4/4			2/6	0/6	6/6
503	1/6	2/6		0/6		3/18

1) noemer = aantal ge'inoculeerde planten; teller = aantal aangetaste planten.  
denominator = number of plants inoculated; numerator = number of diseased plants.

hebben, omdat *Erwinia salicis*, de oorzaak van de ziekte, de bomen als regel niet voor hun tiende jaar aantast. Bovendien moeten er behoorlijk wat beplantingen zijn aangelegd, zodat voldoende waarnemingen kunnen worden verricht.

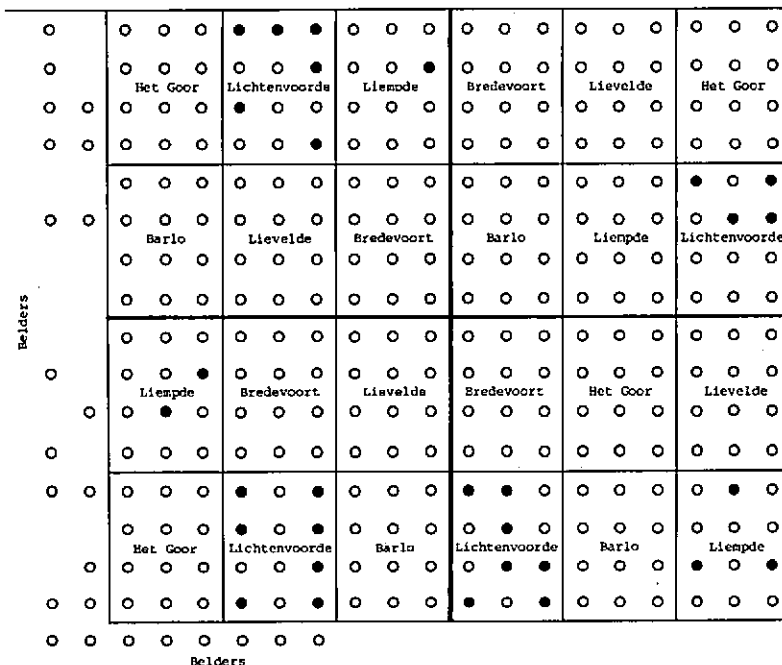
Kunstmatige inoculatieproeven kunnen echter belangrijke aanwijzingen opleveren voor de te verwachten veldresistentie en als zodanig zijn zulke proeven dan ook onmisbaar bij het resistentie-onderzoek. In het geval van de watermerkziekte is de zaak extra gecompliceerd, omdat er geen goede samenhang bestaat tussen de resultaten van de kunstmatige toetsproeven en de veldresistentie (zie volgende hoofdstuk). Om deze reden is het ons tot nu toe niet mogelijk geweest

een betrouwbare uitspraak te doen omtrent de gevoeligheid van een aantal handelsklonen.

Wanneer we dus spreken over gevoeligheid van wilgen voor de watermerkziekte moeten we een duidelijk onderscheid maken tussen veldresistentie en toetsproefresistentie.

### 3 Kunstmatige inoculatieproeven

Sinds het onderzoek naar de watermerkziekte op De Dorschkamp een aanvang nam in 1967, zijn inmiddels 60 inoculatieproeven uitgevoerd. De meeste van deze proeven hadden ten doel informatie te verzamelen over de infectiebiologie van de bacterie (Gremmen en



Figuur 1 Proefveldschema proef 1. Alle planten zijn geïnoculeerd; de zwarte stippen stellen de planten voor, die ziek werden na de inoculatie.

Figure 1 Scheme experiment 1. All plants were inoculated, the black dots represent diseased plants.

Tabel 3 Het optreden van de watermerkziekte in wilgen onder natuurlijke omstandigheden en na kunstmatige inoculatie.  
Table 3 Occurrence of Watermark disease in willow under natural conditions and after artificial inoculation.

soort/kloon <i>species/clone</i>	natuurlijke aantasting <i>natural attack</i>			kunstmatige inoculatie <i>artificial inoculation</i>	
	verwelking <i>wilting</i>	isolatie <i>E. salicis</i>	massale afsterving <i>massive dying</i>	verwelking <i>wilting</i>	isolatie <i>E. salicis</i>
<i>S. viridis</i> (4, 6)	+	.	+	+	.
<i>S. fragilis</i> (6)	+	.	-	-	.
<i>S. viminalis</i> (2)	+	.	.	-	.
<i>S. caprea</i> (5)	+	+	.	-	.
<i>S. vitellina</i> (5, 6)	+	+	.	+	.
<i>S. purpurea</i> (3, 6)	.	.	.	+	.
<i>S. daphnoides</i> (3)	.	.	.	-	.
<i>S. triandra</i> (3)	.	.	.	-	.
<i>S. amygdalina</i> (3)	.	.	.	+	.
<i>S. cinerea</i> (6)	+	.	.	.	.
<i>Salix alba</i>					
'Calva' (1, 4, 6)	+	+	+	+	+
'Liempde' (7)	+	+	+	+	+
'Drakenburg' (7)	+	+	+	+	.
'Belders' (7)	+	.	-	+	.
'Het Goor' (7)	.	.	.	+	.
'Lichtenvoorde' (7)	+	+	.	+	+
'Bredevoort' (7)	.	.	.	-	.
'Barlo' (7)	.	.	.	-	+
'Lieveelde' (7)	.	.	.	-	.
'Tristis' (7)	+	+	-	.	.

+ = positief; - = negatief; . = geen of onvoldoende waarnemingen.  
*positive negative none or insufficient data.*

1. volgens Day, 1924; 2. Lindeijer 1931; 3. Lindeijer 1932; 4. Dowson 1937; 5. Wong en Preece 1973; 6. Wong, Nash en Preece 1974; 7. eigen waarnemingen.

De Kam, 1981). In het kader van dit artikel zijn echter twee proeven van bijzonder belang, omdat deze ten doel hadden de relatieve gevoeligheid van een aantal handelsklonen of nieuwe kruisingen vast te stellen.

### 3.1 Proef 1: toetsing van 7 handelsklonen

In het voorjaar van 1972 werden in Lienden in de Betuwe 6 *S. alba* klonen aangeplant. Van elke kloon wer-

den 48 tweejarige planten, verdeeld over 4 herhalingen geplant in een plantverband van 2 x 2 meter. Deze klonen waren 'Liempde', 'Lichtenvoorde', 'Barlo', 'Lielvelde', 'Het Goor' en 'Bredevoort'. Naast dit proefveld werden nog 24 'Belders' geplant (zie figuur 1). In oktober van datzelfde jaar werden alle planten op twee plaatsen aan de stam geïnoculeerd, door met behulp van een stanleymes enkele druppels bacteriesuspensie in de houtvaten te brengen. Deze suspensie bestond uit een mengsel van 4 reïncultures van *Erwinia salicis*. In de zomer van 1973 vertoonden 23 'Lichtenvoorde' en 5 'Liempde' typische symptomen van de watermerkziekte. De daaropvolgende twee jaren verwelkten nog 1 'Lichtenvoorde' en 2 'Liempde' (zie figuur 1). Alle andere planten reageerden niet op de inoculaties. Een deel van deze proefplanten wordt nog steeds geobserveerd. De planten, die intussen 12 jaar oud zijn, zijn voor verschillende andere proefnemingen gebruikt, die buiten het kader van deze publikatie vallen. In 1982 verwelkte één exemplaar van 'Het Goor'; alle andere bomen (ook de 'Liempde') vertonen nog steeds geen watermerksymptomen.

De conclusie is, dat 'Lichtenvoorde' onder de proefomstandigheden vrij gevoelig was voor de watermerkziekte (50% van de planten aangetast). 'Liempde' daarentegen vertoonde slechts in enkele gevallen symptomen (14,8%). Hieruit volgt, dat deze toetsmethode onbetrouwbaar is: de Liempdse wilg is immers zeer gevoelig. Uit het feit, dat de andere klonen geen reactie te zien gaven mag dus zeker niet worden geconcludeerd, dat deze resistent zijn. De enig juiste conclusie is nogmaals, dat de methode ongeschikt is voor het toetsen van de veldresistentie van wilgen tegen de watermerkziekte. Ook uit de 50% aantasting van 'Lichtenvoorde' kan dus niet worden geconcludeerd, dat deze kloon een grote veldgevoeligheid bezit. Een flinke dosis achterdocht betreffende 'Lichtenvoorde' lijkt niettemin gerechtvaardigd.

### 3.2 Proef 2: toetsing van 21 wilgeselecties, waaronder 4 handelsklonen

Voorjaar 1975 werden in Lienden 21 wilgeselecties geplant. Van elke kloon werden 18 of 24 planten gepoot in 3 of 4 herhalingen in een plantverband van 1,5 x 1,5 meter. In oktober 1975 werden alle planten geïnoculeerd met *E. salicis* reïncultuur nr. 71. Geen enkele reactie trad op bij de geïnoculeerde planten in 1976 en 1977 en gezien onze ervaringen in eerdere inoculatieproeven was het niet te verwachten dat er daarna nog een reactie zou optreden. Ook van *S. alba* 'Liempde' reageerde geen enkele plant.

Daarom werden in oktober 1977 opnieuw inoculaties uitgevoerd. Als inoculum werd gebruikt: a. reïncultuur *E. salicis* isolaat 69; b. idem nr. 71; c. idem nr. 103; d.

de combinatie van 69, 71 en 103 in een verhouding van 1:1:1 en e. perssap uit takken van een watermerkzieke wilg uit Ede. Dit sap werd direct na het uitpersen van de takken in de planten gebracht. De planten werden met de verschillende suspensies behandeld zodat sapinoculaties steeds met minstens twee reïncultuurinoculaties vergeleken werden.

In augustus 1978 vertoonden 13 planten de typische ziektesymptomen. In het voorjaar van 1979 werden vervolgens alle planten inwendig onderzocht. Daarbij bleek, dat verscheidene planten weliswaar niet verwelkt waren, maar toch inwendig de typische symptomen van de watermerkziekte vertoonden. In tabel 1 en 2 zijn de resultaten van de proef weergegeven. Opmerkelijk is, dat 'Liempde' geen enkele reactie te zien geeft, terwijl een aantal 'Drakenburg' en 'Belders' wel werd aangetast. Uit deze proef blijkt dus opnieuw dat deze toetsmethode onbetrouwbaar is en geen afspiegeling kan zijn van de veldresistentie. Ten aanzien van de verschillende bacteriesuspensies blijkt uit tabel 2 dat inoculatie met isolaat nr. 71 opnieuw geen enkel resultaat opleverde, zodat deze stam waarschijnlijk avirulent is. Stam 69 gaf een reactie die vergelijkbaar is met die van het perssap, terwijl stam 103 en de combinatie van de drie stammen iets minder planten ziek maakten dan het perssap, maar de verschillen waren niet significant.

## 4. De huidige stand van zaken

Onze kennis van de gevoeligheid van wilgen voor de watermerkziekte is gebaseerd op literatuurgegevens, veldwaarnemingen en kunstmatige inoculatieproeven. Tabel 3 geeft daar een overzicht van. Uit deze tabel blijkt wel, hoe groot de leemte is in onze kennis van dit onderwerp. Toch kunnen we uit deze gegevens in elk geval concluderen, dat *S. viridis* en de *S. alba* klonen 'Calva', 'Liempde' en 'Drakenburg' zeer gevoelig zijn voor de ziekte. *S. fragilis*, *S. viminalis*, *S. caprea*, *S. cinerea*, *S. alba* 'Lichtenvoorde' en 'Belders' en de treurwilg *S. alba* 'Tristis' zijn eveneens gevoelig, maar er zijn onvoldoende gegevens om een uitspraak omtrent hun relatieve gevoeligheid te kunnen doen. Er zijn eveneens te weinig veldwaarnemingen verricht aan *S. purpurea*, *S. amygdalina* en *S. alba* 'Het Goor', maar uit inoculatieproeven blijkt, dat ze in elk geval "de ziekte kunnen krijgen", zodat met de aanplant ervan voorzichtigheid geboden is.

## 5. Perspectieven

Het onderzoek van de laatste jaren heeft methoden opgeleverd om de uitbreiding van de bacterie in de boom beter vast te stellen, ook al vertonen deze geen symptomen (De Kam, 1982, 1983). Bij deze methoden

wordt gebruik gemaakt van het feit, dat *E. salicis* populaties, die in de houtvaten van de wilg aanwezig zijn, stoffen afscheiden die met de sapstroom worden meegevoerd naar de bladeren. Daar kunnen deze stoffen met een zeer gevoelige serologische techniek specifiek worden aangetoond. Ook wanneer er geen enkel uitwendig of zelfs inwendig symptoom waarneembaar is, kan met deze methode via het analyseren van bladmonsters een indruk worden verkregen over het voorkomen of de uitbreiding van de bacterie in de planten. Door deze ontwikkeling zijn we in feite minder afhankelijk geworden van het optreden van zichtbare symptomen na de inoculatie. Verder zijn we er de laatste jaren in geslaagd een groter inoculatiesucces te verkrijgen door de selectie van virulentere bacteriestammen.

Deze ontwikkelingen hebben de verwachting gewekt, dat de resultaten van de toetsproeven betrouwbaarder zullen worden dan in het verleden het geval was. Uiteraard is nu nog niet te voorspellen of bepaalde *S. alba* klonen resistenter zullen zijn dan andere. Een te groot optimisme is daarom niet op zijn plaats: resistentieveredeling is een moeilijke en langdurige zaak en heeft bovendien haar beperkingen.

Een eerste stap naar het gezond maken van de wilgeteelt in Nederland zou zijn, wanneer men eindelijk de teelt van de zeer vatbare klonen 'Liempde', 'Drakenburg' en ook 'Lichtenvoorde' zou staken. In 1980-1981 werden nog ca. 30.000 planten van deze drie klonen door de NAK-B gewaarmerkt (ongeveer 30% van het totaal). Dat zijn opnieuw 30.000 potentiële infectiebronnen die door heel Nederland zijn verspreid. Wanneer men ondanks alle risico's toch wilgen wil kweken, verdient het aanbeveling zoveel mogelijk in de handel zijnde klonen te mengen (met uitzondering van de drie genoemde) en deze in beperkte aantallen aan te planten. Een tweede tactiek die moet worden aanbevolen is het opruimen van infectiehaarden: zodra de eerste verschijnselen zichtbaar worden moeten wilgen worden gekapt of geknot en dat knotten moet om de 4 jaar worden herhaald. Er is namelijk onlangs aangetoond, dat zodra een wilg verwelkt, grote hoeveelheden bacteriën vanaf zo'n zieke wilg naar de omliggende beplantingen worden verspreid (Van der Zweep en De Kam, 1982).

Wat betreft de teelt van wilg voor industriële doeleinden kan worden opgemerkt, dat dit mogelijk is in korte omlopen, omdat de ziekte slechts bij uitzondering bomen aantast die jonger zijn dan 10 jaar. Zodra de eerste bomen in de opstand worden aangetast verdient het aanbeveling de hele opstand te vellen, omdat de ervaring leert dat de ziekte toch jaar na jaar voortschrijdt, ook al worden de zieke exemplaren verwijderd. In de meeste gevallen is het hout dan reeds verkoopbaar als vezel- of papierhout.

De aanplant van de wilg als park- of laanboom in langere omloop zal echter voorlopig beperkt moeten blijven.

## Literatuur

- Day, W. R. 1924. The watermark disease of the cricket-bat willow (*Salix caerulea*) Oxford For. Mem. 3.
- Dowson, W. J. and E. McC. Callan. 1937. The watermark disease in the white willow. *Forestry* 11: 104-108.
- Gremmen, J. and M. de Kam. 1981. New developments in research into the watermark disease of white willow (*Salix alba*) in the Netherlands. *Eur. J. For. Path.* 11: 334-339.
- Jansen, E. C. 1969. De watermerkziekte, een ernstige bedreiging van de schietwilg (*Salix alba* L.). *Ned. Bosb. Tijdschr.* 41: 118-126.
- Kam, M. de. 1982. Detection of soluble antigens of *Erwinia salicis* in leaves of *Salix alba* by Enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur. J. For. Path.* 12: 1-6.
- Kam, M. de. 1983. Detection and transport of soluble antigens of *Erwinia salicis* and their role in symptom expression of the Watermark disease. *Eur. J. For. Path.* 13.
- Lindeijer, E. J. 1931. Een bacterieziekte van de wilg. *Tijdschr. Plantenz.* 37: 63-67.
- Lindeijer, E. J. 1932. De bacterieziekte van den wilg veroorzaakt door *Pseudomonas saliciperda* n.sp. Proefschrift Univ. Amsterdam.
- Wong, W. C., T. H. Nash and T. F. Preece. 1974. A field survey of watermark disease of cricket-bat willow in Essex and observations on some of the probable sources of the disease. *Plant Pathology* 23: 25-29.
- Wong, W. C. and T. F. Preece. 1973. Infection of cricket-bat willow (*Salix alba* var. *caerulea*) Sm. by *Erwinia salicis* (Day) Chester detected in the field by the use of a specific antiserum. *Plant Pathology* 22: 95-97.
- Zweep, P. van der, and M. de Kam. 1982. The occurrence of *Erwinia salicis*, the cause of Watermark disease, in the phyllosphere of *Salix alba*. *Eur. J. For. Path.* 12: 257-261.