

Onderzoekprogramma

"Behoud de kastanje"

Deel 3



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

Samenvatting

De bloedingsziekte in paardenkastanje (*Aesculus* spp.) is een nationaal en mogelijk internationaal probleem in het stedelijk groen, bossen en boomteeltsector. Het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit heeft afgelopen drie jaar onderzoek gefinancierd naar deze ziekte. De aanpak van het onderzoek, onder begeleiding van de werkgroep Aesculaap, was erop gericht om zo snel mogelijk een oplossingsrichting te vinden voor het beheersen van de kastanjeziekte. In de afgelopen drie jaren is o.a. de veroorzaker van de ziekte geïdentificeerd (*Pseudomonas syringae*), de praktijksituatie in kaart gebracht, een toetsstelsel ontwikkeld en een aanknopingspunt gevonden voor een mogelijke beheersmethode. Op basis van de aanbevelingen uit het voorgaand onderzoek is een nieuw onderzoeksprogramma 2008 samengesteld met daarin de vier meest kansrijke en wetenschappelijk onderbouwde onderzoekrichtingen: epidemiologie, resistentie, biotische factoren en beheersing.

Het epidemiologisch onderzoek betreft een voortzetting van het onderzoek naar het epifytisch voorkomen van de bacterie *Pseudomonas syringae*. De bacterie is aangetroffen op de buitenkant van zieke bomen en in het regenwater in de omgeving van zieke bomen. Uitbreider onderzoek is nodig om dit te bevestigen en een beeld te krijgen van de aanwezige bacterieconcentratie en de benodigde concentratie om infectie te krijgen. Ook moet worden vastgesteld of de bacteriën kunnen worden overgebracht door insecten of via zaad, en of ze kunnen binnendringen via natuurlijke openingen zoals lenticellen en huidmondjes. De uitkomsten van dit onderzoek kunnen grote gevolgen hebben voor het beheersadvies.

Het resistentieonderzoek is erop gericht om in kaart te brengen welke soorten en cultivars van paardenkastanje resistent of minder vatbaar zijn en of de mate van aantasting mede wordt bepaald door genetische verschillen binnen dezelfde soort. In aanvulling daarop wordt gewerkt aan de ontwikkeling van een snelle kleuringstoets, gebaseerd op het polyfenoloxidase-enzym, om de gevoeligheid voor de kastanjeziekte te testen bij individuele bomen. 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 paardenkastanje in het openbaar groen.

Het onderzoek naar biotische factoren omvat proeven om te kijken of aanwezigheid van de kastanjemineermot de kans op infectie door kastanjeziekte vergroot en of er een relatie is tussen wondweefselvorming in de bastwonden als gevolg van de kastanjeziekte en het optreden van secundaire infectie door houtrot. De praktijk leert dat veel bomen vroegtijdig worden gekapt omdat de bomen onveilig worden als gevolg van dergelijke secundaire aantastingen. De resultaten uit het onderzoek leiden hoe dan ook tot relevante informatie voor het beheersadvies.

Voor de beheersing van kastanjeziekte wordt het onderzoek voortgezet naar de effectiviteit van de remstoffen en de toepasbaarheid (frequentie, toedieningsmethode etc.) in het openbaar groen. Hierbij wordt ook aandacht besteed aan het in kaart brengen van het natuurlijk verloop van de kastanjeziekte.

Maatregelen die de conditie van de bomen verbeteren zouden de kans op infectie en de ernst van een aantasting kunnen verminderen. Groeiplaatsverbeteringsproeven, die door diverse gemeenten (gaan) worden uitgevoerd, zullen vanuit het onderzoek worden begeleid, zodat wetenschappelijk onderbouwde informatie wordt opgeleverd voor een meer gericht beheersadvies.

De werkgroep Aesculaap zal de betrokken maatschappelijke partijen op de hoogte houden van de ontwikkelingen via de nieuwsbrief en de website www.kastanjeziekte.wur.nl.

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 the 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 nursery stock. Over the last three years, the Dutch Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality has financed the research on the horse chestnut disease. This research, coordinated by the working group Aesculaap, was aimed to find control methods for the horse chestnut bleeding disease and develop effective practical advice for urban green managers and arborists. A bacterium of the *Pseudomonas syringae* group was identified as the causal agent, the field situation was monitored, a bioassay was developed and a possible method to reduce the bleeding process was investigated. Based on the results and recommendations of this research, a new research program is proposed, focusing on epidemiology, resistance, biotic factors and disease control.

Research on the epidemiology is a continuation of a study into the epiphytic occurrence of *P. 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. More research is needed to confirm these observations, determine the epiphytic bacterial concentration, the concentration needed for infection, and the possible role of insects in transmitting the bacteria. The outcome may influence the management advice for disease control (<http://www.kastanjeziekte.wur.nl>).

Research on resistance will focus on differences in susceptibility and sensitivity to horse chestnut disease between species and hybrids of *Aesculus*. Preliminary results revealed 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*. Also, physiological studies indicated a possible correlation between the susceptibility of the tree and the activity of a polyphenol oxidase enzyme. This presumed correlation will be used to develop a quick test for screening the susceptibility of individual trees for horse chestnut disease. The results will indicate whether selection for resistance will be worthwhile for breeding and use in urban greenery.

The presence and rate of attack of biotic factors such as leafminer (*Cameraria ohridella*) may influence disease development by *P. syringae*. The research on this subject will be continued. Furthermore, the relation between wound healing (callus formation) in the bark and secondary fungal infections causing dry rot will be studied. In the field, many trees are removed as a result of hazardous situations caused by secondary dry rot rather than the primary *P. syringae* infection. The results of this research will inevitably be of relevance for the disease management advice.

In order to control chestnut bleeding disease, research on the efficacy of inhibiting agents will be extended (frequency and method of application). Monitoring of the natural progress of the disease under field conditions will also be continued.

Measures which improve the vitality of the trees are expected to have a positive effect on disease control. Experiments in Dutch town districts into growing site factors will be monitored in order to obtain scientific information to support an advanced disease management advice.

The working group Aesculaap will maintain contact with tree experts, advisors on urban greenery, researchers, city policymakers, landscapers, and urban green managers. All people concerned will be informed of the latest results by means of a news letter and the website of the working group (www.kastanjeziekte.wur.nl).

INHOUDSOPGAVE

Samenvatting.....	3
Summary	5
1 Inleiding.....	9
1.1 Resultaten tot nu toe.....	9
1.2 Onderzoeksrichtingen 2008	10
1.3 Indeling van het rapport.....	10
2 Toetsplantensysteem.....	11
3 Onderzoeksprojecten.....	11
3.1 Epidemiologie	11
3.1.1 Epifytisch onderzoek en zaadoverdraagbaarheid	12
3.1.2 Natuurlijke invalspoorten.....	12
3.1.3 Bestudering van het ziekteproces.....	12
3.1.4 Overdracht door insecten	13
3.2 Resistentie.....	13
3.3 Biotische factoren	14
3.3.1 Veiligheid bomen	15
3.3.2 Kastanjemineermot	15
3.4 Beheersing	15
3.4.1 Effectiviteit van remstoffen in de kas en in het veld	16
3.4.2 Groeiplaatsverbetering	17
4 Internationale samenwerking	17
5 Producten.....	17
6 Tijd en kosten	18

1 Inleiding

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. De aanpak van het onderzoek was erop gericht om zo snel mogelijk een oplossingsrichting te vinden voor de kastanjeziekte. Een groot aantal deskundigen vanuit verschillende disciplines, ook uit het buitenland, is betrokken bij het onderzoek. De werkgroep Aesculaap coördineert dit netwerk. Aesculaap is een samenwerkingsverband van onderzoekers, gemeenten en boomverzorgers.

1.1 Resultaten tot nu toe

Het onderzoeksprogramma is gestart in 2005 met het project 'Red de kastanje voor Nederland' en het onderzoek is voortgezet in 2006 en 2007 onder de titel 'Behoud de kastanje' (deel 1 en 2). Er is aangetoond dat een bacterie uit de *Pseudomonas syringae*-groep de veroorzaker is van de kastanjeziekte en er is gezocht naar 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. De ziektesymptomen breiden zich uit naar boven en naar beneden vanuit de infectieplaats. De bloedingsreactie kan twee weken ontstaan op de plaats van infectie en soms ook op andere plaatsen op de stam. Onder de bast is altijd weefseldegeneratie te zien, hoewel uitwendig soms ook wondherstel is waargenomen. De bacterie blijft dan inwendig 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.

In het algemeen kunnen bacteriën de boom binnendringen via kwetsbare plekken in de bast (zoals beschadigingen door dieren, schuren van takken, maaien, snoeien, vorst, bladverlies door wind, enz.). Oppervlakkige prik- of schaafwondjes zijn voldoende om zaailingen in de kas te infecteren. Of de poriën die van nature in de bast aanwezig zijn ook als toegangspoort voor de bacterie fungeren, is nog niet vastgesteld.

De bacterie lijkt overal op, aan en rondom de boom aanwezig te zijn. De bacterie is aangetroffen in bladeren, takken, bloemen en onderdelen van vruchten en in regenwater in de omgeving van de zieke boom. Vervolgonderzoek is nodig om meer inzicht in te krijgen in hoe de bacterie van daaruit de boom binnendringt. Uit het overlevingsonderzoek kwam naar voren dat de bacterie ook enkele maanden op houtsnippers en afgevallen bladeren kan overleven. Afgelopen najaar is tevens onderzocht of insecten de kastanjebacterie kunnen overbrengen maar de resultaten konden dit niet bevestigen.

Niet alle kastanjesoorten blijken even vatbaar voor de kastanjeziekte. Uit infectieproeven met takken kon de voorlopige conclusie worden getrokken dat *Aesculus x mutabilis*, *A. Flava*, *A. parviflora* en *A. pavia* niet (of tenminste minder) vatbaar lijken in vergelijking met *A. hippocastanum*. Een Japanse soort *A. turbinata* blijkt ook zeer gevoelig voor de ziekte.

In het onderzoek is een relatie ontdekt tussen de aanwezigheid van een enzym in het bastweefsel en de gevoeligheid van de kastanje voor de bloedingsziekte; wellicht kan hiermee in de toekomst worden getoetst of en in welke mate een boom of zaailing gevoelig is voor de ziekte.

Op diverse locaties is gedetailleerd groeiplaatsonderzoek gedaan. De onderzochte bomen vertoonden veel variatie in de mate van aantasting. Er is echter geen verband gevonden tussen de mate van bloedingsziekte en factoren zoals droogtestress, zoutschade, bladvlekkenziekte en de standplaatssituatie. Wel mag worden aangenomen dat beheersmaatregelen om de conditie, vitaliteit en levensduur van de bomen te verbeteren, de verspreiding van de bacterie in zieke bomen vermindert.

Als mogelijke beheersmaatregel is de werking van remstoffen onderzocht in laboratorium-, kas- en

veldproeven. Zieke planten zijn besmeerd met ascorbinezuur, cysteïne, citroenzuur en combinaties van deze stoffen. De behandeling met ascorbinezuur (alleen of in combinatie) bleek de ziekteontwikkeling af te remmen onder kasomstandigheden. In het veld was in 2007 enig herstel te zien, echter ook bij onbehandelde bomen. Hierdoor kan er nog geen eenduidige conclusie worden getrokken over het effect van de remstoffen onder praktijkomstandigheden.

1.2 Onderzoeksrichtingen 2008

In het door Aesculaap uitgebrachte eindrapport 'Behoud de kastanje, deel 2' (2007) is de stand van zaken van het onderzoek gepresenteerd betreffende 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 2008 samengesteld waarin onderzoek naar het vinden van mogelijke oplossingsrichtingen voor het beheersen van de ziekte wordt voortgezet. Een aantal van de voorgestelde onderzoeksprojecten uit het programma voor 2008 zijn een schakel in een keten van opeenvolgende stappen. Behandelingen moeten worden afgestemd op de praktijksituatie en proeven moeten worden herhaald om betrouwbare en robuuste conclusies te kunnen trekken. Uiteindelijk wordt beoogd om te komen tot een praktijkmanagementadvies voor het stedelijk groen, bossen en boomteeltsector.

1.3 Indeling van het rapport

In het hier gepresenteerde onderzoekprogramma worden de meest kansrijke en wetenschappelijk onderbouwde onderzoeksrichtingen beschreven.

In hoofdstuk 2 wordt het toetsplantensysteem beschreven dat de basis vormt voor diverse onderzoeksprojecten. Met behulp van toetsplanten kan de kastanjeziekte zorgvuldig worden bestudeerd in al zijn aspecten, fytopathologie, morfologie en fysiologie, maar vooral ook in onderlinge samenhang. Ook beheersmaatregelen kunnen met deze toetsplanten worden getest op hun werking.

In hoofdstuk 3 worden vier onderzoeksrichtingen beschreven:

De eerste onderzoeksrichting betreft de epidemiologie van de ziekte (paragraaf 3.1). Dit onderzoek is onderverdeeld in vier projecten, te weten het epifytisch voorkomen van de bacterie, de bestudering van het ziekteproces, natuurlijke invalspoorten en overdracht via insecten.

Paragraaf 3.2 gaat in op resistentie; resistentie tussen kastanjesoorten/cultivars/hybriden, variatie in resistentie tussen bomen binnen de soort *A. hippocastanum*, en het ontwikkelen van een kleuringstoets om verschillen in resistentie aan te tonen.

Paragraaf 3.3 behandelt de invloed van biotische factoren op de infectie door de kastanjabloedingsziekte, zoals de kastanjemineermot. Ook het optreden van secundaire houtschimmels na een primair infectie door *P. syringae* in relatie tot de mate van wondweefselvorming wordt bestudeerd.

In paragraaf 3.4 wordt ingegaan op de beheersingsmogelijkheden van de kastanjabloedingsziekte: voortzetting van het onderzoek naar de effectiviteit van remstoffen en wetenschappelijke ondersteuning bij het onderzoek naar de effecten van groeiplaatsverbetering op de vitaliteit en levensduur van aangetaste bomen (in samenwerking met gemeenten).

Nederland loopt voor in het onderzoek naar de kastanjeziekte. Echter, door meerdere landen wordt melding gemaakt van het voorkomen van de kastanjeziekte. In 2006 is een eerste symposium georganiseerd om te komen tot internationale samenwerking. In 2008 zal mogelijk een vervolg bijeenkomst worden georganiseerd ten behoeve van de kennisuitwisseling en de afstemming van het onderzoek (hoofdstuk 4). In hoofdstuk 5 worden de producten beschreven en in het laatste hoofdstuk (hoofdstuk 6) worden in tabelvorm de kosten van het onderzoeksplan gepresenteerd. Tevens wordt een tijdpad voor de verschillende onderdelen van het programma aangegeven. Veel onderzoeken lopen gelijktijdig, zodat wederzijdse interacties mogelijk zijn met als doel om in korte tijd resultaten te boeken.

2 Toetsplantensysteem

In de afgelopen jaren is een toetsplantensysteem gebruikt om kastanjes op reproduceerbare wijze te besmetten met de kastanjabloedingsziekte. De toetsplanten waren twee-jarige kastanjezaailingen, die onder geconditioneerde, ziektevrrije omstandigheden in de kas worden opgekweekt. Het systeem is zeer geschikt gebleken voor het screenen van beheersmaatregelen en de fysiologische en morfologische effecten ervan. Ook in 2008 zal gebruikt worden gemaakt van deze biotoets bij verschillende onderdelen van het onderzoek, waaronder het epidemiologisch onderzoek (paragraaf 3.1) en de beheersingsmethoden van de kastanjeziekte (paragraaf 3.4).

3 Onderzoeksprojecten

3.1 Epidemiologie

Uit het onderzoek van 2007 blijkt (nogmaals) dat de *Pseudomonas syringae* bacterie uit verschillende aangetaste delen van de boom is te isoleren. De bacterie lijkt ook epifytisch, op de buitenkant van de boom, aanwezig. Hij is aangetroffen op enkele bladeren, takken, bloemen en in verschillende onderdelen van ontwikkelende vruchten. Bovendien is de bacterie aangetroffen in spoelwater dat langs de buitenkant van zieke bomen naar beneden loopt en in regenwater in de omgeving van zieke bomen. Uitgebreider onderzoek is nodig om dit te bevestigen en tevens een beter beeld te krijgen over het voorkomen van de bacteriën (bijvoorbeeld op gezonde bomen) en de bacterieconcentratie die van nature voorkomt (paragraaf 3.1.1). Bloemen zijn over het algemeen een goede vermeerderingsplek voor de micro-organismen. Hier zou primaire aantasting kunnen plaatsvinden en eventuele vermeerdering van de kastanjabacterie kan de epifytische bacterieconcentratie beïnvloeden.

De aanwezigheid van de bacterie in vrucht vraagt om nader onderzoek naar de zaadoverdraagbaarheid van de *Pseudomonas syringae* bacterie (paragraaf 3.1.1).

Kleine verwondingen in de bast zijn voldoende voor de kastanjabacterie om binnen te dringen. Van natuurlijke openingen, zoals lenticellen of poriën, 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 (paragraaf 3.1.2).

Onduidelijk is nog welke bacterieconcentratie minimaal nodig is voor infectie. Informatie hierover is relevant om het risico te kunnen inschatten van de bacterieconcentratie die van nature op de boom en in regenwater voorkomt (zie hierboven). Onderzoek zal worden uitgevoerd naar de ontwikkeling van ziekteproces in een biotoets onder droge en vochtige kasomstandigheden met als accenten: verspreiding van de bacterie vanuit de inoculumplaats in de stam en de minimale bacterieconcentratie die nodig is voor infectie (paragraaf 3.1.3). Ook zal mogelijk blijken waar het verdedigingsmechanisme van de plant in gebreke blijft en hoe op de ziekte ingegrepen kan worden.

In 2007 is onderzoek gestart om vast te stellen of insecten een rol spelen bij de overdracht van de *P. syringae* bacterie. Hiervoor moeten jaarrond insecten worden bemonsterd en gescreend op aanwezigheid van de kastanjabacterie. Dit onderzoek is 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 die kastanjeziekte veroorzaakt. Voortzetting van dit onderzoek is nodig (paragraaf 3.1.4). Met name het voorjaar lijkt een belangrijke periode als de bomen in bloei staan. Bloembezoekende insecten zouden de bacteriën gemakkelijk kunnen oppikken en verspreiden, zeker als blijkt dat de bacterie zich in de bloemen kan vermeerderen.

Wanneer wordt aangetoond dat de kastanjabacterie zich kan verspreiden via regen, zaad en/of insecten zal dit gevolgen hebben voor de beheersstrategie.

3.1.1 Epifytisch onderzoek en zaadoverdraagbaarheid

Doel: Nagaan in hoeverre de *Pseudomonas syringae* bacterie die de kastanjeziekte veroorzaakt algemeen voorkomt op en rond kastanjabomen en in welke concentraties. Tevens wordt onderzocht in hoeverre de ziekte overgedragen kan worden via zaden.

Aanpak:

Epifytisch onderzoek

*Pseudomonas*bacteriën die in 2007 zijn geïsoleerd van bomen en uit regenwater zullen nader worden geïdentificeerd om te kijken of het om de bacterie gaat die de bloedingsziekte veroorzaakt. Verder zullen zieke en gezonde bomen, afspoelend water en regenwater worden bemonsterd om een betrouwbaarder beeld te krijgen van het epifytisch voorkomen van de bacterie. Monsters worden uitgeplaat en verdachte bacteriekolonies worden geïdentificeerd. Ook wordt gekeken naar de concentratie waarin de bacterie voorkomt en de rol van bloemen bij de eventuele vermeerdering van de kastanjabacterie.

Zaad overdracht

Gezonde kastanjevruchten zullen kunstmatig worden besmet, waarna wordt bekeken of en in welke mate de zaailingen ziek worden. Ook kastanjevruchten uit het veld, die zijn verzameld rondom geïnfecteerde bomen en mogelijk een natuurlijke besmetting bij zich dragen, zullen worden opgekweekt om de gezondheidstoestand van de zaailingen te beoordelen.

3.1.2 Natuurlijke invalspooten

Doel: Nagaan of de kastanjabacterie via natuurlijke openingen de plant kan infecteren.

Aanpak:

Infectieproeven met gezonde, onbeschadigde zaailingen, waarbij de stam en/of bladeren regelmatig wordt bespoten met een suspensie van de *Pseudomonas syringae* bacterie. Om te bevorderen dat de lenticellen en huidmondjes opengaan wordt de luchtvochtigheid in de kas gevarieerd. Regelmatige beoordeling van de planten op het ontstaan van infecties moet uitwijzen of de bacterie is binnengekomen via de natuurlijke openingen.

3.1.3 Bestudering van het ziekteproces

Doel:

Bepaling van de minimale bacterieconcentratie die nodig is voor infectie. En het bestuderen van het ziekteproces en de reactie van de plant om aangrijpingspunten te vinden voor de beheersing van de kastanjeziekte.

Aanpak:

Toetsplanten worden geïnoculeerd met verschillende bacterieconcentraties, waarbij de ziekteontwikkeling in de tijd zal worden gevolgd. De volgende vragen zijn daarbij de leidraad:

- Bij welke bacterieconcentratie treedt infectie op?
- Wanneer treden de eerste veranderingen in het geïnfecteerde weefsel op?
- Hoe verloopt de vermenigvuldiging en verspreiding van de bacterie op de plaats van infectie?

De bovengenoemde waarnemingen zullen voor een groot deel met lichtmicroscopische technieken worden uitgevoerd op basis van de in het voorgaande jaar verkregen ervaring. We maken daarbij gebruik van

fixatietechnieken waarbij het plantmateriaal zodanig gepreserveerd wordt dat de cellulaire organisatie zoveel mogelijk intact blijft. Bacteriën zijn in microscopische preparaten met kleuringstechnieken zichtbaar te maken. Het is de verwachting dat een nauwkeurig beeld zal worden verkregen van het gedrag van de plantenweefsels en de bacteriën na infectie.

3.1.4 Overdracht door insecten

Doel: Vaststellen of insecten als vector kunnen fungeren voor de *P. syringae* bacterie.

Aanpak

In dit jaar zullen weer insecten worden verzameld, verdeeld over vier verschillende locaties en op verschillende tijdstippen. Met de gegevens van 2007 en 2008 wordt een "jaarrond-beeld" verkregen. De gevangen insecten zullen worden ingedeeld in families en waar mogelijke / wenselijk worden gedetermineerd. In de insecten zal m.b.v. IF worden gekeken of de *Pseudomonas* bacterie aanwezig is. Een positief signaal zal worden geverifieerd m.b.v. REP-fingerprinting.

3.2 Resistentie

Tot nu toe is in het veld de ziekte voornamelijk bij de *A. hippocastanum* en de *Aesculus x carnea* aangetroffen. In *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 *Aesculus x mutabilis* zijn slechts enkele exemplaren in Nederland aangetroffen en hierin werd geen ziekte gemeld. Het is van belang te weten welke soorten en cultivars van paardenkastanje resistent of minder vatbaar zijn. Uit proeven met losse takken (2007) 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.

Bij de verbruiningsreactie in de bast speelt het polyfenoloxidase-enzym een rol. Uit het fysiologisch onderzoek (2007) 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. Een aantal aspecten van deze toets zal in 2008 verder worden uitgewerkt. 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 paardenkastanje in het openbaar groen. Een snelle kleuringstoets zal ook in het onderzoek gebruikt kunnen worden om inzicht te krijgen in verdedigingsmechanismen, de effectiviteit van remstoffen (paragraaf 3.4) en het ontwikkelen van nieuwe behandelmethoden tegen de kastanjebloedingsziekte.

Uit het onderzoek naar de invloed van groeiplaatsfactoren (2007) en uit de biotoets met zaailingen (2007) zijn diverse aanwijzingen naar voren gekomen dat de aard en ernst van aantasting door de bloedingsziekte mede wordt bepaald door genetische verschillen tussen de individuen van dezelfde 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.

Doel:

- Het onderzoeken van verschillen tussen kastanjesoorten, cultivars en -hybriden in vatbaarheid/gevoeligheid voor de kastanjebloedingsziekte.
- Het ontwikkelen van een eenvoudige kleuringstoets om op eenvoudige wijze de gevoeligheid voor kastanjebloedingsziekte te kunnen toetsen aan takken van *Aesculus*-soorten/cultivars.
- Het bepalen van de genotypische variatie binnen *A. hippocastanum* in gevoeligheid voor de kastanjebloedingsziekte.

Aanpak:

- a. In het onderzoek van 2007 zijn al takken van diverse kastanjesoorten, cultivars en –hybriden geïnfecteerd met *P. syringae*. De waarnemingen aan de symptoomontwikkeling hieraan zal worden voortgezet om de gevoeligheid/vatbaarheid verder documenteren.
Een uitgebreider assortiment van soorten, cultivars en –hybriden moet worden getoetst om een beter beeld van de variatie te krijgen. Hiertoe worden bij voorkeur zaailingen gebruikt. Voor dit doel zijn in het najaar van 2007 al kastanjes verzameld. De jonge zaailingen die hieruit worden opgekweekt zullen eveneens geïnfecteerd worden om de symptoomontwikkeling te volgen. Mocht het niet lukken om voldoende zaailingen op te kweken, dan zal worden overgestapt op het toetsen van de vatbaarheid op losse takken.
Monsters van de zaailingen (of takken) die zijn besmet met *P. syringae* zullen morfologisch worden onderzocht. Met cytologische technieken zal worden vastgesteld waarin de gevoelige soorten verschillen van de ongevoelige soorten voor wat betreft weefselverval en bacterieverbreiding.
- b. Behalve het takmateriaal uit onderdeel a. zal ook in samenwerking met de Hortus van Wageningen Universiteit en op basis van de gegevens uit het standplaatsonderzoek (2007) takken worden verzameld van een groot aantal kastanjesoorten/types/cultivars en kruisingsproducten.
Om een kleuringstoets te genereren, die zo min mogelijk gevoelig is voor storingen, moet van een aantal factoren worden uitgezocht wat de optimale condities zijn, zoals het (tak)monster (locatie, leeftijd), reactietijd voor de kleuring, concentratie catechol-substraat, waarnemingsduur, etc.
Vervolgens wordt bepaald of er een correlatie is tussen de uitslag van de kleuringstest en de symptoomontwikkeling en morfologische reacties uit onderdeel a.
- c. De witte paardenkastanjes in het veld zijn oorspronkelijk allemaal zaailingen die genetisch enigszins van elkaar verschillen. Als het verschil in vatbaarheid tussen bomen (zaailingen) groter is dan tussen genetisch identieke klonen (bijvoorbeeld verschillende waterloten van één boom), dan kan worden geconcludeerd dat er sprake is van genetische variatie in vatbaarheid voor de kastanjabloedingsziekte. In een kasproef zal de symptoomontwikkeling worden bestudeerd in kunstmatig geïnfecteerde waterloten en zaailingen om de verschillen in vatbaarheid in kaart te brengen.

3.3 Biotische factoren

Inleiding

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 (zie paragraaf 3.3.1).

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 (zie paragraaf 3.3.2).

3.3.1 Veiligheid bomen

Probleemstelling

De door de bloedingsziekte veroorzaakte bastwonden vormen een gemakkelijke invalspoort voor houtparasitaire schimmels (houtrot) die de structuur van de boom verzwakken.

De praktijk leert dat veel bomen vroegtijdig worden gekapt omdat de bomen onveilig worden door deze secundaire aantastingen.

Doel en verwacht resultaat

Er zijn sterke aanwijzingen dat vooral bomen met weinig overgroeingsweefsel sneller en heviger worden aangetast door houtrot dan bomen met een grotere mate van wondweefselvorming. Onderzoek naar deze (veronderstelde) aan de hand van dissectie van aangetaste bomen kan hierop een betrekkelijk snel antwoord geven en leidt hoe dan ook tot relevante informatie voor het beheeradvies ten aanzien van het omgaan met aangetaste bomen (i.c. de wijze waarop en het tijdsbestek waarin het moet worden afgevoerd of kan blijven staan). Tevens zal het aanvullend informatie opleveren over de vraag in hoeverre wondcallusvorming mag worden beschouwd als teken van (tijdelijk) herstel van de boom van de bloedingsziekte.

Aanpak

Op basis van eerder uitgevoerde landelijke inventarisaties zal een korte (telefonische) verkenning worden uitgevoerd welke paardekastanjes er op de nominatie staan om in 2008 te verdwijnen. Uit deze groep wordt door een groep deskundige veldwerkers subgroepen met een zo groot mogelijke variatie in aantastingsgraad én aanwezigheid van wondweefselvorming geselecteerd. Deze bomen zullen op nader (in overleg met de groenbeheerder te bepalen) tijdstip in 2008 worden geveld en gedissecteerd, waarbij de in het hout waarneembare wondreacatiezones (CODIT-model, Shigo, USDA) alsmede de mate van wondweefselvorming gedetailleerd in kaart worden gebracht. De data worden vervolgens statistische geanalyseerd op bestaande correlaties.

3.3.2 Kastanjemineermot

Doel:

Nagaan of infectie-incidentie omhoog gaat onder invloed van mineermotinfectie.

Aanpak:

Zaailingen worden in geconditioneerde kassen geïnfecteerd met de kastanjemineermot. Hiervoor wordt geïnfecteerd bladmateriaal gebruikt als inoculum. Door middel van verneveling wordt *P. syringae* geïnoculeerd. De resultaten worden vergeleken met een controlegroep van kastanjezaailingen, die niet geïnfecteerd zijn met de mineermot. Na enkele maanden worden alle planten gescoord op symptomen en infectie door *P. syringae* en wordt het experiment beëindigd.

3.4 Beheersing

Er is onderzoek gedaan naar het effect van remstoffen die het bloedingsreactie van de boom vertragen. In laboratoriumproeven is een aantal remstoffen geselecteerd en getest op kunstmatig besmette zaailingen in de kas. Zieke planten zijn wekelijks besmeerd met ascorbinezuur, cysteïne, citroenzuur en combinaties van deze stoffen. Behandeling met ascorbinezuur (alleen of in combinatie) bleek de ziekteontwikkeling af te remmen. Vanaf 2005 zijn ook zieke kastanjabomen langs de rondweg in Houten behandeld met deze remstoffen. Na een jaar namen de ziekteverschijnselen toe, maar in 2007 was enig herstel te zien, echter ook bij onbehandelde bomen. Hierdoor kan er nog geen eenduidige conclusie worden getrokken over het effect van de remstoffen onder praktijkomstandigheden.

Voortzetting van het onderzoek in biotoetsen (op zaailingen en/of takken onder droge en vochtige omstandigheden) en onder praktijkomstandigheden moet leiden tot beter inzicht in de effectiviteit van de remstoffen en de 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).

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 diverse gemeenten zijn in dit kader al groeiplaatsverbeteringsproeven uitgevoerd of zijn initiatieven ontwikkeld om dit op korte termijn te gaan doen. Gezien de betrekkelijk lange termijn waarop hiervan effecten zijn te verwachten ligt het niet voor de hand om groeiplaatsverbeteringsproeven in het onderzoekprogramma op te nemen. Echter, de proeven die al door een aantal gemeenten zijn uitgevoerd kunnen relevante informatie opleveren voor een meer gericht beheersadvies, indien de effecten systematisch worden beoordeeld en statistisch worden verwerkt. Hierbij is wetenschappelijke ondersteuning vanuit het onderzoek nodig.

3.4.1 Effectiviteit van remstoffen in de kas en in het veld

Doel

Nagaan onder welke omstandigheden, in welke periode en in welke frequentie de toepassing van remstoffen leidt tot vertraging van het ziekteproces.

Aanpak

Omdat het praktisch niet uitvoerbaar is om onder praktijkomstandigheden een groot aantal variaties te testen van behandelingen met de meest succesvolle remstoffen, zal dit worden uitgevoerd in biotoetsen in de kas. Slechts een kleine selectie van de behandelingen kan worden getest onder veldomstandigheden.

Biotoets in de kas

We zullen gebruik maken van een combinatie van zaailingen en takken van volwassen bomen in watercultuur om na te gaan welke van de twee het meest de natuurlijke situatie van volwassen bomen benadert. In 2007 wordt al getest of deze takkentest gebruikt kan worden om het infectieproces te bestuderen.

Infecteren van zaailingen en takken onder kasomstandigheden en uitvoeren van behandelingen met remstoffen. Er zullen verschillende formuleringen, toedieningstijdstippen en –frequenties worden getest. De ziekteontwikkeling en de effectiviteit van de behandelingen zullen worden vergeleken met onbehandelde controleplanten, o.a. met behulp van immunocytologische methoden en door analyse van de polyfenoloxidase-activiteit.

Veldproef

Voortzetting van de monitoring van de veldproef in Houten om het natuurlijk ziekteverloop verder in kaart te brengen en de langere termijn effecten van de behandelingen met remstoffen te bestuderen. Nagegaan kan worden of er verschillen bestaan in de componenten van het verbruiningssysteem tussen behandelde en onbehandelde bomen uit de veldproef van 2005.

Aanvullend zullen zieke bomen eenmalig of periodiek worden behandeld met remstoffen op verschillende tijdstippen om na te gaan op welk moment en in welke frequentie de behandeling het meest effectief is. Gebaseerd op de ervaringen uit voorgaand onderzoek, zullen hiervoor bomen worden geselecteerd met een gelijke mate van lichte aantasting en met een groot aantal herhalingen (bomen) per behandeling. Dit om te voorkomen dat er ongewenste variatie in de resultaten ontstaat door te zwaar aangetaste bomen, waarbij geringe effecten van de remstoffen verwacht mogen worden.

3.4.2 Groeiplaatsverbetering

Doel: Begeleiden groeiplaatsverbeteringsproeven in de praktijk

Aanpak:

Een aantal gemeenten kunnen zich aanmelden wanneer zij groeiplaatsverbeteringsproeven in hun gemeente willen uitvoeren/aanleggen. Aesculaap zal bekijken of de in te zetten proeven wetenschappelijk voldoende onderbouwd zijn zodat de resultaten onderling beter te vergelijken zijn.

4 Internationale samenwerking

Door meerdere landen wordt melding gemaakt van het voorkomen van de kastanjeziekte. Om deze reden is in 2006 een internationale bijeenkomst gehouden in Utrecht. Hierbij waren verschillende landen vertegenwoordigd, België, Duitsland, Engeland en Italië. In deze bijeenkomst heeft ieder de ernst en omvang van de kastanjeziekte voor zijn of haar land geschetst en is eventueel lopend onderzoek besproken. Tevens is er gekeken naar samenwerkingsverbanden. De intentie is om deze bijeenkomst dit jaar weer te houden. Het doel is de stand van zaken op dit moment in ieder land helder te krijgen, resultaten van lopend onderzoek uit te wisselen en op elkaar aan te sluiten.

5 Producten

- Praktijk managementadvies voor gemeenten en groenbeheerders om de kastanjeziekte te beheersen/bestrijden op basis van de tot dan behaalde resultaten.
- Verslag van onderzoek 2008 van de verschillende onderzoeksrichtingen om te komen tot mogelijke oplossingen om de ziekte te beheersen of te voorkomen.
- Lezingen o.a. voor gemeenten
- Vakbladartikelen over de resultaten 2007/2008;
- Actuele informatie (onderzoek, advies) middels nieuwsbrieven en website: www.kastanjeziekte.wur.nl
- Vakbladartikel(en), poster en/of toelichtingen tijdens bijeenkomsten en open dagen;
- Media presentaties, dagbladen, radio en televisie (landelijk en regionaal)

6 Tijd en kosten

De kosten van het hier gepresenteerde onderzoeksplan "Behoud de kastanje, deel 3" bedragen € 241.095,- excl. BTW.

In dit plan is rekening gehouden met prioritering van onderzoeksrichtingen, waarbij de meest kansrijke en wetenschappelijk onderbouwde onderzoeken zijn gekozen. Veel onderzoeken lopen gelijktijdig zodat wederzijdse interacties mogelijk zijn met als doel om snel resultaten te boeken.

Maand Onderwerp	jan	feb	mrt	apr	mei	juni	juli	aug	sep	okt	nov	dec
Epidemiologie Epifytisch Invalspoorten Ontw. Ziekteproces Overdracht insecten				x	x	x	x	x	x			
Resistentie				x	x	x	x	x	x	x	x	
Biotische factoren Kastanjemineermot Veiligheid bomen				x	x	x	x	x	x	x	x	
Beheersing Remstoffen veld en kas Groeiplaatsverbetering				x	x	x	x	x	x	x	x	
Internat. bijeenkomst				x	x	x	x	x	x	x		
Toetsplantensysteem		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Communicatie	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
Programma-coördinatie	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx