

Eindrapport

Onderzoeksprogramma

"Red de kastanje voor
Nederland"



Werkgroep Aesculaap, november 2005, Boskoop

© 2005 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

Programmacoördinator: Dr. Ir. M.W.C. Dijkshoorn-Dekker
Hoofdprojectleider onderzoek: Ir. A.J. van Kuik
Wageningen UR
Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Adres : Rijneveld 153, 2771 XV Boskoop
: Postbus 118, 2770 AC Boskoop
Tel. : 0172 - 236700
Fax : 0172 - 236710
E-mail : kastanjeziekte@wur.nl

Voorwoord

Eind 2004 bleek een mysterieuze bloedingsziekte in Nederland onder paardenkastanjes op grote schaal om zich heen te grijpen. De eerste verschijnselen werden overigens al in 2002 geconstateerd.

Onderzoeksinstellingen, gemeenten en andere organisaties, die professioneel betrokken zijn bij de zorg voor de bomen in Nederland, maakten zich grote zorgen over deze tot dan onbekende ziekte en hebben daartoe hun krachten gebundeld in de werkgroep Aesculaap¹. De minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit heeft in april aan de werkgroep Aesculaap opdracht gegeven tot een onderzoek naar de oorzaak van de bloedingsziekte en naar de ernst en omvang van de ziekte in Nederland. Dit rapport is de weerslag van dat onderzoek.

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: het Ingenieursbureau Amsterdam, de Plantenziektenkundige Dienst van het Ministerie van LNV, het onderzoeksinstituut Alterra van Wageningen UR, het Centraal Bureau voor Schimmelcultures en de gemeenten Den Haag, Utrecht, Haarlemmermeer en Houten. Aan 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.

Boskoop, 15 november 2005

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
Aanbevelingen voor vervolgonderzoek	9
1 Inleiding	11
2 Programma-organisatie Aesculaap	13
2.1 Opdrachtgever en stuurgroep.....	13
2.2 Programmacoördinatie	13
2.3 Het onderzoeksteam	14
2.4 De onderzoeksprojecten	14
2.5 Het communicatieteam	14
3 Literatuuronderzoek	15
4 Parasitair onderzoek	17
4.1 Fytopathologisch onderzoek aan de kastanjeziekte.....	17
4.1.1 Monstername.....	17
4.1.2 DNA-extractie.....	18
4.1.3 Moleculair onderzoek schimmels	18
4.1.4 Moleculair onderzoek op <i>Phytophthora</i>	19
4.1.5 Moleculair onderzoek bacteriën	19
4.1.6 Virologisch onderzoek	23
4.1.7 Fytoplasma-onderzoek.....	24
4.1.8 Viroiden onderzoek.....	25
4.1.9 Conventioneel diagnostisch onderzoek op schimmels, bacteriën en aaltjes	26
4.1.10 Fytopathologisch veldonderzoek.....	28
4.2 Verspreidingsmechanismen.....	29
5 Niet-parasitair onderzoek	31
5.1 Celbiologische en anatomische karakterisering bloedingsziekte.....	31
5.2 Fysiologisch onderzoek aan de bloedingsziekte	34
6 Inventarisatie en groeiplaatsonderzoek	43
6.1 Landelijke verspreiding van bloedende paardenkastanjabomen.....	43
6.2 Groeiplaatsonderzoek paardenkastanjabomen	45
7 Communicatie	47
Bijlagen	Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.

Samenvatting

De bloedingsziekte in paardenkastanje (*Aesculus* spp.) is een nationaal en mogelijk internationaal probleem in het stedelijk groen, bossen en boomteeltsector. Werkgroep Aesculaap is voorjaar 2005 een onderzoeksprogramma gestart, breed van opzet en oriënterend van karakter. Dit onderzoeksprogramma heeft als doel het opsporen van de oorzaak van de ziekte en het vaststellen van ernst en omvang van de ziekte in Nederland. De aanpak van het programma is er op gericht zo snel mogelijk de juiste oplossingsrichting voor de kastanjeziekte te bepalen. Hiertoe zijn eerst de meest kansrijke en wetenschappelijk onderbouwde onderzoekssporen onderzocht.

Via een literatuuronderzoek is de werkgroep op zoek gegaan naar meer informatie over de ziektesymptomen of vergelijkbare ziekte- en schadebeelden. De aantasting, die zich nu voordoet in de kastanje (*Aesculus*) bleek niet eerder te zijn beschreven in de wetenschappelijke literatuur. Er zijn op grond van de literatuurgegevens vier typen aftakelingsziekten bij bomen te onderscheiden, maar er is niet éénduidig naar voren gekomen tot welk type de kastanjeziekte behoort.

Parasitair onderzoek

Naast het literatuuronderzoek heeft de werkgroep parasitair en niet-parasitair onderzoek verricht. In het parasitaire onderzoek is gekeken of de bloedingsziekte (mede) veroorzaakt werd door een micro-organisme (schimmel, bacterie, virus, viroïde, aaltje, fytoplasma). Uit moleculair onderzoek kwam naar voren dat het onwaarschijnlijk is dat een schimmel de oorzaak is van de bloedingen. De symptomen van de bloedingsziekte in paardenkastanje lijken sterk op de symptomen die worden veroorzaakt door de pseudoschimmel *Phytophthora*. Echter moleculair onderzoek heeft geen *Phytophthora* kunnen aantonen. Wel is er, na DNA-analyse van zieke bomen verspreid over Nederland, een bacterie aangetoond welke tevens kon worden geïsoleerd. De aanwezigheid van deze bacterie, behorend tot de groep *Pseudomonas syringae*, is duidelijk geassocieerd met het ziektebeeld. Uit een eerste infectieproef bleek dat jonge zaailingen van kastanje, waarop de gevonden bacterie was aangebracht via injectie en snijwonden op de stam, exudaten (bloeding) en necrose (afgestorven plekken) vertoonden. Kunstmatige infectie van grotere kastanjabomen moet het wetenschappelijke bewijs leveren of deze bacterie dé veroorzaker is.

Zowel in kastanjabomen zonder, als met bloedingsverschijnselen kon met behulp van electronenmicroscopie een Closterovirus worden aangetoond. Het is nog niet duidelijk of dit virus een rol speelt in het ziekteproces. Dit zal nader onderzoek moeten uitwijzen. Een mogelijke verspreiding van pathogene virussen door de kastanjemineermot en koningsdopluis, die in verband kunnen worden gebracht met de kastanjeziekte, kon in dit onderzoek niet worden aangetoond. Tevens zijn er geen indicaties naar voren gekomen dat fytoplasma's (gespecialiseerde bacteriën zonder celwand) evenals viroïden (virussen zonder eiwitkapsel) een rol spelen in de bloedingsziekte van paardenkastanjabomen. Uitvoering van het conventionele diagnostische onderzoek heeft niet geleid tot het aanwijzen van een mogelijke veroorzaker in bacteriën, schimmels en nematoden. Het is nog te vroeg conclusies te trekken over nog lopend fytopathologisch veldonderzoek, waarbij op verschillende locaties infectieproeven worden uitgevoerd op 'gezonde' kastanjes.

Niet-parasitair onderzoek

Het niet-parasitair onderzoek heeft zich gericht op houtanatomische en fysiologische achtergronden. Uit cytologisch en anatomisch onderzoek van bloedingsplekken bleek dat aangetaste delen altijd afgestorven bastweefsel bevatten. Als de aantasting niet tot het cambium was doorgedrongen, kon dat cambium nog steeds nieuw vaatweefsel vormen, maar als ook het cambium en eventueel het onderliggende hout was aangetast, was herstel ter plaatse niet meer mogelijk. De paardenkastanje heeft tegen het afsterven van het bastweefsel ook een afweerreactie door vorming van nieuwe afsluitingsweefsels. Het lijkt erop dat de boom op deze wijze probeert uitbreiding van de ziekte te belemmeren. Een aangetaste boom heeft ondanks de aantasting nog steeds het vermogen om voedingsstoffen door de stam te transporteren zolang de bast niet over de gehele omtrek van de stam is aangetast.

Onafhankelijk van de vraag welke ziekteverwekkers de bloedingsziekte in paardenkastanjes initiëren, is het

van belang om fysiologische en biochemische processen in en rond de 'wonden' tot stilstand te brengen. Duidelijk is geworden dat in de kastanjabast de verschillende componenten van het polyfenoloxidase-verbruiningsreactie-systeem actief zijn en dat het mogelijk is om in deze reacties in te grijpen. Een aantal remstoffen met weinig te verwachten neveneffecten (ascorbinezuur, citroenzuur, cysteïne, NaF) zijn getest op laboratoriumschaal en bleken in staat om de verbruiningsreactie geheel of gedeeltelijk te blokkeren. Deze stoffen zijn vervolgens ook in het veld op zieke kastanjabomen getest in verschillende concentraties en combinaties en met behulp van verschillende toedieningstechnieken. Het is nog te vroeg om conclusies te trekken, de proef wordt vervolgd en komend voorjaar moet daarin meer inzicht komen.

Ernst en omvang bloedingsziekte in Nederland

Een landelijke inventarisatie van de bloedingsziekte onder gemeenten laat zien dat de ziekte voorkomt in heel Nederland. De grootste aantallen zieke bomen staan in de provincies Zuid Holland, Noord Holland, Utrecht en Noord-Brabant. *Aesculus hippocastanum* en de cultivars daarvan worden het meest aangetast (31-45%), gevolgd door *A. x carnea* en haar cultivars (13-28%). De overige *Aesculus* soorten komen veel minder voor, maar incidenteel is ook aantasting gemeld in *A. pavia* en *A. flava*. De bloedingsziekte komt het meest voor in bomen met een diameter groter dan 20 cm; in alle diktecategorieën boven deze maat is het aantastingspercentage meer dan 30%. Het grootste aantal zwaar aangetaste bomen komt voor in de categorie 20-35 cm (25%). Tevens wordt de ziekte gemeld op alle bodemsoorten, maar op zand (aantastingspercentage 25%) komt ze minder voor dan op klei of veen (elk 35%). Hieruit kan echter niet zonder meer de invloed van de grondsoort op de ontwikkeling van de ziekte worden afgeleid, omdat ook de geografische ligging invloed kan hebben op het ziektebeeld. Veel meldingen komen uit gebieden waar overwegend veen- en kleigronden (en geen zandgronden die men ter onderlinge vergelijking zou kunnen gebruiken) van nature voorkomen. De mogelijke invloed van overige standplaatsfactoren (watervoorziening, wateroverlast, onderbegroeiing) kwam uit de inventarisatie onvoldoende eenduidig naar voren. Nog uit te voeren groeiplaatsonderzoek kan mogelijk meer inzicht geven in eventuele correlaties tussen het voorkomen van het aantastingsbeeld en diverse groeiplaatskenmerken, evenals de conditie van de bomen.

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

Communicatie

Sinds begin van dit jaar heeft de werkgroep Aesculaap veel aandacht besteed aan actieve externe communicatie. Directbetrokkenen zijn geïnformeerd via een regelmatig verschijnende nieuwsbrief. Verder onderhoudt de werkgroep een eigen website, www.kastanjeziekte.wur.nl, waarop uitgebreide en actueel gehouden informatie is te vinden. Behalve belanghebbenden, zoals gemeenten, bezoekt het grote publiek deze website met grote regelmaat (enkele duizenden bezoekers per maand). De belangstelling en de zorg bij het publiek blijkt ook uit de honderden e-mails en telefoontjes die het projectteam van de zijde van particulieren hebben bereikt. De meeste communicatie verloopt via de media. Kranten, radio en televisie blijken grote belangstelling te hebben voor de kastanjeziekte en het onderzoek daarnaar. Dat blijkt uit de bijna 300 krantenartikelen die sinds 1 januari 2005 over dit onderwerp zijn verschenen en uit de tientallen radio- en tv-uitzendingen waarin aan de ziekte aandacht is besteed. Daarbij is meestal de programmacoördinator als woordvoerder opgetreden.

Aanbevelingen voor vervolgonderzoek

Vervolgonderzoek aan *Pseudomonas*

In het uitgevoerde oriënterende onderzoek naar de oorzaak van de bloedingsziekte komt naar voren dat een bacterie uit de *Pseudomonas syringae*-groep duidelijk is gerelateerd aan de bloedingsziekte.

Vervolgonderzoek naar het infectie- en ziekteproces en de verspreiding is noodzakelijk voor het vinden van een bestrijdingsstrategie.

Noodzakelijk onderzoek is het bevestigen van de postulaten van Koch (het aantonen dat de *Pseudomonas*-bacterie de veroorzaker is van de bloedingsziekte). Inmiddels is een start gemaakt met een inoculatieproef met verschillende bacteriestammen op een gemeentekwekerij bij jonge bomen. De ontwikkeling van eventuele ziekteverschijnselen wordt gevolgd. Gelijktijdig wordt aanbevolen om cel- en weefselonderzoek van geïnfecteerde bomen en aanwezigheid van bacteriën uit te voeren.

Modelsysteem

Het opzetten van een modelsysteem is de basis van vervolgonderzoek aan *Pseudomonas*.

Met een model- of toetsstelsel kan de bloedingsziekte op reproduceerbare wijze worden geïnduceerd.

Daarnaast kan met behulp van een toetsstelsel de bloedingsziekte zorgvuldig worden bestudeerd in al zijn aspecten, fytopathologie, morfologie en fysiologie, maar vooral ook in onderlinge samenhang.

Met een modelsysteem kunnen naast bestrijdingsmiddelen en remmingsmiddelen die de bruiningsreactie kunnen stoppen, ook antagonisten worden getoetst op hun werking tegen de bloedingsziekte.

Beheersing en bestrijdingsstrategieën

Onderzoek naar de verspreidingswijze (vectoren) is noodzakelijk om de bestrijding ter hand te kunnen nemen. Wanneer duidelijk wordt dat de gevonden *Pseudomonas*-bacterie inderdaad de veroorzaker is van de kastanjeziekte, zal onderzoek moeten worden gedaan naar de verspreidingswegen, infectieroutes en andere factoren, die bijdragen aan de ziektedrukverhoging. De noodzaak van onderzoek naar de bestrijding is evident.

Met deze kennis kan een effectief praktijkadvies gegeven worden: hoe om te gaan met de kastanjeziekte.

Voortgang buitenproef in Houten

De bomen die zijn behandeld met remmingsmiddelen zullen verder gevolgd moeten worden in 2006.

Waarnemingen in het voorjaar 2006 aan stam en kroon van de behandelde bomen moeten duidelijk maken of en welke behandelingen de bruiningsreactie van bomen in het veld kunnen stoppen/doen afnemen.

Afhankelijk van de resultaten, is het zinvol met bepaalde behandelingen door te gaan in het voorjaar en wellicht (ook) andere concentraties en combinaties te testen. Laboratoriumproeven kunnen daarbij perspectievolle richtingen aangeven.

Waardplantonderzoek

Uit het inventariserend onderzoek is gebleken dat vooral de witte en rode paardenkastanje is aangetast. Bij de rode en gele pavia (*Aesculus pavia* en *A. flava*) is het aantal aangetaste bomen opvallend laag.

Aanbevolen wordt om met dit gegeven binnen de *Aesculus*-soorten resistentieonderzoek te starten. Door genetische selectie van weinig of niet vatbare soorten kan voor de lange termijn een gezonde cultivar worden gevonden.

Verdedigingsmechanismen

Bij de zieke paardenkastanjabomen lijken de verdedigingsmechanismen te zijn aangetast, waardoor er bloeding ontstaat. Waarom dit zo sterk optreedt bij de aangetaste kastanjes, is nog onbekend. Het antwoord hangt mede af van de veroorzaker: is deze veroorzaker (een *Pseudomonas*?) een relatief nieuw pathogeen voor kastanje waartegen de 'normale' verdediging niet werkt, of is de kastanje door andere (stress?)-condities verzwakt waardoor een 'overmatig' sterke reactie optreedt? Mogelijk speelt een combinatie van factoren een rol. Wanneer één of meerdere van deze verdedigingsmechanismen niet goed werkt, dan krijgt het proces de kans zich verder uit te breiden.

De vraag blijft dan wel waarom de verdedigingsmechanismen in de kastanje niet goed functioneren. Een voor de hand liggende volgende stap zou daarom zijn om de achtergrond hiervan nader te onderzoeken, waarbij het testen van ziekgemaakte bomen (jonge bomen/zaailingen) in een modelsysteem een belangrijke stap zou kunnen zijn, nu het pathogeen mogelijk bekend is.

Onderzoek naar stressfactoren

Onderzoek naar stressfactoren is belangrijk om (relatieve) invloed van andere mogelijke factoren vast te stellen in verband met lokale beheersmaatregelen.

Uit het oriënterende onderzoek is gebleken dat het Closterovirus zowel in gezonde als zieke kastanjabomen voorkomt. Vervolgonderzoek zal moeten aantonen of dit virus een van de stressfactoren is die een rol speelt in het aftakelingsproces van de paardenkastanjes.

Uit het inventariserend onderzoek is gebleken dat a-biotische factoren een rol lijken te spelen.

Het is niet uitgesloten dat een combinatie van a-biotische factoren rechtstreeks bloeding kan veroorzaken of de boom zo verzwakt dat gelegenheidspathogenen kunnen toeslaan. A-biotische factoren die in combinatie een rol kunnen spelen zijn: sterke afname van de hoeveelheid bladmassa door (forse) snoei, aantasting door de kastanjemineermot, een standplaats waar (grond)water in ruime mate voorhanden is of klimaatsomstandigheden als droge zomers of natte, zachte winters. A-biotische factoren zijn nog onvoldoende onderzocht en verdienen daarom meer aandacht.

Het toetsen van het effect van bodemverbeterende behandelingen op de bloedingsziekte verdient nader onderzoek.

1 Inleiding

De paardenkastanjabomen (*Aesculus* spp.) in Nederland worden bedreigd door een onbekende bloedingsziekte. De ziekte blijkt snel om zich heen te grijpen en het lijkt erop dat als er geen actie wordt ondernomen, grote schade ontstaat. Beeld- en sfeerbepalende kastanjabomen zullen verdwijnen uit stads- en gezichten en het landschap. Vanaf de eerste berichten dat de kastanjeziekte zich op grote schaal voordoet in Nederland is gebleken dat onder de media en het grote publiek 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.

In de zomer van 2002 kwamen uit Noord- en Zuid Holland en Friesland meldingen binnen van bruine plekken op de stam. Zieke bomen blijken plekjes te hebben op de stam waar bruin vocht uit loopt. In een later stadium barst de bast open en kan de boom uiteindelijk doodgaan. In 2004 is geconstateerd dat vele duizenden paardenkastanjes in het gehele land zijn aangetast door deze ziekte.

De werkgroep Aesculaap is opgericht toen duidelijk werd dat de onbekende bloedingsziekte bij paardenkastanjes een landelijk probleem werd. De werkgroep coördineert acties rond de onbekende aantasting in de kastanje. Door krachtenbundeling van verschillende expertises wil de werkgroep de oorzaak zo snel mogelijk achterhalen en een strategie ontwikkelen om het probleem te beheersen.

Bloedingsziekte bij bomen wordt vaak geassocieerd met een schimmelaantasting (*Phytophthora*), maar kan vele (niet-)parasitaire oorzaken hebben. Uniek aan de bloedingsziekte in de paardenkastanje is dat de ziekte binnen een relatief kort tijdsbestek op deze grote schaal voorkomt. In de afgelopen jaren zijn er ervaringen opgedaan met onderzoek naar deze ziekte, voornamelijk via klassieke isolatiemethoden op schimmels en bacteriën. Dit onderzoek heeft tot op heden geen resultaten opgeleverd, wat noodzaakt tot een bredere aanpak van het probleem.

In het voorjaar van 2005 is een onderzoeksprogramma gestart, dat breed van opzet en oriënterend van karakter is. Dit onderzoeksprogramma heeft als doel het onderzoeken van de bloedingsziekte en het achterhalen van de oorzaak van de ziekte. De aanpak van het programma is erop gericht om zo snel mogelijk de juiste oplossingsrichting voor de kastanjeziekte te bepalen. Hiertoe is onderzoek in verschillende richtingen ingezet.

Opbouw van het rapport

In dit eindrapport wordt de stand van zaken gepresenteerd betreffende het onderzoek naar de oorzaak van de kastanjeziekte. De programmaorganisatie voor de uitvoering van het onderzoek is beschreven in hoofdstuk 2.

Eerst is er een uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd naar deze ziektesymptomen of vergelijkbare ziekte/ schadebeelden (hoofdstuk 3). Dit kan leiden tot een betere onderbouwing van de verschillende onderzoeksrichtingen.

Vervolgens worden in hoofdstuk 4 de resultaten van het parasitaire onderzoek beschreven. Dit onderzoek omvat zowel het 'traditionele' als moleculair fytopathologisch onderzoek naar een micro-organisme (schimmel, bacterie, virus, viroïde, fytoplasma) dat de (mede)veroorzaker kan zijn van de bloedingsziekte. Tevens wordt aandacht gegeven aan een mogelijk verband tussen de ziekte en de paardenkastanjemineermot, die de laatste jaren als grote plaag voorkomt.

Het niet-parasitaire onderzoek (hoofdstuk 5) heeft zich geconcentreerd op anatomische en cellulaire verschillen tussen aangetast en niet aangetast bast- en houtweefsel.

Tevens zijn de fysiologische en biochemische processen, die in en rond de aantastingen spelen bestudeerd

en zijn wondafdekkende middelen en sprays getoetst die het ziekteproces mogelijk kunnen remmen.

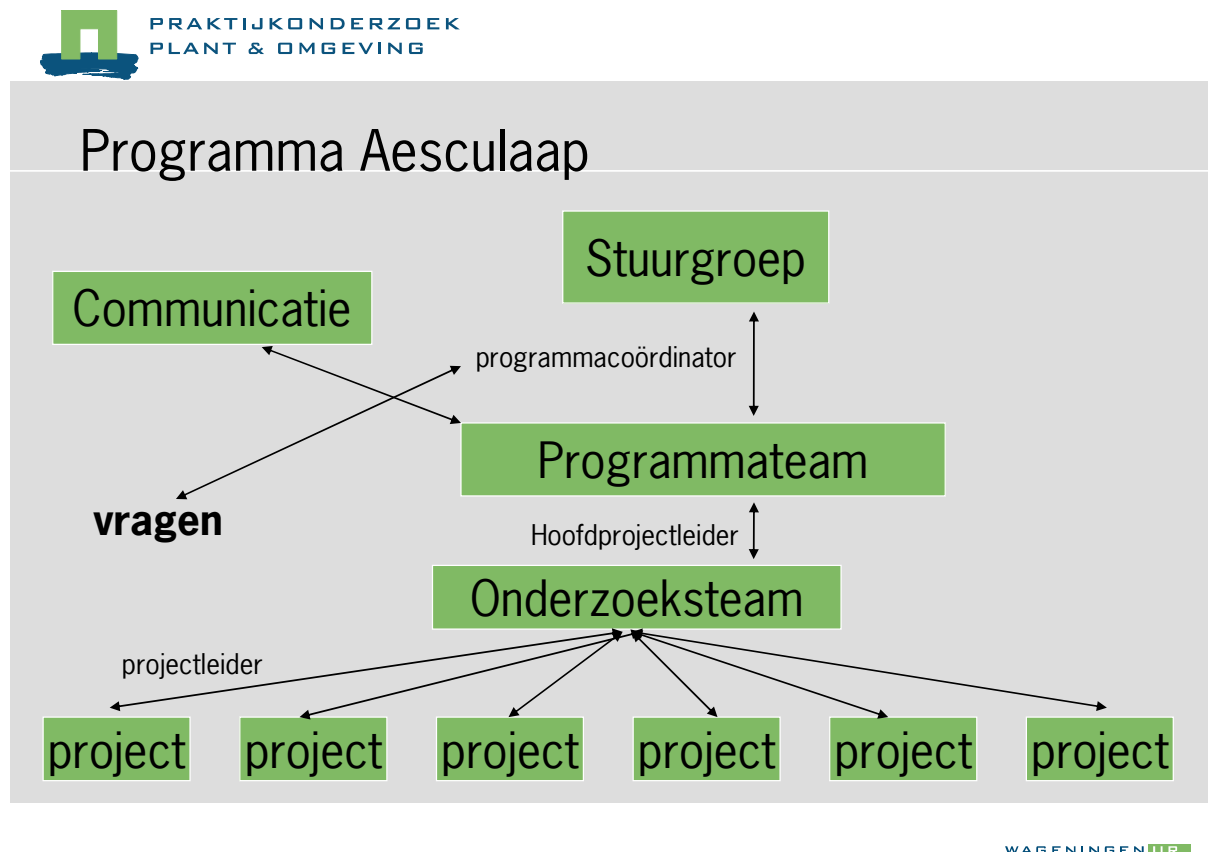
Een landelijke inventarisatie is uitgevoerd om een goede indruk te krijgen van de aard, ernst en omvang van de ziekte (hoofdstuk 6). Slechte groeiplaats situaties en (droogte)stress, al dan niet in combinatie met luchtverontreiniging, dragen bij aan het kwetsbaarder worden voor een aantasting. Bestudeerd is of er correlaties te vinden zijn tussen diverse groeiplaatskenmerken en het voorkomen van het aantastingsbeeld en de onbekende bloedingsziekte in paardenkastanjabomen.

Communicatie van de onderzoeksresultaten wordt beschreven in hoofdstuk 7.

Alle bevindingen van dit oriënterend onderzoek zijn gebruikt om te komen tot aanbevelingen voor vervolgonderzoek.

2 Programma-organisatie Aesculaap

De programmaorganisatie is schematisch weergegeven in figuur 1.



Figuur1: Programma-organisatie

2.1 Opdrachtgever en stuurgroep

Het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV), directie Natuur is als opdrachtgever tevens eigenaar van dit programma. De stuurgroep is tijdens de uitvoering van dit onderzoeksprogramma nog niet ingericht. In een vervolfase van dit programma is het van belang dat strategische afwegingen omtrent de koers van het onderzoek gemaakt kunnen worden in een stuurgroep, waar naast het ministerie bijvoorbeeld ook VNG in deelneemt. De programmacoördinator heeft tot nu toe haar verantwoording rechtstreeks afgedragen 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 programmaplanning 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 : Nico de Vos
- hoofdprojectleider Onderzoek (PPO) : Fons van Kuik
- onderzoeker (CBS) : Arthur de Cock
- onderzoeker (Alterra) : Jitze Kopinga
- projectleider Fytopathologie (PD) : Hans de Gruyter
- projectleider Inventarisatie (IBA) : Bart Stoffer

Het programmateam is in totaal 6 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:

Ir. Fons van Kuik (PPO), Ir. Jitze Kopinga (Alterra), Hans de Gruyter (PD), Dr. Arthur de Cock (CBS), Dr. Joop van Doorn (PPO), Dr. Arjen Speksnijder (PRI), Ing. Martin Verbeek (PRI), Ing. Ko Verhoeven (PD), Dr. Jaap Janse (PD), Dr. André van Lammeren (Laboratorium Plantencelbiologie, Botanisch Centrum, WUR), Prof. Dr. Linus van der Plas, (Leerstoelgroep Plantenfysiologie WUR), Leo Slingerland (PPO), Dr. Ir. Ria Weijnen-Derkx (PPO), Bart Stoffer (IBA), Dr. Ir. Jelle Hiemstra (PPO), Ing. Ko Verhoeven, (PD)

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 6 projecten:

Literatuuronderzoek, fytopathologie, verspreidingsmechanismen, houtanatomie, fysiologie, inventarisatie en standplaatsonderzoek.

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. In een later stadium is ook de PD erbij betrokken: Manon Leenders.

Samenstelling communicatieteam:

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

3 Literatuuronderzoek

Projectleider: Ir. Fons van Kuik (PPO)

Projectmedewerkers: Ir. Jitze Kopinga (Alterra), Hans de Gruyter (PD)

De paardenkastanjabomen in Nederland worden bedreigd door een onbekende bloedingsziekte. Voor een gerichte aanpak is het belangrijk dat eerdere meldingen van bloedende bomen in de literatuur worden opgespoord. Daartoe is een uitgebreid literatuuronderzoek naar vergelijkbare aantastingen in andere bomen uitgevoerd.

Doel

Kennisvergaring van oorzaken en/ of veroorzakers van bloedingsziekten in bomen.

Aanpak

Een literatuursearch is uitgevoerd door de Bibliotheek van Wageningen UR. De literatuursearch is met behulp van een reeks trefwoorden uitgevoerd. Er is gezocht in de data bases: TreeCD 39-72; Scopus; CAB abstracts vanaf 1972. Daarnaast zijn artikelen aangedragen door vakgenoten, o.a. Prof. Dr. Josef Bauch, Universiteit van Hamburg.

Resultaat

Uit de verzamelde literatuur werd slechts één vakbladartikel gevonden waarin melding wordt gemaakt van dezelfde bloedingsverschijnselen in paardenkastanjabomen. In PHM-Revue Horticole novembre 2004 no 463 blz. 52 – 54, beschrijven de auteurs Pierre Aversenq en Philippe Rousseau verschijnselen van de bloedingsziekte die eind 2001 werden gezien in Noord-Frankrijk en de regio Brussel. De auteurs concluderen dat de beschreven symptomen niet zijn thuis te brengen en dat er is geen vermelding in de literatuur is gevonden.

De aantasting, die zich nu voordoet in de kastanje (*Aesculus*), is niet eerder beschreven in de wetenschappelijke literatuur. In de literatuur kunnen vier typen aftakelingsziekten bij bomen worden onderscheiden:

1. Chronische irritatie door één oorzaak. Voorbeeld: zoutschade bij de suikeressdoorn of luchtverontreiniging bij naaldbomen.
2. Secundaire aantasting na (zware) verwonding. Voorbeeld: honingzwam of houtboorder.
3. Chronische irritatie door meerdere oorzaken. Dit vermindert de weerbaarheid met als indirect gevolg een aftakeling van de boom. Voorbeeld: bomen zijn gevoeliger voor *Phytophthora* als er weinig ruimte is voor de wortels.
4. Groepsgedrag bij bomen van dezelfde leeftijd. Voorbeelden: voortijdige afsterving in reactie op stress, watertekort tijdens het groeiseizoen biedt kansen voor insecten en schimmels.

Voor aftakelingstype 1 zijn geen directe aanwijzingen gevonden. De verspreiding van de bloedingsziekte is groot en de groeiplaatscondities variëren sterk. Echter de invloed van luchtverontreiniging of van een temperatuurschok tijdens een gevoelige periode van de kastanjeboom zou een rol hebben kunnen spelen in de wijd verbreide aantasting.

Er worden wel steeds meer secundaire aantasters gevonden in zieke paardenkastanjes. Aangezien ook vele bomen ziek zijn die geen last hebben gehad van verwondingen komt aftakelingsziekte 2 te vervallen.

De kastanjabomen kunnen last hebben van aftakelingstype 3. Een of meerdere irritaties kunnen een rol spelen in een verminderde weerstand. Te denken valt aan het massale voorkomen van de kastanjemineermot. Verder in dit rapport wordt ook melding gemaakt van het voorkomen van een

Closterovirus bij de kastanjabomen. Het is niet duidelijk welke rol dit virus speelt. Een verandering van de grondwaterstand kan ook een chronische irritatie opleveren.

Aftakelingstype 4 is afgeleid van type 3. De meeste zieke kastanjabomen vallen in de categorie halfwas. In de zomer van 2003 was er grote droogte en waterstress bij heel veel bomen. Dit kan de trigger zijn geweest voor het massaal optreden van een algemeen voorkomend micro-organisme dat onder 'normale' omstandigheden bomen niet kan aantasten, maar onder speciale omstandigheden wel. Verder in dit rapport wordt melding gemaakt van een bacterie die een rol speelt in het ziekteproces. Deze bacterie zou zijn kans gegrepen kunnen hebben na het optreden van een stressfactor.

Genoemde voorbeelden zijn hypothesen en moeten nog worden getoetst.

Conclusie

Gezien de beperkte ervaringen met de bloedingsziekte kan nog niet exact gezegd worden welk type aftakeling geldt voor de kastanjeziekte. De aftakelingsziekte van paardenkastanbomen kan het gevolg zijn van een chronische irritatie door één of meerdere oorzaken of het gevolg zijn van een stressfactor, waarna een micro-organisme zijn kans grijpt.

4 Parasitair onderzoek

4.1 Fytopathologisch onderzoek aan de kastanjeziekte

Projectleider: Hans de Gruyter (PD)

Projectmedewerkers: Dr. Arthur de Cock (CBS), Dr. Joop van Doorn (PPO), Dr. Arjen Speksnijder (PRI), Ing. Martin Verbeek (PRI), Ing. Ko Verhoeven (PD), Dr. Jaap Janse (PD)

Uit zieke bomen zijn monsters genomen, die uitgebreid werden onderzocht op aanwezigheid van schimmels, bacteriën, virus, viroïden en fytoplasma's. Grondmonsters werden genomen voor onderzoek op aanwezigheid van plantenparasitaire aaltjes. Daarnaast is bij aanvang van het onderzoek op drie locaties een infectieproef ingezet om te bepalen of met houtponsjes, genomen uit aangetaste stamdelen, symptomen op gezonde stamdelen konden worden opgewekt. In een later stadium zijn infectieproeven ingezet met reïncultures van bacterie-isolaten, verkregen uit aangetaste bomen.

Doel

Door middel van biologische, biochemische en DNA technieken alsmede infectie-experimenten onderzoeken of er sprake is van een pathogeen, die deze bloedingsziekte veroorzaakt in paardenkastanje.

4.1.1 Monstername

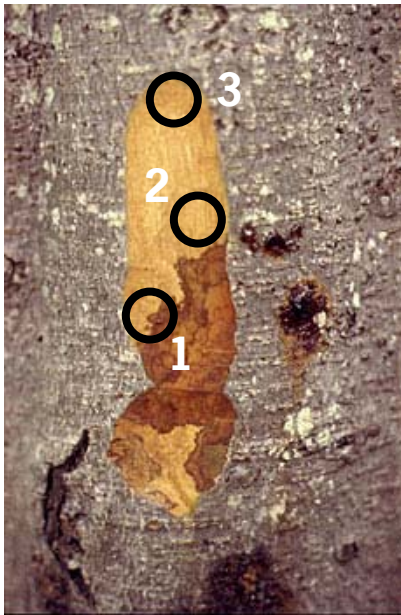
Op vier geselecteerde locaties, verspreid over Nederland, zijn monsters genomen van aangetaste en gezond ogende paardenkastanjabomen. Als locatie is gekozen voor de gemeenten Burgum, Geleen, Hoofddorp en Houten.

De monstername werd in twee fasen uitgevoerd. Begin april 2005 zijn monsters genomen van hout- en bastweefsel uit en rondom verse bloedende plekken t.b.v. DNA-analyse. Tegelijkertijd werden twijgmonsters en grondmonsters genomen.

Begin mei 2005 werden bloesem-, blad- en wortelmonsters genomen t.b.v. het isoleren en/of aantonen van mogelijke plantenpathogenen door middel van diverse technieken. De monsters werden direct na monstername verdeeld over de verschillende onderzoeksinstituten voor detectie onderzoek. De blad-, bloem-, stam-, wortel- en grondmonsters werden genomen volgens beschreven protocollen.

Als voorbeeld het protocol van het nemen van de stammonsters:

Per locatie worden van drie zieke en één gezonde boom stammonsters genomen met behulp van een 13 mm holpijp, waarbij eerst de kurklaag verwijderd wordt met een mesje. Per zieke boom worden monsters genomen op aangetaste plekken tussen de stambasis en 40 cm hoogte én op aangetaste plekken tussen 120 en 180 cm. Van elke monsterhoogte worden drie monsters genomen (figuur 2).



Figuur 2: Monsternames uit stam. Monsters worden genomen uit het verkleurde bastweefsel op het grensvlak ziek-gezond (1), aangrenzend aan een aangetaste plek (2) en gezond ogende bast op enige afstand van de verkleuringen (3).

Tevens wordt er een monster genomen van een niet aangetaste kastanje van elke hierboven genoemde hoogte. Deze werkwijze levert per locatie 20 stammonsters op, 80 monsters in totaal. De monsters worden gekoeld (4°C) bewaard. Binnen 24 uur na monsternamen worden de monsters voorbereid voor DNA-extractie en opgeslagen bij -18 °C.

4.1.2 DNA-extractie

Materiaal en methoden

DNA isolatie uit deze monsters en zuiverheidsbepaling werd centraal uitgevoerd door de PD. Van 80 stammonsters en 40 wortelmonsters werd in duplo DNA geïsoleerd ten behoeve van bacteriologisch en mycologisch onderzoek. De zuiverheid van het DNA werd gecontroleerd door middel van een polymerase chain reactions (PCR) toets. DNA isolatie werd gedaan met de DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Tenslotte werd het DNA opgezuiverd.

Met deze DNA monsters werd het moleculaire onderzoek uitgevoerd.

4.1.3 Moleculair onderzoek schimmels

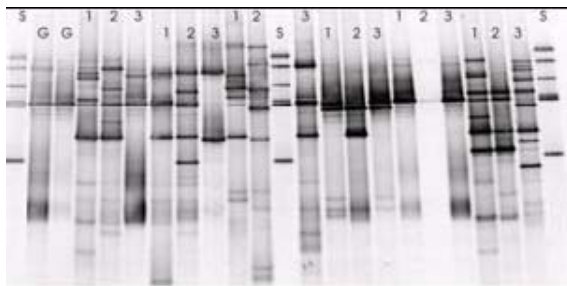
Materiaal en methoden

Van vier locaties zijn DNA monsters van zes zieke en twee gezonde kastanjes bestudeerd. De samenstelling van de populatie schimmels in de stammonsters werd moleculair onderzocht door Internal transcribed spacer (ITS) region amplificatie van schimmelachtige sequenties gevolgd door DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) analyse van deze monsters.

Als een schimmel de oorzaak is, zal op de gel (figuur 3) voor alle zieke bomen een identiek bandje worden gevonden, dat ontbreekt bij de gezonde bomen. Een eventueel aanwezig consistent bandje is een indicatie dat een schimmel de ziekteverwekker is, maar het is dan nog niet bekend welke schimmel het is.

Resultaten

Als voorbeeld wordt het bandenpatroon of DNA vingerafdrukken (rDNA-DGGE) van de schimmel-populaties monsters afkomstig van de locatie Houten weergegeven (figuur 3).



Figuur 3: Schimmelonderzoek. DGGE gel met monsters van locatie Houten genomen uit het Verkleurd bastweefsel op het grensvlak ziek-gezond (1), aangrenzend aan een aangetaste plek (2) en gezond ogende bast op enige afstand van de verkleuringen (3). G= gezond kastanjemateriaal, S=referentie

Met de DGGE analyse werden meerdere schimmelsoorten gevonden in bijna alle monsters. De schimmelpopulaties verschillen per monster. Er zijn wel overeenkomstige schimmelsoorten in de verschillende monsters. Deze breed aanwezige schimmels hebben echter geen direct verband met het grensvlak van de bemonstering of daarbuiten. Zieke bomen blijken een grotere diversiteit aan schimmels te bevatten, maar er werd geen specifieke band gevonden in associatie met zieke plekken.

Conclusie

Op basis van de DGGE analyse is het onwaarschijnlijk dat een schimmel de oorzaak is van de bloedingen.

4.1.4 Moleculair onderzoek op *Phytophthora*

Materiaal en methoden

De symptomen van de bloedingsziekte in paardenkastanje lijken sterk op de symptomen die worden veroorzaakt door de pseudoschimmel *Phytophthora*. In dit onderzoek is daarom als aanvulling op het boven beschreven DGGE schimmelonderzoek specifiek gezocht naar *Phytophthora* in de houtmonsters met behulp van de real time Taqman PCR (polymerase chain reactions) techniek. Hiermee wordt een detectie verricht naar de aanwezigheid van *Phytophthora* of een nauw verwant organisme.

Resultaat

Het onderzoek naar *Phytophthora* met behulp van Taqman PCR heeft geen positieve monsters opgeleverd. Deze detectiemethode werd uitgevoerd met als controle DNA materiaal van andere *Phytophthora*-soorten. Twee monsters gaven een zgn. vals positieve reactie, welke na nauwkeurige beoordeling negatief bleken te zijn.

Conclusie

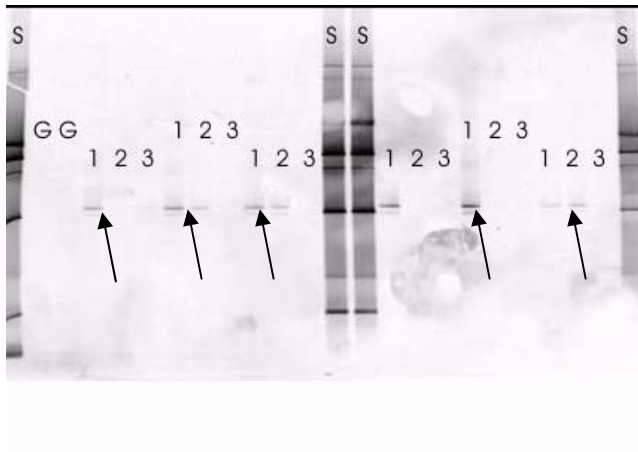
Met dit moleculair onderzoek werd geen *Phytophthora* aangetoond.

4.1.5 Moleculair onderzoek bacteriën

Om de aanwezigheid van mogelijke plantenpathogene bacteriën te onderzoeken werd na 16S amplificatie van bacterie-achtige sequenties de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) techniek toegepast. Als een bacterie éénduidig geassocieerd is met de aantastingsbeelden zal op de gel voor alle zieke bomen een karakteristiek bandje worden gevonden, dat ontbreekt bij de gezonde bomen. Een eventueel gevonden bandje is een indicatie dat een bacterie de ziekteverwekker is, maar het is dan nog niet bekend welke bacterie het is.

Resultaat

Op basis van DGGE analyse bleek de bacteriediversiteit in de monsters heel laag. In de monsters, die op het grensvlak ziek/gezond genomen werden, werd steeds een karakteristieke band gevonden (figuur 4), welke duidt op de aanwezigheid van een dominante bacteriesoort. Deze band bleek niet aanwezig in de monsters genomen uit aangetaste bomen ruim buiten de 'zieke' plekken, noch in de monsters genomen van de bomen zonder ziektesymptomen. In de monsters genomen net buiten het grensvlak werd deze bacterie af en toe waargenomen (figuur 4).



Figuur 4: Bacterieonderzoek. DGGE gel met monsters van locatie Houten genomen uit het verkleurd bastweefsel op het grensvlak ziek-gezond (1), aangrenzend aan een aangetaste plek (2) en gezond ogende bast op enige afstand van de verkleuringen (3).

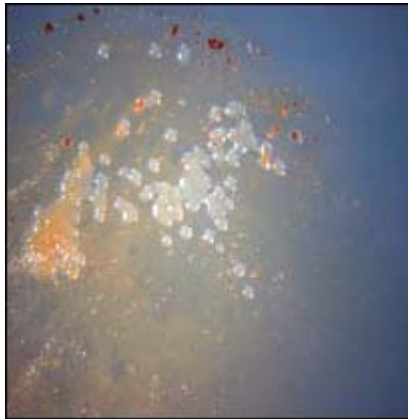
Nader onderzoek door de sequentie bepaling van deze DGGE band heeft aangegeven dat het de bacterie *Pseudomonas syringae* betreft.

Om de bacterie te identificeren op soortsniveau werd gebruik gemaakt van klonering en 16S rDNA sequentie bepaling over een lengte van 1400 basen. Uit vergelijking van de verkregen sequentie in een database met een bestand van ruim 40.000 bacteriesoorten is gebleken dat de *Pseudomonas* uit zieke kastanjabomen grote overeenkomst vertoont met *Pseudomonas trematae*, een *Pseudomonas* uit de *syringae*-groep. Deze *Pseudomonas* is geassocieerd met de rhizosfeer van gras. Er is geen aanleiding dat we te maken hebben met een bestaand quarantaine organisme.

Vervolgens werd onderzoek gedaan ter bevestiging van bovenstaande DGGE analyse. Hiertoe werden bacteriën geïsoleerd zowel vanuit het grensvlak ziek/gezond van aangetast boommateriaal als van het 'bloed' exudaat uit de boom. De isolaties vonden plaats op specifiek medium met verschillende methoden. De identiteit van de isolaten werd bepaald met behulp van 16S rDNA sequensen. Verdere karakterisatie vond plaats door middel van Biolog fysiologie bepaling waarbij verwante soorten werden meegenomen.

Geïsoleerde bacteriën

Het 'bloed' gaf veel verschillende kolonietypen bacteriën (figuur 5). Het grensvlak van ziek naar gezond heeft een overheersend kolonietype gegeven. Van dit type is de volledige 16S sequentie bepaald en deze komt volledig overeen met de 16S sequentie van de moleculaire analyses.



Figuur 5: Bacterie kolonies geïsoleerd uit zieke plekken. Deze kolonies bevatten hetzelfde 16SrDNA als de fingerprint met als typering een *Pseudomonas syringae*.

Via een niet moleculaire, maar een fysiologische methode van typering met behulp van een Biolog analyse, kwam na vergelijk met een referentie data base van 3000 bacterie-soorten, een identificatie met *Pseudomonas syringae* pv *sesami* naar voren. Een eerder door de PD verkregen isolaat uit kastanje, PD isolaat 4816, gaf op basis van 16S sequentie en Biolog een bijna identieke identificatie met het *Pseudomonas* isolaat uit kastanje.

Inoculaties van zaailingen

Inoculaties werden uitgevoerd met het verkregen *Pseudomonas* isolaat uit kastanje (PR11), een referentie, namelijk *Pseudomonas syringae* p.v. *mori* uit moerbeï (PD isolaat 982) en water als referentie. Infecties werden kunstmatig aangebracht door middel van sneetjes en injectie. Dit op één- en tweejarige zaailingen in drievoud. In totaal werden 36 inoculaties uitgevoerd. De éénjarige zaailingen met de *Pseudomonas* uit kastanje (PR11) vertoonden na verloop van tijd exudaten en bastnecrose (figuur 6). De controles, inoculeerd met water of de *Pseudomonas* uit moerbeï, vertoonden herstel van de sneetjes en geen symptomen bij de injecties. De tweejarige zaailingen vertoonden bastnecrose bij de sneetjes en exudatie bij de injecties. De controles vertoonden mechanische schade maar ook herstel.



Figuur 6: Teruginoculatie op kastanjezaailingen. Zaailingen zijn op 1-jarig hout geïnoculeerd met A) niet-pathogene bacterie (isolaat PD 982) en B) *Pseudomonas* isolaat PR11. De inoculatieplaats (i) is aangegeven met een pijl, symptomen verschijnen ook op enige afstand van de inoculatieplaats na verspreiding van de bacterie (v).

Van een geïnjecteerde éénjarige plant werd na twee maanden een bacterie-isolatie gedaan door met een injectienaald aan te prikken. De isolaten verkregen uit deze plant zijn identiek aan het oorspronkelijke isolaat op basis van twee genomische fingerprint methodes. Strikt genomen zijn bij deze zaailingen de stappen in de postulaten van Koch doorlopen.

Isolaat-identificatie, taxonomisch onderzoek en de postulaten van Koch

Door de PD werd naar aanleiding van eerdere vondsten *Pseudomonas* bij inzendingen kastanje (de eerste vondst dateert uit 2002, isolaties van *Pseudomonas* in latere inzendingen waren echter niet consistent) en de resultaten gevonden in bovenstaand onderzoek besloten infectieproeven uit te voeren. Dit voor taxonomisch onderzoek alsmede het toetsen van de postulaten van Koch en om verdere identificatie van de kastanje isolaten uit te voeren. Deze proeven werden afgestemd met PRI en bestaan uit de volgende onderdelen:

a. Bevestiging van de bovenstaande infectieproef van het PRI

Uitvoering en voorlopig resultaat:

Twee PD kastanje-isolaten en een verwante *P. syringae* uit perzik werden begin september geïnoculeerd in tweejarige kastanje zaailingen (zelfde werkwijze als PRI). Begin november zijn waarnemingen gedaan en is getracht de bacteriën terug te isoleren. Voor definitieve resultaten is het nog te vroeg omdat de teruggesoleerde bacteriën nog moeten worden gekarakteriseerd en omdat dit moet matchen met de gegevens die horen bij de geïnoculeerde isolaten. Op basis van kolonie-morfologie lijken de terugisolaties gelukt. De zaailingen geïnoculeerd met het perzik-isolaat van *P. syringae* vertoont inkapseling van de pathogeen en geen verdere uitbreiding vanuit de plaats van inoculatie. De kastanje isolaten geven duidelijk necrotisering van het onderliggende bastweefsel en verspreiding vanuit de plaats van inoculatie. De symptomen lijken sterk op die uit de kasproeven van het PRI met het PRI-isolaat. Voor mogelijke uitspraken over symptoomontwikkeling is het nog te vroeg. Er moet rekening gehouden worden met het feit dat de symptomen anders zijn dan die bij volwassen bomen.

b. Infectieproeven bij oudere kastanje bomen op een locatie in Nederland.

De sectie Bacteriologie van de PD heeft meerdere *P. syringae* isolaten geïsoleerd uit kastanje in de periode 2002 en 2004, en veel expertise op het gebied van bacteriële taxonomie en gedrag van pathogene bacterien in bomen (eerder onderzoek aan *Fraxinus* met een *Pseudomonas* bacterie en bacteriekanker populier). Na overleg met hoofdprojectleider Onderzoek van Aesculaap werd besloten een bijdrage te leveren aan het pathogeniteitsonderzoek.

In een inoculatieproef worden naast een aantal kastanje-isolaten (waaronder Belgische isolaten) veel meer pathovars van *Pseudomonas syringae* meegenomen. Het accent bij dit onderzoek ligt naast het vervullen van de postulaten van Koch op correcte identificatie (naamgeving) en verwantschapsbepaling (taxonomisch onderzoek). Naast de staminoculaties zijn inoculaties op jongere takken (ook van bladlittekens en van lenticellen) uitgevoerd. De PD heeft namelijk aanwijzingen dat naast de bekende symptomen van bloedingen op de stam ook jonge takken symptomen van bastverkleuring vertonen. Ook uit deze jongere takken is de *P. syringae* bacterie geïsoleerd.

In de loop van december 2005 zullen de eerste terugisolaties uit de bomen worden uitgevoerd. Daarna zal de symptoomontwikkeling nog langere tijd gevolgd worden.

Aanvullend zal door de PD in samenwerking met collega's in België verdere karakterisatie van de kastanje-isolaten plaatsvinden d.m.v. biochemische bepalingen, vetzuuranalyse, Rep/Box PCR en DNA-hybridisaties.

Samenvattend

Uit dit bacterie-onderzoek is gebleken dat de aanwezigheid van *Pseudomonas* duidelijk is geassocieerd met het ziektebeeld. De *Pseudomonas* bacterie is uit een zieke boom opgekweekt. De herkomst van deze bacterie uit de zieke plekken is bevestigd met DNA karakterisatie. Deze *Pseudomonas* PRI1 is in juli aangebracht op zaailingen door middel van injectie en snijwonden aan de stam. De zaailingen, geïnoculeerd met een controle *Pseudomonas* (pathogeen in moerbeï), vertoonden wondherstel. De zaailingen met het

Pseudomonas PRI1 isolaat vertoonden exudaten en necrose. Vervolgonderzoek in grotere kastanjabomen, inmiddels ingezet door zowel PRI als de PD op een locatie in Nederland, moet uitwijzen of deze bacterie de werkelijke veroorzaker is.

4.1.6 Virologisch onderzoek

Materiaal en methoden

Voorstudie m.b.v elektronenmicroscopie (EM)

In maart 2005 werden takken verzameld van twee bomen met duidelijke bloedingsplekken op locaties in Andel en Houten. De takken werden op water weggezet bij 20 °C en lange dag condities (16 h licht). Na ongeveer twee weken werden (EM) hakselpreparaten gemaakt van zeer jong blad uit uitlopende knoppen.

Screening van kastanjabomen

Alle door de Plantenziektenkundige Dienst genomen twijg, blad en bloemmonsters werden verwerkt tot EM-preparaten.

Toetsplantenonderzoek

Voor een eerste screening op virus werden vijf kastanjemonsters geïnoculeerd op een set toetsplanten. Hiervoor zijn twee methoden gebruikt: inoculatie van een monster vermalen en verdund in inoculatiebuffer en 'directe inoculatie' of 'drooginoculatie'. De set toetsplanten bestond uit:

Nicotiana glutinosa, *N. clevelandii*, *N. tabacum* 'White Burley', *N. benthamiana*, *N. occidentalis* 'P1', *N. occidentalis* '37B', *N. hesperis* '67A', *Physalis floridana*, *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus*, *Vicia faba*.

Daarnaast werden in de herfst verzamelde kastanjes buiten gekiemd in zand. Zodra de kastanjes waren gekiemd zijn ze opgepot en overgebracht naar de kas. Na uitlopen is een aantal jonge kastanjabomen getoetst m.b.v. EM op aanwezigheid van virus. Deze kastanjezaailingen werden gebruikt in inoculatie-experimenten met virus en bacteriën.

Resultaten

Voorstudie m.b.v elektronenmicroscopie

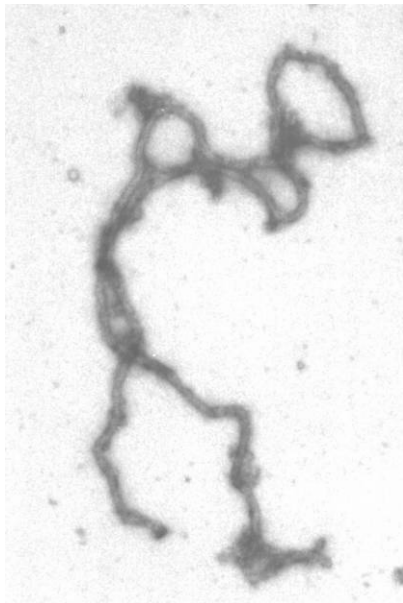
In beide bomen (herkomst: Andel en Houten) werden duidelijke virusdeeltjes waargenomen. Deze deeltjes behoren qua morfologie tot het genus *Closterovirus*.

Screening van kastanjabomen

Per boom werden tenminste twee EM preparaten bekeken. Van alle bomen, zowel gezond ogend als ziek, werden in tenminste één preparaat closterovirusdeeltjes gevonden. Dat wil zeggen dat alle 24 bomen positief werden bevonden voor closterovirusbesmetting.

Screening van kastanjezaailingen

Tien gezonde zaailingen werden getoetst met de elektronenmicroscoop op aanwezigheid van virus. In één zaailing werd het closterovirus gevonden (figuur 7). Dit is een aanwijzing voor zaadoverdracht of pollenoverdracht van het virus.



Figuur 7: Electronenmicroscopische opname van closterovirusdeeltjes van kastanje.

Toetsplantenonderzoek

Geen van de toetsplanten reageerde met symptomen na inoculatie met kastanjemateriaal. Het closterovirus gaf dus bij de gebruikte toetsplanten geen symptomen, als het al mechanisch is over te dragen. Samen met de EM resultaten is dit een aanwijzing dat er waarschijnlijk naast het closterovirus geen andere virussen aanwezig waren in het materiaal.

De geïnoculeerde kastanjezaailingen lieten af en toe chlorotische vlekken zien na inoculatie. Met de EM konden geen virusdeeltjes worden waargenomen.

Het bleek dat het closterovirus niet of nauwelijks meer is te detecteren later in het seizoen. Dit is niet ongebruikelijk bij virusinfecties in bomen. De beste tijd voor virusdetectie m.b.v. de EM blijkt juist na het uitlopen van de knoppen te zijn. De geïnoculeerde zaailingen zullen dus volgend voorjaar nogmaals moeten worden getoetst op aanwezigheid van virus.

Conclusie

Zowel in kastanjabomen zonder als met bloedingsverschijnselen is een Closterovirus aangetoond. Nader onderzoek moet aantonen of dit virus een rol speelt in het ziekteproces.

4.1.7 Fytoplasma-onderzoek

Fytoplasma's zijn gespecialiseerde bacteriën zonder celwand. Het zijn niet kweekbare parasieten, die in het floëemweefsel van planten kunnen voorkomen. Het fytoplasma-onderzoek werd uitgevoerd door middel van een polymerase chain reactions (PCR) methode op 40 wortel- en 40 houtmonsters, afkomstig van zieke en gezonde kastanjes uit vier Nederlandse gemeenten. Er werd gebruik gemaakt van algemene fytoplasma primers. Hiermee kan een indicatie worden gegeven over de aanwezigheid van fytoplasma.

Materiaal en methoden

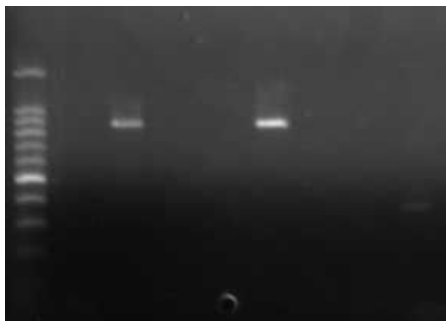
DNA werd kant-en-klaar aangeleverd door de Plantenziektkundige Dienst en was gezuiverd volgens een standaardprotocol.

Om aan te tonen dat er fytoplasma-DNA aanwezig was in de DNA-monsters van paardenkastanjes werd

eerst een algemene PCR uitgevoerd, die het zogenaamde 16 S ribosomale gebied van fytoplasma's (en in mindere mate een groep bacteriën) in het algemeen vele miljoenen malen vermenigvuldigt. Om vervolgens specifiek fytoplasma-DNA te kunnen aantonen werd op dit geamplificeerde DNA een specifieke reactie uitgevoerd met primers, specifiek voor dit organisme. Detectie vond plaats door middel van nested PCR volgens PPO-protocol.

Resultaten

Met de algemene PCR werd een DNA-fragment van ong. 1600 bp geamplificeerd; in de specifieke nested PCR werd een fytoplasma-fragment van ong. 850 bp geamplificeerd (figuur 8). Dit fragment werd tenslotte gecloneerd en gesequenced.



Figuur 8: Nested PCR van DNA, afkomstig van houtmonsters uit Hoofddorp. Twee monsters waren positief; de baseparenladder geeft de grootte van ongeveer 850 bp aan.

De meeste gezonde kastanjabomen scoorden negatief voor fytoplasma; één boom gaf een zwakpositieve reactie. Niet alle zieke kastanjabomen bleken positief te zijn.

Discussie

De analyse van de DNA-monsters, afkomstig van vier locaties in Nederland, gaf een aantal positieve reacties. Dit betekent dat hier mogelijk fytoplasma's aanwezig zijn.

Er bestaat slechts een kleine kans dat er kruisreactie optreedt van de gebruikte fytoplasma-PCR met bacteriën. Hoewel bijna alle PCR-reacties positief zijn in die monsters, die ook positief waren met DGGE (paragraaf 4.1.5), zijn de gebruikte primers specifiek voor fytoplasma's. Het verkregen amplicon gaf in datavergelijking (NCBI) 100% homologie met de fytoplasmagroep en niet met *Pseudomonas*. Nader onderzoek wees wel uit, dat een monster met fytoplasma ook *Pseudomonas syringae* bevatte. Er is een sterke correlatie gevonden tussen de kastanjemonsters met een positieve reactie op *Pseudomonas syringae* (zie paragraaf 4.1.5) en de aanwezigheid van fytoplasma. Gezien de toenemende incidentie van fytoplasma's in houtige gewassen in Nederland is nader onderzoek wenselijk.

Conclusie

Uit onderzoek is gebleken dat een aantal kastanjabomen besmet waren met een fytoplasma. Ook een gezonde boom bleek licht geïnfecteerd. Gezien de mogelijkheid van kruisreactie met een kleine groep bacteriën, de afwezigheid van typische 'heksenbezemachtige' symptomen en de correlatie met de door *Pseudomonas syringae* besmette bomen kan worden geconcludeerd dat fytoplasma's waarschijnlijk niet de primaire oorzaak zijn van de bloedingsziekte van paardenkastanjabomen.

4.1.8 Viroïden onderzoek

Viroïden zijn veel kleiner en eenvoudiger dan virussen. Ze bevatten enkelstrengig RNA en missen een eiwitkapsel dat zo typerend is voor virussen. Viroïden gebruiken planten om zich te vermenigvuldigen. Tot dusver zijn ruim dertig soorten geïdentificeerd.

Materiaal en methoden

Voor het viroïde-onderzoek werden op vier locaties zes monsters van bloemen genomen. Per locatie werden drie bomen zonder en drie bomen met symptomen van bloedingsziekte bemonsterd. Per boom werden vijf bloemen verzameld en als één mengmonster getoetst. Gekozen is om juist bloemen te toetsen om afbraak van eventueel aanwezige viroïden door oxiderende stoffen in bladeren en bast van de paardenkastanje zoveel mogelijk te beperken. Hierbij wordt aangenomen dat een eventueel aanwezig viroïde door de hele boom zal zijn verspreid, zoals bij de meeste viroïden en virussen het geval is. Van alle monsters werd het 'totaal-RNA' geïsoleerd. Hieraan werden vervolgens RT-PCR's uitgevoerd met de twee beschikbare semi-universele primersets voor viroïden, respectievelijk Vd1F/Vd2R en AP-FW/AP-RE. RT-PCR staat voor reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Met deze techniek wordt een RNA-streng vertaald naar een DNA-streng, waardoor het mogelijk wordt om PCR (polymerase chain reactions) toe te passen. Met de gebruikte primers is het mogelijk een gedeelte van de bekende viroïden te detecteren.

Resultaten

Bij geen van de onderzochte monsters werd een viroïde gedetecteerd. Met de gebruikte primers kunnen 11 van de 28 voldoende gekarakteriseerde viroïden worden gedetecteerd. Dit betekent dat het onderzoek geen uitsluitel geeft over de overige viroïden. Van 17 viroïdentypen is dus nu geen uitsluitel, maar in het licht van de bevindingen van het bacterieonderzoek is het de vraag of dit deel verder uitgevoerd moet worden.

Conclusie

Uit dit onderzoek zijn geen indicaties naar voren gekomen dat viroïden een rol spelen bij de bloedingsziekte van paardenkastanjes.

4.1.9 Conventioneel diagnostisch onderzoek op schimmels, bacteriën en aaltjes

Onderzoek werd uitgevoerd aan 30 monsters door middel van conventionele isolatietechnieken op bacteriën en schimmels, evenals oriënterend op nematoden.

De schimmel *Phytophthora* wordt regelmatig genoemd als een mogelijke veroorzaker van de kastanjeziekte. Dat is echter tot dusverre niet aangetoond. Mede vanwege literatuurvermeldingen van *Phytophthora*-isolaties uit soortgelijke symptomen heeft Aesculaap *Phytophthora*-deskundige Dr. Thomas Jung van de Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft gevraagd voor een second opinion.

Met Thomas Jung zijn de tot dusver negatieve *Phytophthora*-isolatiemethoden besproken. Vervolgens heeft hij op verzoek van Aesculaap op drie locaties eigen onderzoek verricht door middel van klassieke isolatiemethoden. Bij dit onderzoek werd in het hout geen *Phytophthora* aangetoond. Wel bleek bij ca 50% van de onderzochte bomen *Phytophthora* aanwezig in de bodem. De betekenis hiervan dient nader te worden onderzocht. Met aangepast protocol werd het *Phytophthora*-onderzoek voortgezet als aanvulling op het moleculaire onderzoek en eerder uitgevoerd klassiek diagnostisch onderzoek (CBS, PD, PPO).

Uit het cytologisch en anatomisch onderzoek (paragraaf 5.1) bleek uit aspecifieke fluorescentie-labeling (DAPI - kleuring) bacteriën aanwezig in coupes. Na sterilisatie van de buitenkant groeiden er bacteriën uit dit materiaal op Luria-Broth medium. Dit werd verder geanalyseerd door PPO.

Materiaal en methoden

De aangeleverde stammonsters werden bewerkt volgens het standaard DiagnostiekService PPO protocol. Een deel van deze monsters is langdurig gespoeld alvorens op onderstaande media, specifiek voor een aantal schimmelgroepen, te worden uitgelegd. Dit laatste volgens voorschrift van Jung (mondeling voorschrift).

De gebruikte media waren AGA, een algemene voedingsbodem voor schimmels, en CMA en V8,

voedingsbodems voor het isoleren van oomyceten als *Phytophthora* en *Pythium*.

De PD leverde 24 wortelmonsters aan in zakjes met grond. Na het spoelen van de wortels is elk monster gesplitst en bewerkt enerzijds voor aaltjestoetsing, anderzijds voor analyse op schimmels. De analyses werden volgens standaard PPO-protocol uitgevoerd. Een deel van een monster werd beoordeeld op aanwezigheid van aaltjes. De aaltjes werden microscopisch beoordeeld en gedetermineerd op geslacht en familieniveau tot zover mogelijk.

Het andere deel van de wortelmonsters werd uitgeplaat op de verschillende voedingsbodems. De agarplaten werden visueel en microscopisch beoordeeld. Determinatie vond plaats op vruchtlichamen en sporen, voor zover aanwezig.

Resultaten en discussie

Analyse van houtmonsters

De beoordeling vond in eerste instantie microscopisch plaats, een tiental vaak geïsoleerde (in de meeste monsters aangetroffen) bacterie-isolaten werden voor verdere moleculaire karakterisering doorgezonden naar PRI.

Doorgaans worden soorten gevonden uit de genera *Klebsiella*, *Pseudomonas* en *Enterobacter*. Deze worden ook vaak geïsoleerd uit andere 'bloedingsziekten'; men gaat er vanuit dat deze, algemeen in grond en water voorkomende microben, via wondjes e.d. binnendringen en gaan groeien.

Bij de beoordeling van de schimmeluitgroei werd ten eerste vastgesteld dat op de specifieke voedingsbodems voor oomyceten voornamelijk bacteriën en gisten uitgroeiden. Ten tweede werd microscopisch vastgesteld dat er meerdere schimmels niet sporuleerden zodat determinatie niet verder mogelijk was. Enkele van deze schimmels zijn aangehouden voor mogelijke karakterisering op DNA niveau. *Phytophthora* werd niet geïsoleerd.

Na sterilisatie van de buitenkant van het kastanjemateriaal, dat werd aangeleverd uit het cytologisch en anatomisch onderzoek (paragraaf 5.1), groeiden er bacteriën uit dit materiaal op Luria-Broth medium. Er leken twee kolonietypen aanwezig. De uitgroei op agarmedium (figuur 9) leek sterk op die van *Bacillus licheniformis* (die in grond voorkomt); na Gramkleuring bleek de bacterie Grampositief.

Uit vetzuuranalyse (LMG Gent, België) werd een sterke homologie gevonden met bacteriën, behorende tot het *Bacillus cereus*-complex.

Via een algemene PCR werd het 16 S ribosomale gen van bacteriën geamplificeerd, gekloneerd en de sequentie van een fragment bepaald (BaseClear). Ook hier bleek de identiteit van beide isolaten tot het *Bacillus cereus*-complex te vallen.



Figuur 9: Kweek van *Bacillus cereus* op agarbodem.

Een aantal isolaten is bewaard voor eventuele verdere (moleculaire) determinatie.

Analyse van wortelmonsters

Schimmels (oomyceten)

In veel monsters (maar niet alle, en ook in een gezond monster) werd *Pythium* gevonden. Dit is een

algemeen voorkomende schimmel met vele soorten. Het is niet uit te sluiten, dat in enkele gevallen een *Phytophthora* sp. aanwezig was, dit kon niet met zekerheid worden vastgesteld. Ook werden vaak sporen van de schimmel *Fusarium* aangetroffen. Algemeen kwamen de schimmels in de hoogste aantallen en verscheidenheid voor in de zieke monsters.

Aaltjes

Aaltjes werden gevonden, met name vertegenwoordigers uit de Pratylenchidae familie. Deze *Pratylenchus* spp. staan bekend als endoparasieten. Deze aaltjes komen algemeen voor als vrijlevende aaltjes in grondmonsters met wortels van hogere plantensoorten, maar vermenigvuldigen zich in de wortels. Volgens de tellingen kwamen in zieke bomen relatief meer aaltjes voor. Dit kan het gevolg zijn van verzwakking en de aanwezigheid van meer voedsel voor deze aaltjes.

Ook werden relatief veel *Macroposthonia* gevonden, echter niet in alle monsters. Deze aaltjes behoren tot de Criconematidae familie en zijn algemeen voorkomend en bekend als plantenparasieten in diverse gewassen. Van de soort *M. dherei* wordt specifiek beschreven dat deze voorkomt in o.a. Burgum in Nederland! Echter ook in een gezond monster werd deze nematode aangetroffen.

Conclusies

De analyse van de stukjes stam van zieke kastanjes gaf aan, dat er meer organismen groeiden uit ziek dan uit gezond materiaal. Veel gisten waren aanwezig; dit duidt op fermentatie van het bloedingsap. Een aantal isolaten is gekarakteriseerd via een algemene PCR. Een reactie werd gevonden met algemene primers, die xanthomonaden en pseudomonaden herkennen. Een aantal van deze isolaten is naar PRI gestuurd voor nadere karakterisatie op een later tijdstip.

De isolaten, verkregen uit de stammonsters vanuit het cytologisch en anatomisch onderzoek bleken te behoren tot de *Bacillus cereus*-groep. Deze zijn bekend als endofyt of saprofyt, maar niet als potentieel pathogeen. Bacteriën uit deze groep worden zelfs gebruikt als antagonist tegen *Rhizoctonia solani*.

De wortelmonsters leverden geen aanwijzingen op, dat er sprake zou kunnen zijn van een parasitaire nematode of schimmel. Wel was er een trend zichtbaar van een groter aantal schimmels en nematoden in de zieke bomen vergeleken met de twee gezonde boommonsters.

4.1.10 Fytopathologisch veldonderzoek

Op drie locaties (Houten, Haarlemmermeer en Geleen) werden infectieproeven uitgevoerd met aangetaste houtponsjes. Onderstaand zijn de eerste resultaten beschreven van de proef uitgevoerd in Geleen. De proeven zijn nog niet afgerond.

Materiaal en methoden

De proef in Geleen werd begin april uitgevoerd op 12 bomen, namelijk zes zieke bomen en zes gezonde bomen. Inoculatie vond plaats door met een holpijp, doorsnede 13 mm, in tweevoud ponsjes aangetast hout uit de stam te nemen en over te brengen op gezonde bomen respectievelijk gezonde delen van aangetaste bomen op verschillende hoogten (basis, 50, 100, 150, 200 cm). De aangetaste houtponsjes werden genomen van de buitenrand van zieke plekken.

Er werden op deze wijze vijf gezonde bomen kunstmatig geïnfecteerd met ponsjes aangetast hout afkomstig van één zieke boom. Daarnaast werden op dezelfde wijze van vijf aangetaste bomen per boom aangetaste houtponsjes genomen en ingebracht in gezonde delen van dezelfde boom.

Als referentie werden bij een gezonde boom op dezelfde wijze ponsjes genomen en ingebracht. De bomen werden periodiek beoordeeld op ontwikkeling van de aantasting, begin juli werd een beoordeling uitgevoerd. In november zullen monsters genomen worden voor moleculair onderzoek door PRI om te toetsen of er een microorganisme betrokken is bij de ontwikkeling van verbruining vanuit aangetaste ponsjes naar omringend weefsel.

Resultaten

Zowel bij de gezonde bomen, die waren geïnfecteerd met houtponsjes afkomstig van een zieke boom, als bij de aangetaste bomen, die op gezonde delen van de boom waren geïnfecteerd met geïnfecteerde houtponsjes van dezelfde boom, werd bij 84% van de ingebrachte ponsjes ontwikkeling van de verbruining vanuit de ponsjes naar het omringende weefsel waargenomen (figuur 10). De gemeten lesiedoorsnede van aantasting varieëerde van 3 tot 8 cm (geen aantasting was 2 cm). Bij de gezonde boom geïnfecteerd met gezonde houtponsjes werd geen lesieontwikkeling waargenomen. Dit onderzoek wordt nog voortgezet.



Figuur 10: Lesie ontwikkeling na kunstmatige inoculatie met een aangetast houtponsje in een gezonde boom.

4.2 Verspreidingsmechanismen

Projectleider: Ing. Martin Verbeek (PRI)
Projectmedewerkers: Ir. Fons van Kuik (PPO)

Onderzoek naar aanwezigheid van virus in de paardenkastanjemineermot en in de koningsdopluis

De laatste jaren is ons land 'overspoeld' met de paardenkastanjemineermot (*Cameraria ohridella*). Alle witbloeiende paardenkastanjabomen in ons land zijn aangetast door dit insect. Verondersteld wordt dat het beestje niet direct grote schade geeft. Van veel insecten is bekend dat ze een ziekteverwekker kunnen overdragen. In dit onderzoek werd onderzocht of de kastanjemineermot een overbrenger is van een virus en dus indirect de oorzaak zou kunnen zijn van de bloedingsziekte en de snelle verspreiding ervan.

Screening van kastanjemineermotten

Medio april 2005 werden kastanjemineermotten getoetst. Het betrof hier uitgekomen poppen van bladeren uit seizoen 2004, afkomstig van een boom met bloedingsverschijnselen. Hiervan werden twee monsters gemaakt van elk tien motten. Deze monsters werden vermalen en verwerkt tot EM-preparaten. Medio mei 2005 werden kastanjemineermotten ontvangen van gezond-ogende en zieke kastanjabomen uit Gouda. Hiervan werden 14 monsters gemaakt van elk tien mineermotten. EM preparaten werden in duplo gemaakt en geanalyseerd. In totaal werden 160 mineermotten geanalyseerd.

Screening van dop/wolluizen

Gaande het onderzoek kwam er meer aandacht voor een eventuele rol van de koningsdopluis (*Pulvinaria*

regalis) als overbrenger van een mogelijk virus. Verschillende virusziekten kunnen worden overgebracht door bladluizen. De koningsdopluis vormt de laatste jaren een ware plaag o.a. in de paardenkastanjabomen. In juli 2005 werden koningsdopluisen verzameld van zieke paardenkastanjes in de botanische tuin 'Belmonte' te Wageningen. Hiervan werden tien monsters gemaakt van elk twee luizen. EM-preparaten werden gemaakt en geanalyseerd.

Resultaten

In geen van de monsters van mineermotten werden deeltjes van plantenvirussen waargenomen. Wel is in één monster een geïnfecteerde insectencel gevonden, die een bolvormig virus bevatte, waarschijnlijk een virus van de mineermot zelf.

Ook in de monsters van de dopluizen werden geen virusdeeltjes waargenomen in de EM preparaten.

Conclusie

Dit onderzoek toont aan dat de kastanjemineermot geen verspreider is van pathogene virussen die in verband kunnen worden gebracht met de kastanjeziekte. Ook zijn in dit onderzoek geen plantenpathogene (virussen) aangetoond in de verzamelde koningsdopluisen.

5 Niet-parasitair onderzoek

Het hiervoor beschreven onderzoek naar de mogelijke oorzaken van de bloedingsziekte in paardenkastanjes in Nederland heeft zich gericht op ziekteverwekkers zoals schimmels en bacteriën. Daarnaast is het goed mogelijk dat niet-parasitaire oorzaken verantwoordelijk zijn voor en/of een rol spelen bij de ontwikkeling van de bloedingsziekte in kastanje.

5.1 Celbiologische en anatomische karakterisering bloedingsziekte

Projectleider: Dr. André van Lammeren, Laboratorium Plantencelbiologie, Botanisch Centrum, Wageningen Universiteit en Research Centrum (WUR)

Projectmedewerkers: Prof. Dr. Ir. Pierre de Wit (WUR), Ir. Jitze Kopinga (Alterra), Irene Paris-Barrios (WUR), Henk Kieft (WUR)

De door de bloedingsziekte aangetaste paardenkastanjabomen vertonen aan hun buitenzijde als vroeg symptoom bloedende plekken op de stam en takken, waaruit in meerdere of mindere mate een helderbruine vloeibare substantie naar buiten treedt.

Doel

Het cytologisch en anatomisch onderzoek is erop gericht om de symptomen in hout en bast op cellulair en weefselniveau vast te stellen en te achterhalen wat de oorzaak van de ziekte zou kunnen zijn.

Materiaal en methoden

Het ziektebeeld en het verloop van de ziekte van de paardenkastanje zijn in beeld gebracht in de periode februari t/m september 2005. Daarbij is gebruik gemaakt van monstermethodes waarbij twee-wekelijks meerdere hout- en bastmonsters zijn verzameld van de stam van zieke en gezonde bomen. De monsters zijn met een boortol of holpijp genomen en direct daarna geanalyseerd in het laboratorium (figuur 11).



Figuur 11: Bastmonsters genomen van een gezonde paardenkastanjeboom (links) en een aangetaste boom (rechts).

Van het gemonsterde materiaal zijn met een microtoom microscopische preparaten gemaakt van het dwarse, tangentiale en radiale vlak. Preparaten zijn met verschillende histochemische kleuringsmethoden behandeld. Daarbij is onder andere gekleurd met Soedan IV om wasachtige stoffen en cutine te detecteren, met neutraal rood om verhouting aan te tonen, met aniline blauw (water blue) om callose zichtbaar te maken, en met 4',6-Diamidino-2-fenylindole (DAPI) om plant-eigen en plant-vreemd DNA van bijvoorbeeld het nucleoid van bacteriën en de celkernen van schimmels te detecteren. Preparaten zijn met

lichtmicroscopische en fluorescentiemicroscopische technieken bestudeerd en hiervan zijn microfoto's gemaakt. Nadat bleek dat in het materiaal van aangetaste planten bacteriën voorkwamen, zijn deze geïsoleerd en ter identificatie aan andere onderzoekers van Aesculaap ter beschikking gesteld. Beeldmateriaal is geanalyseerd.

Resultaten

Allereerst is een analyse gemaakt van gezond bast- en houtweefselweefsel om een vergelijking te hebben voor het aangetaste materiaal.

Omschrijving van het gezond materiaal:

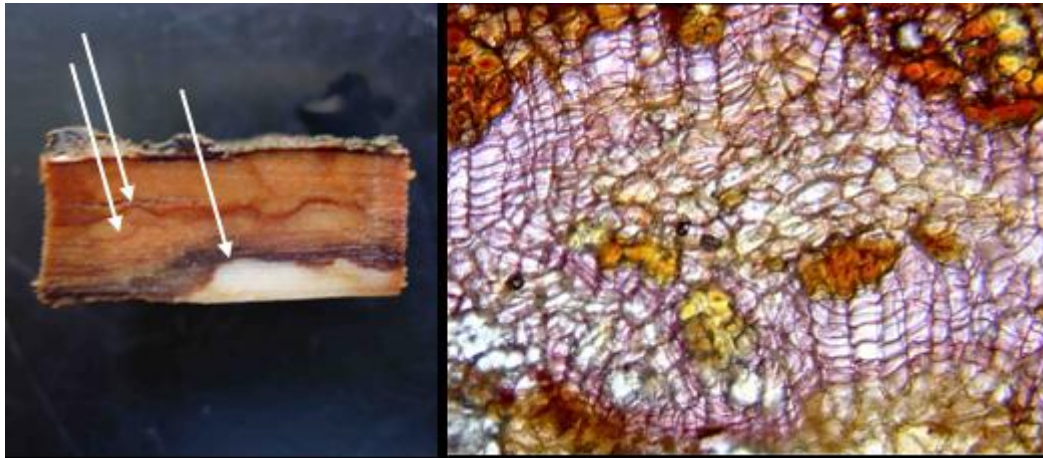
Bastweefsel van *Aesculus hippocastanum* is opgebouwd uit zeefvaten met samengestelde zeefplaten, begeleidende cellen, lengteparenchym, straalparenchym, kristalcellenvezels en tangentiale lagen bastvezels. Alleen nabij het vaatweefselvormend cambium ligt een dunne laag geheel functioneel floem, het sapvlies. Dit is de laag met assimilaten transport. De functionele zeefvaten zijn gekarakteriseerd door het vermogen nog callose te kunnen afzetten op hun zeefplaten. Het sapvlies gaat over in een laag floem van vele millimeters dik, waarin het parenchym nog leeft, maar de zeefvaten en begeleidende cellen niet meer intact zijn. Hier is wel opslag, maar geen assimilaten transport. Bij bomen tot 20-25 jaar ligt in het buitenste deel van de bast een afsluitend periderm (kurklaag) dat ook direct de buitenkant van de bast vormt. De totale bastlaag kan tot 1 cm dik zijn.

Houtweefsel bestaat uit diffuusporig hout met micropore houtvaten met enkelvoudige doorboringen. Het lengteparenchym is levend en grenst aan de houtvaten. Het grondweefsel bestaat uit libriform en er zijn enkelvoudige houtstralen.

Omschrijving van het aangetaste materiaal:

Aantasting van een boom uit zich aan de buitenkant van de stam als eerste in de vorm van een kleine opening in het afsluitende periderm, waaruit helderbruine vloeistof naar buiten treedt. Ter plaatse van de aantasting is het floem onder het periderm sterk bruin gekleurd.

De bruinkleuring is een gevolg van polyphenoloxidase-activiteit, die in desintegrerend weefsel veel sterker is dan in intact weefsel. Zie voor het werkingsmechanisme van polyphenoloxidase paragraaf 5.2. De verkleuring betreft vooral de lengte- en straalparenchymcellen. Aangetaste parenchymcellen in de bast sterven vervolgens af en de cellen en het weefsel desintegreren. Bij dat proces komt veel vocht in de intercellulaire ruimte vrij en dat vocht kan als heldere bruine vloeistof naar buiten treden. Het proces van weefselverval is vaak lokaal. Het wordt dikwijls alleen in de buitenste lagen van de bast aangetroffen, terwijl het meer binnenwaarts gelegen weefsel nog intact is. Dat betekent dat ter plaatse van een aantasting, het assimilatentransporterend deel van het floem (sapvlies) niet aangetast hoeft te zijn. Er is meestal geen geleidelijke overgang van aangetast weefsel naar niet aangetast weefsel. Op de overgang tussen beide gebieden is vaak een nieuwe afsluitingslaag aangetroffen, die door de plant als reactie op de aantasting is aangelegd. Een dergelijke laag bestaat uit cellen die verkurken nadat zij eerst enige keren gedeeld zijn en rijtjes gevormd hebben. Hier is sprake van hernieuwde peridermvorming kennelijk als reactie op de aantasting, waardoor verdere uitbreiding van aantasting wordt vertraagd/voorkomen. De nieuw-gevormde peridermlagen liggen grillig in de bast van periclinaal tot soms radiaal, waarbij het nieuw-gevormde periderm kan aansluiten op het oorspronkelijke periderm dat de bast aan de buitenzijde begrenst of op peridermlagen die al eerder tijdens het ziekteproces zijn gevormd. De aantasting van het floem kan ook tot aan en in het hout optreden. Dan is ook het sapvlies en de cambiumlaag aangetast. Op een dergelijke plaats kan geen herstel meer optreden en zal na enige tijd de bast loslaten van de houtcilinder (figuur 12).



Figuur 12: Links: Bastmonster van een aangetaste paardenkastanjeboom. De bovenzijde is de buitenkant van de stam, de onderzijde is het gebied van het vaatweefselvormend cambium. Het monster is in de lengterichting doorgesneden en toont bruinkleuring door aantasting tot aan het cambium, maar ook is een deel van het bastweefsel nog licht gekleurd en gezond. De pijlen wijzen op de aanleg van nieuwe afsluitingslagen zoals ook te zien zijn in de rechter figuur.
 Rechts: Detail van aangetast bastweefsel op dwarse doorsnede. Nieuw aangelegde afsluitingslagen (periderm) ontstaan als reactie op de aantasting. De verkurkte celwanden lichten rood op door kleuring met Soedan III. De donkerbruingekleurde cellen aan de bovenzijde zijn dood.

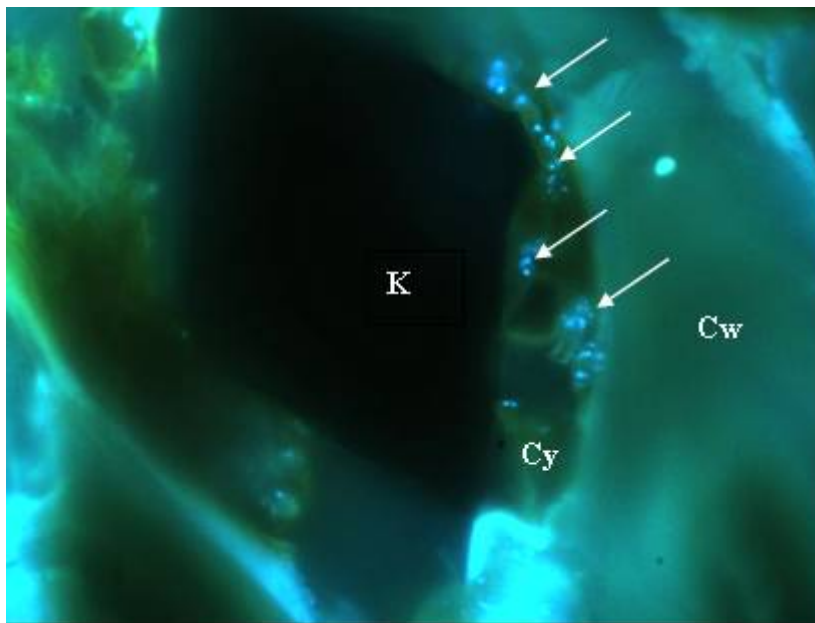
Daar waar het hout is aangetast verkleuren ook de houtparenchymcellen en vaak ontstaan lacunes waar de parenchymcellen van bast en hout vervallen zijn. Op plekken waar ook het hout is aangetast, zijn de houtvaten vaak gedeeltelijk gevuld met granulair materiaal. Het kan zijn dat het afbraakproducten zijn, die uit het lengteparenchym vrijgekomen zijn.

Op basis van analyse gedurende de hele onderzoeksperiode van februari tot september hebben we geen progressie in het ziektebeeld kunnen waarnemen voor wat betreft het type afwijkingen in bast- en houtweefsel. De aangetaste bomen die bij het onderzoek zijn betrokken, bleven over het algemeen redelijk/goed in blad en bloeding nam niet toe. In de zomer zijn wel veel aantastingen op de paardenkastanjes waargenomen onder andere door de kastanje-mineermot. Dergelijke aantastingen leggen een stress op de bomen die wel degelijk van invloed kan zijn op de bacteriële infectie en de wijze waarop de plant daarop kan reageren.

Detectie en analyse van bacteriën in aangetast weefsel

Microscopische analyses op het voorkomen van bacteriën heeft duidelijk gemaakt dat monsters van gezonde bomen en monsters van niet-aangetaste plekken van aangetaste bomen geen bacteriën bevatten. Monsters van geïnfecteerde plekken bleken wel bacteriën te bevatten.

Bacteriën zijn aangetroffen in sterk aangetaste delen, waar zij soms als clusters bijeenlagen op plaatsen waar het weefsel al geheel gedesintegreerd was, maar ook werden bacteriën aangetroffen in intacte parenchym cellen van het floeem en het xyleem op plaatsen met geringe aantasting. Dit betekent dat bacteriën in weefsels met verschillende gradaties van aantasting zijn aangetoond (figuur 13).



Figuur 13. Detailopname van bastparenchymcel van een aangetaste paardenkastanjeboom. In het cytoplasma van de cel zijn bacteriën te zien na kleuring met DAPI (pijlen). Cw: celwand, Cy: cytoplasma, K: kristal.

Met het oog op identificatie van de bacteriën zijn monsters van gezonde en zieke bomen genomen en op petrischalen getoetst op aanwezigheid van bacteriën (in samenwerking met J van Doorn (PPO) en A Speksnijder (PRI)). In samenwerking met Joop van Doorn (PPO) zijn bacteriecultures op schaal geïsoleerd. Uit analyse, onder meer uitgevoerd door het collectie/identificatielab (LMG) in Gent, bleek dat het waarschijnlijk onschuldige grampositieve bacteriën behorend tot het *Bacillus cereus*-complex in zaten en ook Gramnegatieve bacteriën mogelijk *Erwinia* of *Xanthomonas*; vergelijk ook paragraaf 4.1.9. Vervolgens zijn meerdere gezonde en aangetaste monsters gebruikt om bacteriecultures op te zetten. Gezond weefsel gaf geen kolonies, waarmee is aangetoond dat er geen endofytische bacteriën waren. Bacteriën die steeds voorkwamen in de monsters van aangetaste delen van zieke bomen zijn geïdentificeerd door A. Speksnijder (PRI). Zij behoren tot de groep van de Pseudomonaden (*Pseudomonas syringae*) en blijken bij herinfectie van zaailingen dezelfde ziekte symptomen te kunnen veroorzaken als te zien in de aangetaste bomen (zie ook paragraaf 4.1.5). Deze bacteriën spelen waarschijnlijk een belangrijke rol bij de bloedingsziekte.

Als een aangetast monster enige tijd in vochtig milieu wordt gehouden (uitgevoerd tot 12 dagen en 4 °C), blijkt dat sterke hyfenvorming op gang komt hetgeen betekent dat schimmels in het aangetaste materiaal aanwezig zijn. Er zijn vooralsnog geen aanwijzingen uit de andere projecten van dit onderzoeksprogramma dat deze schimmels de oorzaak van de aantasting zijn. Zij kunnen een contaminatie vormen nadat het bastweefsel is gedegenereerd.

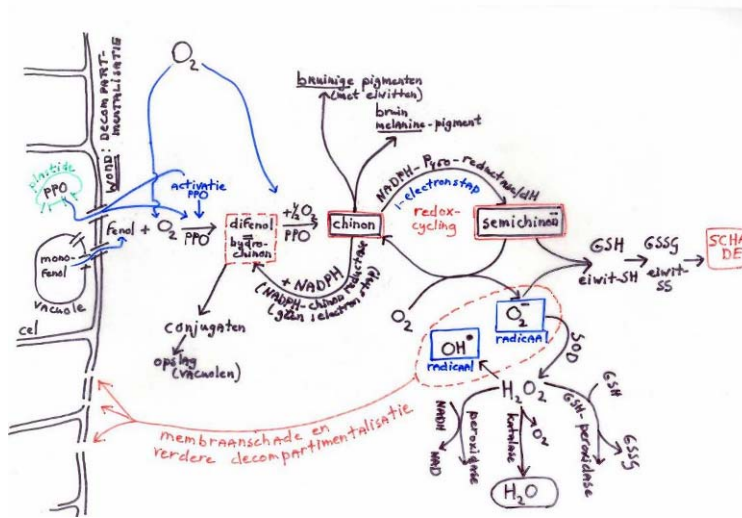
5.2 Fysiologisch onderzoek aan de bloedingsziekte

Projectleider: Prof. Dr. Linus van der Plas, Leerstoelgroep Plantenfysiologie, (WUR)

Projectmedewerkers: Leo Slingerland (PPO), Dr. Ir. Ria Weijnen-Derkx (PPO), Hans Dassen (WUR)

Onafhankelijk van de vraag welke ziekteverwekkers de bloedingsziekte in paardenkastanjes initiëren is het van belang om fysiologische en biochemische processen in en rond de 'wonden' tot stilstand te brengen. Onderzocht wordt of een zichzelf versterkend proces van celafbraak en verbruining de verschijnselen kunnen veroorzaken, die bij de bloedingsziekte worden waargenomen en vervolgens of door ingrijpen in dit proces aan deze verschijnselen een halt kan worden toegevoerd.

In het beschreven proces zijn twee fasen te onderscheiden: (1) een initiatie-fase en (2) een vervolg-cascade (zie figuur 14). In de *initiatiefase* treedt er afbraak op van de membranen van cellen in de bast. Deze membraanschade kan een gevolg zijn van een combinatie van oorzaken zoals verwonding (door bijv. insectvraat of aanpakken door een insect), binnendringen van een bacterie (bijv. *Pseudomonas*), milieuvervuiling, stress als gevolg van slechte standplaatsomstandigheden etc.



Figuur 14: Schematische weergave proces celafbraak en verbruining

In alle gevallen is het gevolg *decompartmentalisatie* van de celonderdelen en activeren van de reactie van polyfenoloxylase, 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/tannine-achtige stoffen; vergelijk de linkerkant van het schema weergegeven in figuur 14. Dergelijke reacties treden vaak op bij verwonding en zijn dan vaak beperkt van omvang.

Deze chinonen kunnen echter ook aanleiding geven tot een *vervolg-cascade*, die bij kastanje de oorzaak zou kunnen zijn van de symptomen van de 'bloedingsziekte'; vergelijk de rechterkant van het schema weergegeven in figuur 14. 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 decompartmentalisatie, verdergaande polyfenoloxylase-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 tot bloeding en vorming van bruine pigmenten op steeds grotere schaal.

Het voorkomen van deze 'vervolg-cascade' is essentieel voor elke plant. Daarvoor is gewoonlijk een aantal verdedigingsmechanismen werkzaam.

Wanneer één of meerdere van deze verdedigingsmechanismen niet goed werkt, dan krijgt het proces de kans zich verder uit te breiden. Bij de zieke paardenkastanjabomen lijken deze verdedigingsmechanismen te zijn aangetast, waardoor er bloeding ontstaat. Waarom dit zo sterk optreedt bij de aangetaste kastanjes, is nog onbekend. Het antwoord hangt mede af van de veroorzaker: is deze veroorzaker (een *Pseudomonas*? vergelijk hoofdstuk 4.1.5) een relatief nieuw pathogeen voor kastanje, waartegen de 'normale' verdediging niet werkt, of is de kastanje door andere (stress?)-condities verzwakt waardoor een 'overmatig' sterke reactie optreedt? Mogelijk speelt een combinatie van factoren een rol.

Om zeker te zijn dat het hier geschetste systeem inderdaad in kastanje voorkwam, is eerst met behulp van een aantal standaardreacties getoetst of de 'spelers' uit bovenstaand schema (zie figuur 14) (met name fenolen en het polyfenoloxylase-enzym) inderdaad in monsters uit de stam van kastanje konden worden

aangetroffen.

Toen dit het geval bleek te zijn, heeft het onderzoek zich vooral gericht op het testen van mogelijkheden om in te grijpen in het proces.

Dit ingrijpen in het proces is zowel gebruikt om het proces beter te begrijpen maar vooral om een mogelijke remedie te ontwikkelen, die eerst getest is in het laboratorium op monsters verzameld van zieke bomen, en later in het veld. De te testen ingrepen sloten direct aan op de fysiologische achtergrond, die in figuur 10 is weergegeven.

De *initiatie-reactie* kan worden geblokkeerd door het enzym polyfenoloxydase te remmen (een groot aantal remmers was hiervoor al beschreven, waarbij sommige, afkomstig uit de voedingsindustrie niet direct giftig zijn en ook buiten de laboratoriumsituatie getest kunnen worden) en door de vorming van chinon tegen te gaan

De *vervolg-cascade* kan worden geremd door zuurstofradicalen en waterstofperoxide weg te vangen.

Een aantal stoffen blijkt ook in beide processen in te grijpen; die stoffen (bijv. ascorbinezuur) waren 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 zijn er een beperkt aantal uitgekozen om in het veld te testen. Deze veldtesten zijn gestart in juli en zullen uiteindelijk een eerste indicatie geven over de praktische toepasbaarheid van remstoffen.

Deze aanpak heeft aangetoond dat de eerder genoemde processen, inderdaad optreden bij de bloedingsziekte bij de paardekastanje. De daarop aansluitende behandelingen om de symptomen te bestrijden, zijn vervolgens getest in het veld; deze veldtesten (zie onder) lopen nog.

Materiaal en methoden

Laboratoriumproeven

In literatuur werd informatie gezocht naar de wijze waarop polyfenoloxydase in planten kan worden bepaald en op welke wijze de werking kan worden geremd, waarbij vooral aandacht werd gegeven aan remmers/remmingsmethodieken die geen of weinig schadelijke neveneffecten hebben, o.a. door na te gaan hoe polyfenoloxydase wordt geremd in de voedingsindustrie.

Er werden bepalingmethoden van polyfenoloxydase getest, om (1) na te gaan of polyfenoloxydase in de aangetaste delen van kastanje voorkomt en (2) om de in de literatuur gesuggereerde remmingsmethodieken *in vitro* te testen, ter voorbereiding van de geplande testen in het veld.

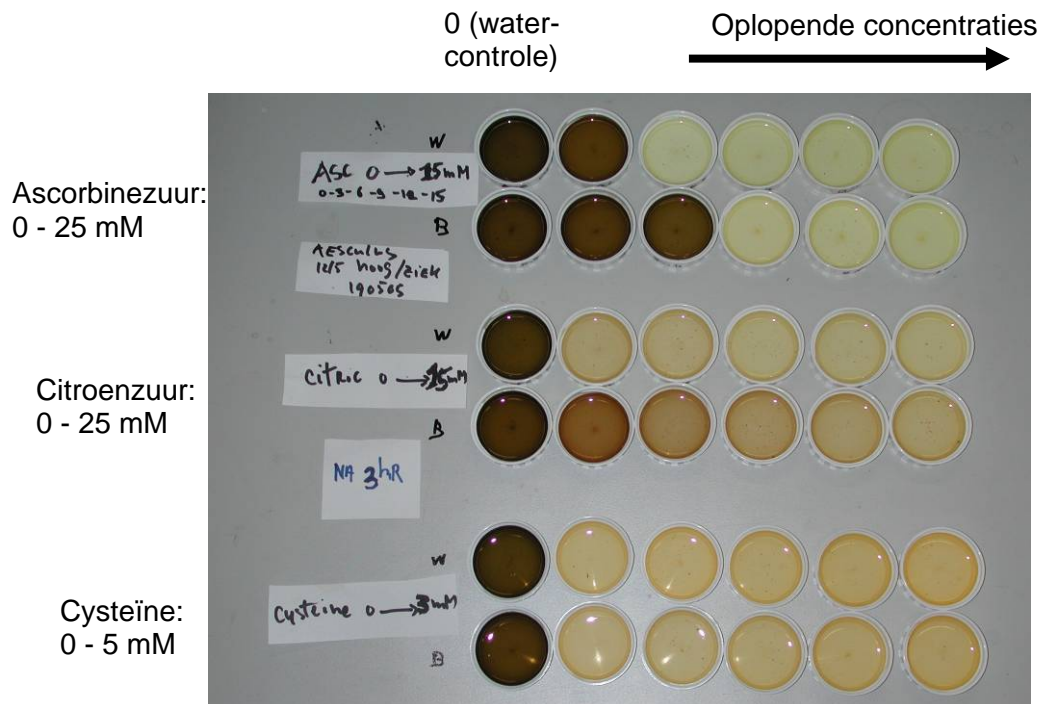
Gestart werd met het maken van extracten van monsters uit de bast van kastanjabomen uit Houten, waarbij met behulp van een spectrofotometrische bepalingmethode met catechol als substraat, snel duidelijk werd dat er in kastanjeweefsel inderdaad een hoge activiteit van het polyfenoloxydase kon worden aangetoond. Wanneer een extract gemaakt werd of wanneer de cellen van een bastmonster werden leegemaakt door ze te bevriezen, bleek een intense bruinverkleuring ook plaats te vinden zonder toegevoegd substraat: blijkbaar is ook het substraat voor de polyfenoloxydase-reactie (fenolen) ruim aanwezig. Dit bleek ook wanneer met Folin-reagens de aanwezigheid van fenolen in kastanjemonsters werd getest.

Nadat op deze wijze was aangetoond dat het polyfenoloxydase-systeem in kastanjemonsters voorkwam (en zeer actief was), heeft het onderzoek zich vooral gericht op het testen van remstoffen, met name met het oog op toepassing van dergelijke remstoffen in de praktijk.

In eerste testen werden de effecten van NaF, cysteïne, citroenzuur (pH-verlaging), hexylresorcinol, ferulinezuur en een verlaagde zuurstofconcentratie onderzocht op extracten van bastmonsters, om de effectiviteit in het onderdrukken van de polyfenoloxydase-reactie van verschillende concentraties remstof nader te onderzoeken. Snel werd voor die remstoffen, die veelbelovend waren echter overgegaan op de ontwikkeling van een "*in-vivo*"-test, die op twee wijzen werd uitgevoerd:

- (a) het testen van de effecten van verschillende concentraties NaF, cysteïne, citroenzuur en

ascorbinezuur op de ophoping van bruine kleurstoffen na toediening van extern catechol-substraat aan door kastanjemonsters aan water afgegeven polyfenoloxydase. Figuur 15 laat hiervan een voorbeeld zien: op deze manier kan snel een effect op de verbruiningssnelheid van deze stoffen worden getest.



Figuur 15: Effecten van verschillende concentraties NaF, cysteine, citroenzuur en ascorbinezuur op de ophoping van bruine kleurstoffen na toediening van extern catechol-substraat aan door kastanjemonsters aan water afgegeven polyfenoloxydase.

De aandacht werd geconcentreerd op deze vier remstoffen omdat drie ervan (ascorbinezuur [vitamine C], cysteine [een aminozuur] en citroenzuur) niet-giftige stoffen zijn, die eenvoudig kunnen worden toegepast, terwijl enkele van deze stoffen op meerdere plaatsen ingrijpen in het boven geschetste polyfenoloxydase-schema: ascorbinezuur en cysteine remmen polyfenoloxydase, voorkòmen de vorming van chinon en grijpen ook aan op de vervolgreacties/zuurstofradicalen, NaF remt polyfenoloxydase en citroenzuur zorgt via een verlaagde pH voor een verminderde polyfenoloxydase-activiteit.

- (b) In een tweede type *in-vivo* test werden de verbruingsreacties aan stukjes kastanjebast onder laboratorium-condities geremd met behulp van deze remstoffen. Hierbij werd zowel gewerkt met extern substraat (catechol) als met het eigen (fenolische) substraat.

Controlestukjes werden oranjebruin (door de reactie van het kastanje polyfenoloxydase in de stukjes met het eigen fenolsubstraat) of zwartbruin (wanneer extra catechol als substraat werd toegevoegd). Het bleek dat met name ascorbinezuur in staat was om ook na een langere periode de reactie te blokkeren. Daarnaast waren ook NaF, citroenzuur en cysteine actief. Daarom werden deze stoffen gekozen om in de veldproeven te gebruiken.

Veldproeven

Middelen

In het laboratorium bleken diverse stoffen in staat de bruiningsreactie van ziek materiaal een halt toe te roepen of sterk te vertragen. Op grond van deze proeven zijn vier middelen geselecteerd die op bomen in het veld getest werden. Deze middelen zijn ascorbinezuur, cysteïne, citroenzuur en NaF. Ook combinaties van middelen werden getest omdat de geteste stoffen verschillen in werkingsmechanisme en daardoor elkaars werking zouden kunnen versterken, wanneer lange termijn effecten moeten worden verkregen. Naar aanleiding van literatuuronderzoek naar stamtoepassingstechnieken (bark application) van hormonen aan (fruit)bomen werden de middelen op twee verschillende manieren toegepast: gemengd met een lanoline-pasta of als spuitvloeistof, waarbij verschillende uitvloeiers aan de spuitvloeistoffen werden toegevoegd. Uitvloeiers zijn zeep-achtige stoffen die de oppervlaktespanning verlagen en daardoor de opname van stoffen verbeteren. Om de gewenste concentraties van middelen in lanoline-pasta te krijgen werden de middelen in tienmaal te hoge concentratie opgelost in water en één deel van deze oplossing werd vervolgens goed gemengd met negen delen vloeibaar gemaakte lanoline.

Behandeling bomen

In totaal werden 140 zieke bomen langs de rondweg van de gemeente Houten behandeld. Deze bomen hadden een stamdiameter van ongeveer 30 cm. Elke behandeling werd in vijfvoud uitgevoerd (vijf blokken). Ook werden controle behandelingen (met alleen water + uitvloeier of lanolinepasta, zonder remstoffen) uitgevoerd. Lanolinepasta-behandelingen werden met een plamuurmes op zieke plekken op de stam gesmeerd (figuur 16). Spraybehandelingen werden met een rugspuit op de stam gespoten (figuur 17), waarbij de gehele stam vanaf de grond tot aan het begin van de kroon met een dunne laag vloeistof bedekt werd. In totaal werden de bomen vier keer behandeld: week 26 (1 juli 2005), week 29 (19 juli 2005), week 31 (5 augustus 2005), week 34 (26 augustus 2005).



Figuur 16: Behandeling van een zieke plek met lanolinepasta met daarin toevoegingen die de bruiningsreactie mogelijk doen stoppen.



Figuur 17: Bespuiting van de stam van een aangetaste paardenkastanje met een spray, bestaande uit een uitvloeier en in water opgeloste middelen die de bruiningsreactie mogelijk doen stoppen.

Waarnemingen

Op 14 juli 2005 zijn de kronen van alle bomen gefotografeerd. Deze foto's kunnen dienen als referentiemateriaal om uitspraken te kunnen doen van een mogelijk effect van een behandeling op het algehele beeld van een boom. Daarnaast zijn alle bomen kort geclassificeerd met de mate van aantasting (niet, licht, matig, ernstig, bastscheuren). Ook is vermeld of een aantasting van dit jaar was (lichtbruine vlekken) of van voorgaande jaren (donkerbruine tot zwarte vlekken). Het fotograferen van alle bomen is op 13 september 2005 herhaald. Op 28 oktober 2005 zijn de stammen van alle bomen beoordeeld op nieuwe aantasting (niet, licht, matig, ernstig) sinds de laatste behandeling van de bomen op 26 augustus 2005. Foto 's van de kroon zijn eind oktober niet meer gemaakt, omdat een groot deel van het blad reeds bruin was.

Van elke boom in de veldproef is een kroonopname gemaakt kort na start van de proef.

Resultaten en discussie.

Laboratoriumproeven

In de onderzochte kastanje monsters bleek een hoge polyfenoloxydase-activiteit voor te komen, ook in vergelijking met andere plantaardige systemen (tulp, appel).

Ingevroren en weer ontdooid monsters lieten een sterke polyfenoloxydase-verbruinings-reactie zien, zowel bij gezond als bij ziek weefsel, en zowel met extern als met eigen substraat. Dit komt overeen met de verwachting dat de cellen een actief polyfenoloxydase-verbruinings-systeem bezitten, waarvan de componenten met elkaar reageren als de cellen kapotgaan; ook het substraat voor de reactie is blijkbaar voldoende aanwezig. Koelkast-monsters, waarvan de cellen niet kunstmatig zijn 'lekgeprik't door een vries-dooi-cyclus vertonen alleen een snelle verbruining bij gebruik van 'ziek' kastanje-materiaal (dat blijkbaar al veel kapotte cellen bevat); monsters van 'gezonde' plekken verbruinen veel minder omdat het polyfenoloxydase uit de cellen niet beschikbaar is voor de reactie.

In een oriënterende proef bleek dat cysteïne en NaF in staat waren de polyfenoloxydase-activiteit sterk te remmen. Ook een verlaagde pH via citroenzuur en verlaagde zuurstofconcentratie vertoonden een remmend effect.

In de vervolgprouf, waarin effecten van verschillende concentraties NaF, cysteïne, citroenzuur en

ascorbinezuur getest werden op verbruinende kastanjemonsters, bleken de vier remstoffen te werken, waarbij de hoogste concentraties cysteïne en citroenzuur en met name de hoogste concentratie ascorbinezuur, na vijf dagen nog weinig verbruining vertoonden in vergelijking met de controles en lagere concentraties van de remstoffen; deze waren na vijf dagen allen donker bruinzwart gekleurd.

Veldproeven

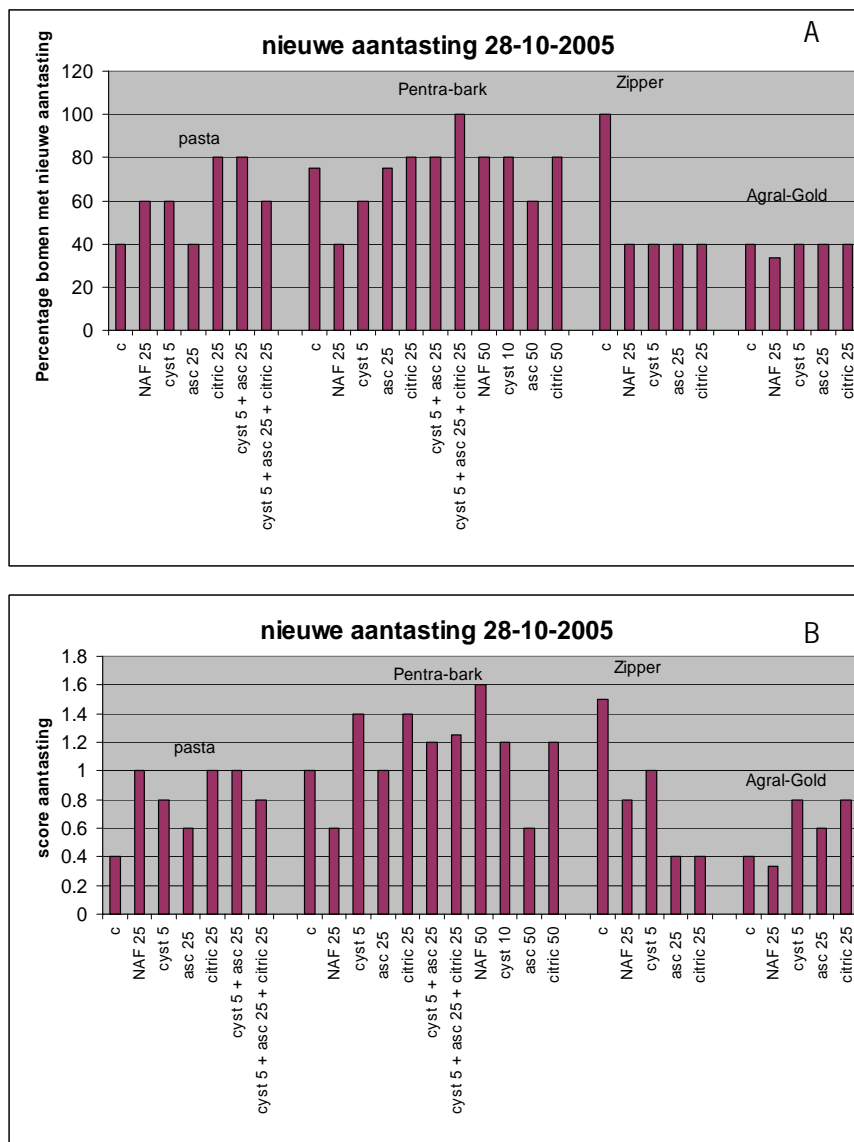
Aan het begin van de veldproef zijn alle bomen kort geclassificeerd (tabel 1).

Tabel 1: Korte classificatie van de bomen in de veldproef fysiologie in de gemeente Houten bij start van de proef.

Omschrijving	Aantal bomen
Lichte aantasting	91
Matige aantasting	49
Bastscheuren	19
Aantasting 2005	20
Aantasting 2004/eerder	24
Aantasting 2005 + aantasting 2004/eerder	96

Aan de kroon van de bomen was half september en eind oktober niet te zien of bepaalde behandelingen herstel van de boom geven. Lastig daarbij is dat een mogelijk effect van behandelingen gemaskeerd kan worden door reeds vroeg intredende herfstverschijnselen en aantasting door de kastanjemineermot. De kans is groot dat volgend voorjaar wel een uitspraak te doen is of bepaalde behandelingen effect hebben gehad. De stamwaarnemingen van 28 oktober 2005 lieten zien dat op 40% van de bomen geen nieuwe aantasting te zien was en op 60% van de bomen wel. Bij nieuwe aantasting ging het vaak om clusters van kleine plekje. Opvallend daarbij was dat veel nieuwe aantasting aan de schaduwzijde van de boom te zien was, terwijl eerdere aantasting vaak aan de zonzijde te zien was. Op plekken waarop lanoline gesmeerd was, was meestal geen uitbreiding te zien. Dat gold echter ook voor de controle, waarbij lanoline zonder remstoffen aangesmeerd was.

Figuur 18 geeft effecten van de geteste behandelingen op het optreden van nieuwe aantasting weer. In vergelijking met de verschillende controlebehandelingen, gaven de diverse remstoffen geen duidelijke vermindering van de aantasting te zien. Voortzetting van behandeling en waarneming in het voorjaar is noodzakelijk om met meer zekerheid uitspraken te kunnen doen over een mogelijk effect van de geteste remstoffen, al dan niet in combinatie.



Figuur 18: Effecten van verschillende behandelingen met de remstoffen NaF, cysteïne, ascorbinezuur en citroenzuur op nieuwe aantasting tussen de behandeling van de bomen in de periode 1 juli - 26 augustus en waarneming op 28 oktober 2005. De remstoffen (getallen geven de concentratie in mM weer) werden toegediend in een lanolinepasta of als spuitvloeistof met verschillende uitvloeiers (Pentra_Bark, Zipper, Agral-Gold). C geeft telkens een controle-behandeling zonder remstoffen weer, dus alleen pasta of water met de verschillende uitvloeiers. Figuur A: Percentage bomen met nieuwe aantasting, ongeacht de ernst van deze nieuwe aantasting. Figuur B: de mate van nieuwe aantasting is meegenomen, berekend als gemiddelde score van 5 bomen, waarbij als volgt beoordeeld werd: 0= geen nieuwe aantasting, 1 = licht, 2 = matig, 3 = ernstig.

Conclusie

Duidelijk is geworden dat in de kastanjabast de verschillende componenten van het polyfenoloxydase-verbruiningsreactie-systeem actief zijn en dat het mogelijk is om in deze reacties in te grijpen. Een aantal remstoffen met weinig te verwachten neveneffecten (ascorbinezuur, citroenzuur, cysteïne, NaF)

zijn getest op laboratoriumschaal en bleken in staat om de verbruiningsreactie geheel of gedeeltelijk te blokkeren.

Deze stoffen zijn vervolgens ook in het veld op zieke kastanjabomen getest in verschillende concentraties en combinaties en met behulp van verschillende toedieningstechnieken. De bomen zijn vier maal behandeld. Het is nog te vroeg om conclusies te trekken over een mogelijk effect in het veld. Komend voorjaar (2006) moet daarin meer inzicht komen.

6 Inventarisatie en groeiplaatsonderzoek

Projectleider: Bart Stoffer (IBA)

Projectmedewerkers: Dr. Ir. Jelle Hiemstra (PPO), Ir. Jitze Kopinga (Alterra)

6.1 Landelijke verspreiding van bloedende paardenkastanjabomen

Dit deel van onderzoek is gericht op het verkrijgen van een representatief beeld van de verspreiding van de bloedingsziekte in paardenkastanjes in geheel Nederland. Het onderzoek is uitgevoerd door middel van een enquête onder groenbeheerders van de Nederlandse gemeenten. Deze werden verzocht hun kastanjabomen op een gestandaardiseerde methode te controleren op het voorkomen en de ernst c.q. aard van het aantastingbeeld.

Doel

Een representatief beeld te krijgen van de landelijke verspreiding en de mate van aantasting en van de eventuele invloed van een beperkt aantal boom- en groeiplaats- kenmerken op de aantasting.

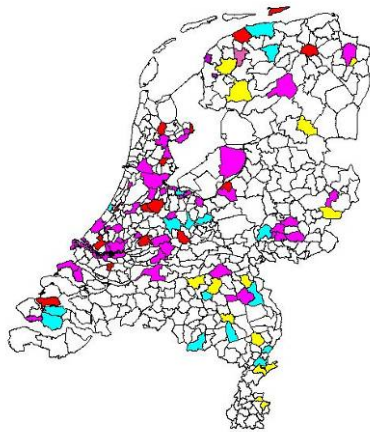
Materiaal en methoden

Op basis van gegevens van de Vereniging Nederlandse Gemeenten zijn in april 2005 de 467 gemeenten van Nederland aangeschreven. Op basis van een korte vragenlijst is om deelname aan de inventarisatie verzocht. Hierop gaven 242 gemeenten aan te willen meewerken. Deze gemeenten ontvingen een set inventarisatieformulieren, vergezeld van informatie over het aantastingsbeeld en instructie/handleiding voor de wijze van beoordeling en categorisering. In juni 2005 waren 60 sets ontvangen. Door een bericht per e-mail of telefoon zijn de andere gemeenten medio juni nogmaals herinnerd aan de inventarisatie. Op 10 juli 2005 is de inname-periode beëindigd om tijdige verwerking mogelijk te maken. Er was toen van 93 gemeenten een bruikbare set gegevens ontvangen, dwz. 38 % van de uitgezette enquêteformulieren.

Alle voor 10 juli ontvangen gegevens zijn handmatig omgezet in Excelbestanden. Vervolgens zijn deze statistisch bewerkt en gevisualiseerd op een plattegrond van Nederland. Een eerste versie hiervan werd in juli geplaatst op de website www.kastanjeziekte.wur.nl. Half augustus is een update hiervan geplaatst op de website. Bij de afsluiting van het inventarisatie-onderzoek zijn de resultaten per gemeente en provincie samengevat en gevisualiseerd op een kaart van Nederland (figuur 19 en 20).



Figuur 19: Overzicht van de Nederlandse gemeenten (groene kleur) die hebben aangegeven om mee te doen aan de landelijke inventarisatie.



Verklaring van de kleurcodering:

- Geel: minder dan 10 % van het aantal geïnventariseerde bomen is aangetast
- Blauw: tussen 10 en 25 % van het aantal bomen is aangetast
- Paars: tussen 25 en 50 % van het aantal bomen is aangetast
- Rood: meer dan 50 % van het aantal bomen is aangetast

Figuur 20: Overzicht van het percentage per gemeente van de geïnventariseerde paardenkastanjes, waarop ziekteverschijnselen zijn waargenomen. N.B. gemeenten die gegevens van minder dan 20 bomen hebben opgestuurd zijn hierin niet opgenomen.

Resultaten

Geografische spreiding

Tot 2004 waren de meldingen van bloedingsziekte beperkt tot het gebied dat zich globaal bevindt ten westen van de lijn Groningen - Breda. In het oosten van het land werd het aantastingsbeeld vrijwel niet gemeld. Uit de huidige inventarisatie blijkt dat het westen van Nederland nog steeds grote aantallen aangetaste bomen kent, maar dat ook paardenkastanjes in Oost-Nederland niet vrij zijn van deze aantasting. In hoeverre dit zou kunnen wijzen op een mogelijke oost- en zuidwaartse verspreiding van de ziekte door Nederland kan op basis van de gegevens echter niet worden vastgesteld.

De meeste zieke bomen staan in Noord- en Zuid-Holland. Meer dan 30 % van alle hier geïnventariseerde paardenkastanjes is aangetast. Een vergelijkbaar percentage, maar lagere aantallen paardenkastanjes vinden we in Utrecht, Gelderland, Flevoland, Groningen en Friesland. De overige provincies hebben veel minder ziektegevallen gerapporteerd. Opvallend zijn nog de gegevens van Brabant. Na Noord- en Zuid-Holland heeft deze provincie de meeste kastanjes. Toch is 'slechts' 16% aangetast.

Soorten en cultivarverschillen

De witte paardenkastanje (*Aesculus hippocastanum*) is ernstig aangetast. De cultivar 'Pyramidalis' is met een ziektepercentage van 45% van het totale aantal, het meest aangetast. Gevolgd door de cultivar 'Baumannii' met 34%. De soort zelf staat op 31%. Iets lagere percentages zijn gevonden bij de rode paardenkastanje (*Aesculus x carnea*). Van de cultivar 'Briotii' en de hybridesoort zelf is één van de vier bomen in Nederland ziek.

Naast de witte en rode paardenkastanje is, weliswaar in veel mindere mate, nog een aantal andere soorten of cultivars gemeld. In rode en gele pavia (*Aesculus pavia* en *A. flava*) is wel aantasting gemeld maar deze soorten komen met circa 200 individuen per soort verhoudingsgewijs weinig voor. Wél is het aantal aangetaste bomen binnen deze soorten opvallend laag. Van de soorten *A. indica*, *A. glabra* en *A. parviflora* en van de hybridesoort *A. x mutabilis* zijn slechts enkele exemplaren gemeld, alle niet zichtbaar aangetast.

Leeftijd boom

Op de inventarisatieformulieren kon de diameter van de bomen worden aangegeven in vier klassen (gemeten op 130 cm boven het maaiveld). Uit de resultaten blijkt dat de bomen met een stamdoorsnede groter dan 20 cm het meest zijn aangetast. In de categorie beneden 20 cm is "slechts" 20% aangetast, terwijl in alle drie categorieën daarboven het aantastingspercentage ruim boven de 30% ligt. De meeste

bomen verkeren nog in het beginstadium van aantasting (lichte aantasting).
Opvallend is het hoge percentage ernstig aangetaste bomen in de diametercategorie 20-35 cm.

Groeiplaats

De verschijnselen van bloedingsziekte blijken het meest voor te komen op klei- en veengronden, en aantoonbaar minder op zandgronden. Echter door de geografische spreiding mogen nog geen harde conclusies worden getrokken. Pas wanneer er voldoende gegevens voorhanden zijn van gemeenten waarbinnen paardenkastanjes zowel op zand- als veen/kleigronden voorkomen kan hierover na statistische analyse een meer harde uitspraak over worden gedaan.

Bij eenderde van het aantal geïnventariseerde bomen komt onderbegroeiing voor. Uit de gegevens blijkt vooralsnog geen duidelijke relatie met het optreden van bloedingsziekte. Ook de aan- of afwezigheid van verharding rond de boom lijkt weinig invloed te hebben.

Invloed grondwater

Veruit de meeste bomen staan op locaties waar hun wortels het grondwater kunnen bereiken. Deze bomen lijken wat vaker ziekteverschijnselen te hebben dan paardenkastanjes in een hangwaterprofiel, maar rekening houdend met de mate en aard van eventuele inschattingfouten door de waarnemers kan aan dit verschil vooralsnog geen conclusies worden ontleend.

Een duidelijk verschil in aantasting blijkt uit de gegevens met betrekking tot stagnatie van water op het maaiveld. Daar waar dit 'soms' voorkomt treden de ziekteverschijnselen veel vaker op dan op plaatsen die droog blijven of die vaak onder water staan. Ook hier moet echter rekening worden gehouden met verschillen in de beoordeling c.q. inschatting door de waarnemers tussen "soms" en "ja" en zijn harde conclusies vooralsnog niet te trekken.

Conclusies

- Bloedingsziekte komt in heel Nederland voor. De grootste aantallen zieke bomen staan in de provincies Zuid Holland, Noord Holland, Utrecht en Noord-Brabant.
- *Aesculus hippocastanum* en de cultivars daarvan worden het meest aangetast (31-45%), gevolgd door *A. x carnea* en haar cultivars (13-28%). De overige *Aesculus* soorten komen veel minder voor, maar incidenteel is ook aantasting gemeld in *A. pavia* en *A. flava*.
- Bloedingsziekte komt het meest voor in bomen met een diameter groter dan 20 cm; in alle diktecategorieën boven die maat is het aantastingspercentage meer dan 30%. Het grootste aantal zwaar aangetaste bomen komt voor in de categorie 20-35 cm (25%).
- De ziekte is gemeld op alle bodemsoorten, maar op zand (aantastingspercentage 25%) komt ze minder voor dan op klei of veen (elk 35%). De invloed van de grondsoort op de ontwikkeling van de ziekte kan hieruit echter niet zonder meer worden afgeleid, omdat ook de geografische ligging invloed kan hebben op het ziektebeeld. Veel meldingen komen uit gebieden waar overwegend veen- en kleigronden (en geen zandgronden die men ter onderlinge vergelijking zou kunnen gebruiken) van nature voorkomen.
- De mogelijke invloed van overige standplaatsfactoren (watervoorziening, wateroverlast, onderbegroeiing) kwam uit de inventarisatie onvoldoende eenduidig naar voren.

6.2 Groeiplaatsonderzoek paardenkastanjabomen

Op basis van resultaten van de inventarisatie naar het voorkomen en de ernst van de aantasting van kastanjabomen door de bloedingsziekte vindt een aanvullend en meer gedetailleerd groeiplaatsonderzoek plaats.

Doel

Het vinden van mogelijke correlaties tussen het voorkomen van de bloedingsziekte, de conditie van de bomen en boven- en ondergrondse omgevingsfactoren.

Materiaal en methoden

Een selectie wordt gemaakt van 10 objecten met zoveel mogelijk variatie in aantasting en zo mogelijk een goede geografische spreiding. Objecten worden gekozen met alleen de (veel voorkomende) *Aesculus hippocastanum* en alleen diens cultivar 'Baumannii' teneinde de eventuele invloed van genetische variatie te beperken tot alleen die van de onderstam.

Het accent ligt bij dit onderdeel van het onderzoek op invloed van de conditie van de bomen op de aantasting en de relatie met (ongunstige) standplaatsfactoren. Het onderzoek moet inzicht geven in de mate waarin deze aspecten een rol spelen bij de bloedingsziekte en kan tevens een indicatie geven voor beheersmaatregelen zoals verbetering van een aantal standplaatsfactoren waarmee het ziekteproces kan worden beïnvloed.

Ieder object bevat ten minste 7 bomen in elk van de vier aantastingsklassen; 'niet-licht-matig-zwaar'. Per object worden 28 bomen aan een nauwkeurig onderzoek onderworpen, waarbij van iedere boom 14 parameters worden genoteerd met betrekking tot de conditie en verschijningsvorm van de boom. Per aantastingsklasse worden 6 parameters met betrekking tot de groeiplaats genoteerd en wordt de profielopbouw van de doorwortelde bodem beschreven.

Opname bovengrondse kenmerken:

Geselecteerde bomen worden bovengronds beoordeeld op: schotlengte, bladgrootte, visuele beoordeling, stamdiameter, mate van aantasting door de kastanjemineermot, aanwezigheid van aantasting door *Guignardia*, inschatting (in %) van de "bedekkingsgraad" van de ziekte op het takvrije stangedeelte, beoordeling van de "versheid van de aantastingverschijnselen, aan- of afwezigheid van wondcallusvorming, boomhoogte, kroonbreedte, opkroonhoogte

Opname groeiplaatskenmerken:

Type groeiplaats (verhard, onverhard), vorm/ afmeting boomspiegel, onderbegroeiing, waterstagnatie op maaiveld?, kunnen de wortels bij het grondwater?, expositie ten opzichte van de wind gerelateerd aan de aanwezigheid van "windobstakels", expositie ten opzichte van de zon, het voor wortelgroei beschikbare bodemprofiel wordt aan de hand van een grondboring (edelmanboor) beschreven met een maximumdiepte van 120 cm.

Gegevens worden vastgelegd in gestandaardiseerde opnamelijsten.

Resultaten

Het groeiplaatsonderzoek wordt nog opgestart.

7 Communicatie

Coördinator/woordvoerdster: Dr.ir. Marijke Dijkshoorn-Dekker (PPO)
Drs. Bouke de Vos (WUR), Mariëtte Pasma (Gemeente Den Haag)

De bloedingsziekte 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; de wethouder van Den Haag heeft zich uitgesproken voor groter draagvlak; de gemeenten hebben zich in het begin van het optreden van de werkgroep Aesculaap garant gesteld voor uitvoering van het onderzoek. De minister van LNV heeft uitgesproken de bezorgdheid te delen en heeft te kennen gegeven zich verantwoordelijk te voelen voor het onderzoek naar de oorzaak en heeft daarvoor begin april 2005 €275.000 beschikbaar gesteld.

Er is behoorlijke belangstelling bij de gemeenten en onder de media en het grote publiek. Aesculaap heeft zich er voor ingezet om daar adequaat op te reageren. 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 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 inventariserende, de Vereniging Stadswerk, 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 bekend worden van Aesculaap, het creëren van draagvlak en het bereiken van de gemeenten voor het inventariseren van het kastanjabestand in hun gemeente. In een later stadium 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.

Aesculaap heeft sinds eind december 2004 een eigen website: www.kastanjeziekte.wur.nl.

Op 4 april 2005 is er door middel van twee persberichten, van het ministerie van LNV en van Wageningen UR namens Aesculaap, landelijke aandacht gegeven aan de kastanjeziekte. Hierin zijn ook gemeenten opgeroepen tot inventarisatie van hun kastanjabestand. Aesculaap is sindsdien veelvuldig via verschillende kanalen (telefoon, Internet, email, bezoeken, brieven) benadert door media en particulieren. Dat heeft in een kleine tien maanden geleid tot bijna 300 artikelen in de Nederlandse kranten en tot bijna twintig optredens op radio en televisie.

In mei 2005 is de eerste informatie vanuit het onderzoek naar buiten gegaan door middel van een elektronische nieuwsbrief. Uiteindelijk werd het grote publiek evenals de media via de website op de hoogte gebracht. Volgende elektronische nieuwsbrieven zijn verzonden in juni en september.

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, met meer dan een paar duizend bezoekers per maand. Op deze site is ook de 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.

Op 14 september is een tweede persbericht uitgegaan. Hierin werden de resultaten van het inventarisatieonderzoek bekend gemaakt, evenals de mogelijke veroorzaker van de bloedingsziekte. Ook hierop was het aantal reacties groot.

Verder zijn er in het kader van het programma presentaties gehouden op onder andere het ISB overleg en de boomteelttechniekdagen.

Producten

Producten opgeleverd gedurende het programma Aesculaap:

- website: www.kastanjeziekte.wur.nl
- persbericht voor het neerzetten van Aesculaap en het bereiken van alle gemeenten in Nederland
- persbericht eindrapport landelijke inventarisatie en mogelijke veroorzaker bloedingsziekte
- het bedienen van verschillende media, schrijvende pers, televisie en radio op regionaal en nationaal gebied.
- het communicatieplan
- 2 brieven richting gemeenten voor het oproepen tot inventarisatie van kastanjebestand
- het beantwoorden van vele vragen van particulieren/gemeenten en andere partijen in het groen door middel van www.kastanjeziekte@wur.nl
- centrale persoverzicht
- het houden van presentaties op verschillende bijeenkomsten
- draaiboek/protocol voor bekendmakingen eindresultaten onderzoek naar de oorzaak
- vakbladartikelen