

Bloedingsziekte in paardenkastanje.

Een inventarisatie van het voorkomen van bloedingsziekte in *Aesculus* op laanboombedrijven in 2010.

B. van der Sluis, L. Slingerland en F. van Kuik

© 2012 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. 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 DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit.

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

De bomen- en vaste plantensector investeert in dit project via het Productschap  Tuinbouw

PT-nummer 13930.06.

Projectnummer: 32 361 222 00

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit

Adres : Prof. Van Slogterenweg 2
: Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252 - 46 21 21

Fax : 0252 - 46 21 00

E-mail : info.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

1	INLEIDING	5
2	DOELSTELLING	5
3	AANPAK	7
4	MATERIAAL EN METHODE	9
4.1	Methodiek bemonstering	9
4.2	Beoordeling	10
4.3	PCR-methode	10
5	RESULTATEN	11
5.1	Inventarisatie	11
5.2	Monsters PCR	17
6	CONCLUSIES	19
7	AANBEVELINGEN	21

1 Inleiding

De kastanjeziekte in *Aesculus* wordt veroorzaakt door een bacterie (*Pseudomonas syringae* pv *aesculi*). De ziekte is wijd verspreid aanwezig in paardenkastanjabomen in het openbaar groen in Nederland en lijkt verder toe te nemen.

In voorgaande jaren is onder coördinatie van Aesculaap onderzoek gedaan naar de kastanjeziekte. Het onderzoek werd gefinancierd door LNV. Uit dat onderzoek is achterhaald wat de veroorzaker is en er zijn richtlijnen opgesteld hoe boombeheerders moeten omgaan met zieke kastanjabomen. Verder zijn proeven met middelen gedaan die mogelijk de bloedingen kunnen tegengaan. Op basis van het onderzoek zijn er aanwijzingen dat de bacterieziekte o.a. via de bloeiwijze de boom binnendringt. Ook bestaat het vermoeden dat jonge bomen ook al besmet zijn met de bacterie, zonder duidelijk zichtbare symptomen.

Anno 2010 neemt de bloedingsziekte in de groene ruimte weer toe. De verwachting is dat de ziekte niet alleen in het openbaar groen voorkomt, maar ook op kwekerijen. Dit is in de vergadering van de cultuurgroep laanbomen in november 2009 bevestigd. De ziekte zou niet voorkomen bij jonge bomen, maar ongeveer vanaf de maat 25-30, 30-35. In dit consultancy-onderzoek wordt een groot aantal paardenkastanjabomen op kwekerijen zorgvuldig bekeken op aanwezigheid van bacterieziektesymptomen. Eventuele bloedingen worden geregistreerd en door middel van bemonsteringen wordt in het laboratorium onderzocht of de veroorzaker van de bloedingsziekte in kastanje, *P. syringae* 'Aesculi' kan worden aangetoond.

2 Doelstelling

De bloedingsziekte in *Aesculus* wordt veroorzaakt door een bacterie (*Pseudomonas syringae* pv *aesculi*). Er zijn steeds meer berichten dat de ziekte zich ook manifesteert in de teelt. In dit consultancyonderzoek wordt een inventarisatie gedaan op diverse kwekerijen.

3 Aanpak

Op vier kwekerijen, verdeeld over de belangrijkste teeltcentra, zijn paardenkastanjabomen beoordeeld op bloedingsziektesymptomen. Tellingen zijn gedaan en foto's zijn genomen. Verder zijn circa 30 monsters van de bast genomen, van zowel aangetaste als van niet aangetaste bomen. De monsters zijn geanalyseerd op aanwezigheid van de bacterie *Pseudomonas syringae* pv *aesculi* met behulp van een DNA-detectiemethode. Deze resultaten zijn samengevat weergegeven in dit rapport.



Foto 1. Teeltperceel met *Aesculus*

4 Materiaal en methode

4.1 Methodiek bemonstering

Bij een monsternamen moet voorkomen worden dat overdracht van DNA of bacteriën plaatsvindt. Daartoe wordt voor en na elke monsternamen het gebruikte materiaal ontsmet en gereinigd. Op de monsterplek wordt eerst met een mes het bovenstukje laagje van de bast gesneden. Het mes is vooraf ontsmet met 96% alcohol en gereinigd door het te flamberen. Vervolgens wordt bij grote bomen met een ontsmette en gereinigde holpijp een monster genomen. Bij kleine bomen werd met een scalpelmesje kleine stukjes weefsel uit de bast gesneden. Het monster wordt overgebracht in een afsluitbaar plastic buisje, dat van tevoren van een code is voorzien. De monsters worden zo snel mogelijk koel bewaard bij 5 -7°C. Tijdens de monsternamen draagt de uitvoerder latex- of vinyl handschoenen voor éénmalig gebruik. Na elke monsternamen worden de gebruikte handschoenen weggegooid. Het mes en de holpijp of scalpelmesje worden telkens na monsternamen ontsmet en gereinigd.

De visueel gezonde bomen worden als eerste bemonsterd. De bomen met bloedingen zijn bemonsterd op het overgangsgebied van zichtbare aantasting en waar de bast er nog gezond uitzag.



Foto 2. Bloedingsplek op de stam.



Foto 3. Stam met bloedingsvlekken.



Foto 4; Holpijp waarmee bast- en houtmonsters uit de stam worden genomen bij grote bomen.

4.2 Beoordeling

De stamaantasting is bepaald volgens de richtlijnen van Aesculaap (zie www.kastanjeziekte.wur.nl). Onderscheid is gemaakt tussen niet, licht, matig, ernstig aangetast. Opvallende verschijnselen zijn vermeld onder opmerkingen.

4.3 PCR-methode

Houtige gewassen zijn lastig te verwerken door het vezelige weefsel. De procedure voor verwerking duurt daarom langer dan bij monsters van zacht plantmateriaal.

Procedure:

- Monsters fijnmalen met lysisbuffer en stalen kogels in Retsch apparaat.
- 10 min. 65° in thermoblok.
- Centrifugeren 5 min. 13.000 rpm, bovenstaande supernatant in nieuw epje doen.
- Volgens schema King Fisher plaat vullen.
- DNA programma draaien in King Fisher.
- DNA opbrengst in nieuwe epjes doen.
- PCR inzetten met specifieke primers; controle positief en negatief meenemen.
- PCR programma draaien.
- PCR product op agarose gel brengen, Marker meenemen.
- Foto nemen van resultaat.

5 Resultaten

5.1 Inventarisatie

Tabel 1. De verdeling van alle onderzochte kastanjabomen over 5 beoordelingsklassen.

Mate van aantasting	niet aangetast	licht aangetast	matig aangetast	ernstig aangetast	twijfel*	Totaal
aantal bomen	6360	23	48	3	11	6434
percentage	98.7	0.4	0.7	0.0	0.2	100

* geen duidelijk bloedingsziektesympptomen, mogelijk dat de bloeding is veroorzaakt door andere bacteriën, zgn. Wetwood of Slime flux ziekte. Deze bomen zijn niet meegenomen in de verdere analyse.

Het totaal aantal bomen dat is beoordeeld op bloedingsziekte was 6434 bomen. De bomen stonden op 22 percelen in het land met verschillende soorten en cultivars Aesculus. Van alle 6360 Aesculusbomen waren 23 bomen licht aangetast (=0.4%), 48 bomen matig aangetast (=0.7%), 3 bomen ernstig aangetast (=0%) en bij 12 bomen (=0.2%) was er een aantasting, maar hiervan was niet duidelijk of dat door de bloedingsziekte was veroorzaakt. Het totaal aantal bomen dat bloedingsziekte vertoonde bedroeg 74, dit is 1.2% van alle Aesculusbomen.

In tabel 2 is de mate van aantasting uitgesplitst naar soort en cultivar.

Tabel 2. De mate van aantasting uitgesplitst naar soort en cultivar Aesculus.

soort	cultivar	Mate van aantasting					
		totaal	licht	matig	ernstig	totaal ziek	percentage
carnea	Plantierensis	9				0	0.0%
	Briotii	1904	9	8	1	18	0.9 %
hippocastanum	Baumannii	2899	13	18		31	1.1%
	Pyramidalis	15				0	0.0%
	sp.	1529	1	20	2	23	1.5%
indica	sp.	78		2		2	2.6%
	totaal	6434	23	48	3	74	1.2%

Van de cultivars A. carnea Plantierensis, A. hippocastanum Pyramidalis en de soort A. indica zijn relatief weinig bomen beoordeeld. Bij Plantierensis en Pyramidalis werden geen zieke bomen aangetroffen. Van alle 78 onderzochte Aesculus indica bomen waren er 2 aangetast. (=2.6%).

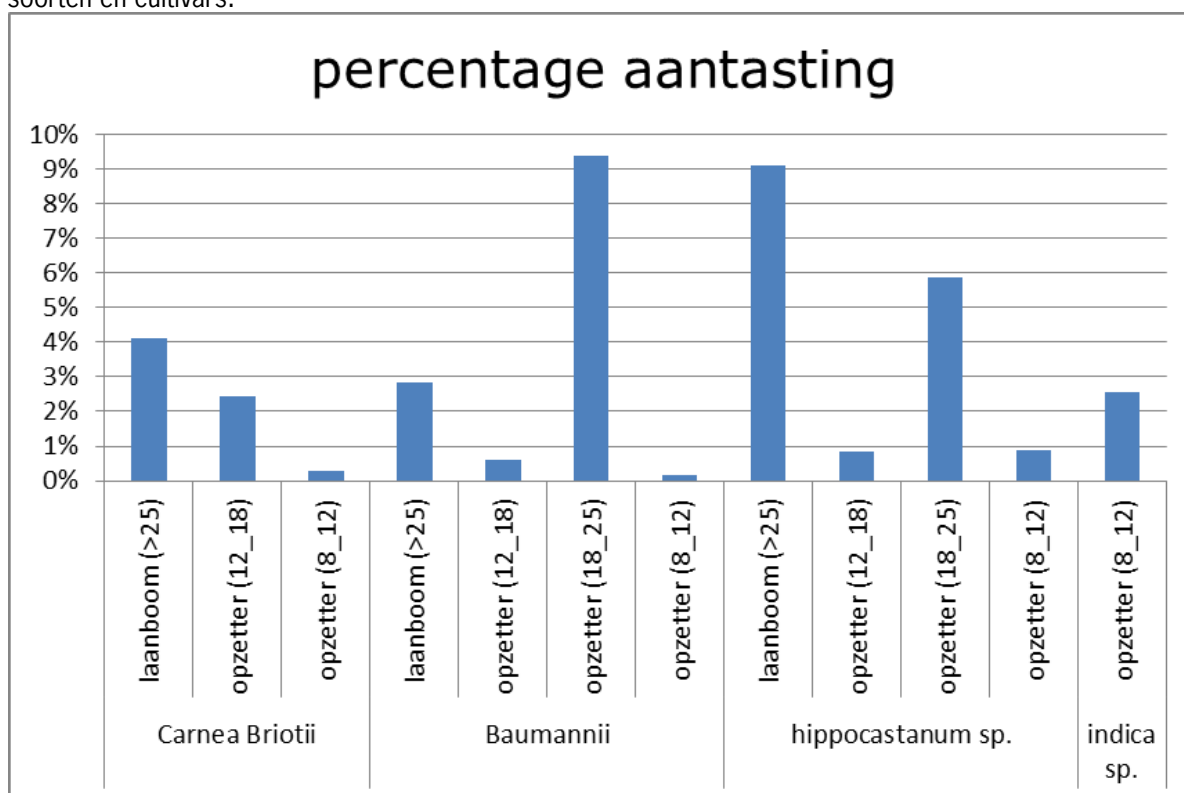
De ziektepercentages van de andere soorten en cultivars lagen dicht bij elkaar. In afnemende ziektepercentages: hippocastanum sp. 1.5%, Baumannii 1.1% en Briotii 0.9%.

In tabel 3 en figuur 1 is de verdeling van de mate van aantasting door de bloedingsziekte bij verschillende soorten en cultivars over de diverse maten van bomen weergegeven.

Tabel 3. Verdeling van de mate van aantasting over de diverse boommaten.

soort	cultivar	boommaat	percentage aantasting
carnea	Briotii	laanboom (>25)	4.1%
		opzetter (12_18)	2.4%
		opzetter (8_12)	0.3%
hippocastanum	Baumannii	laanboom (>25)	2.8%
		opzetter (12_18)	0.6%
		opzetter (18_25)	9.4%
		opzetter (8_12)	0.2%
	sp.	laanboom (>25)	9.1%
		opzetter (12_18)	0.8%
		opzetter (18_25)	5.9%
		opzetter (8_12)	0.9%
indica	sp.	opzetter (8_12)	2.6%

Figuur 1. Verdeling van de mate van aantasting over de diverse boommaten bij verschillende Aesculus soorten en cultivars.



In tabel 3 en figuur 1 is te zien dat bij A. carnea Briotii het percentage aantasting groter wordt bij de grotere maten. Bij Baumannii valt op dat de meeste aantasting te zien was bij de opzetter in de maat 18-25. Ook bij hippocastanum sp. was er een hoog percentage aantasting bij de maat opzetters 18-25. Bij hippocastanum sp. was het percentage aantasting het grootst bij de maat >25.

In tabel 4 is het aantal bomen en het ziektepercentage per bedrijf weergegeven en de uitsplitsing van de bloedingsziekte over de verschillende klassen van aantasting.

Tabel 4. Het aantal beoordeelde bomen per bedrijf en de mate van aantasting verdeeld over de verschillende klassen van aantasting.

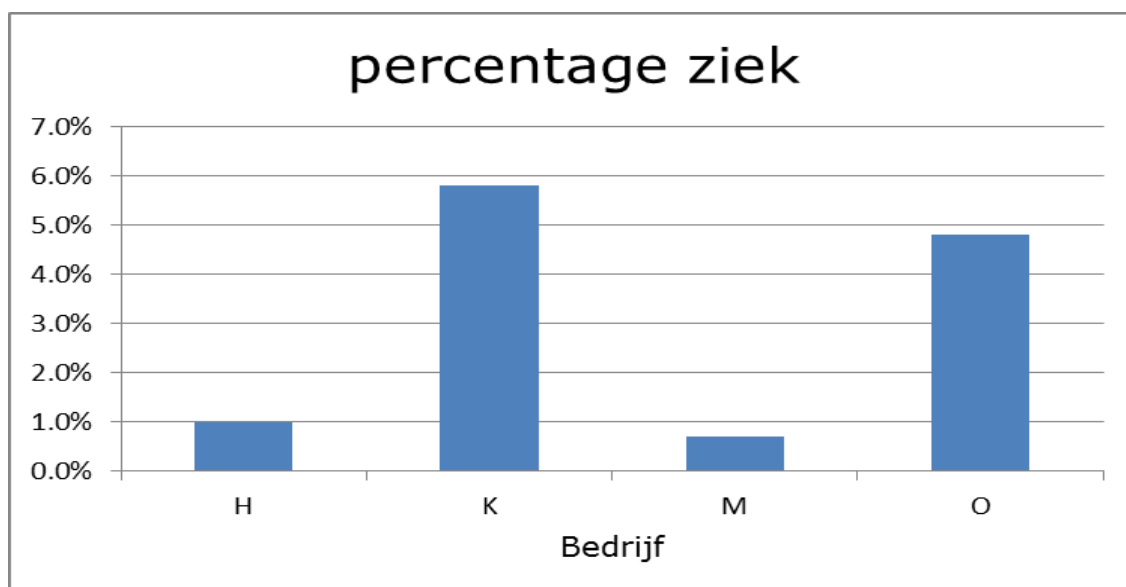
bedrijf	aantal bomen	Niet aangetast	licht	matig	ernstig	totaal ziek
H	752	99.0%	0.3%	0.7%	0.0%	1.0%
K	346	94.2%	1.7%	3.2%	0.9%	5.8%
M	5049	99.3%	0.2%	0.5%	0.0%	0.7%
O	287	95.2%	1.7%	3.1%	0.0%	4.8%

De meeste aangetaste bomen op de bedrijven vielen in de categorie matig aangetast. Er werden heel weinig bomen beoordeeld als ernstig aangetast.

De laatste kolom geeft het percentage zieke bomen aan. Hierin wordt geen onderscheid gemaakt tussen de mate van aantasting. Het ziektepercentage op bedrijf K bedroeg 5.8% en op bedrijf O was dat 4.8%. De ziektepercentages op bedrijf H en M waren een stuk lager nl. 1 resp. 0.7%.

In figuur 2 is het totale ziektepercentage nog eens weergegeven per bedrijf.

Figuur 2. Percentage aangetaste bomen van 4 bedrijven.



Figuur 2 laat zien dat het percentage bomen dat is aangetast door de bloedingsziekte varieerde tussen de bedrijven.

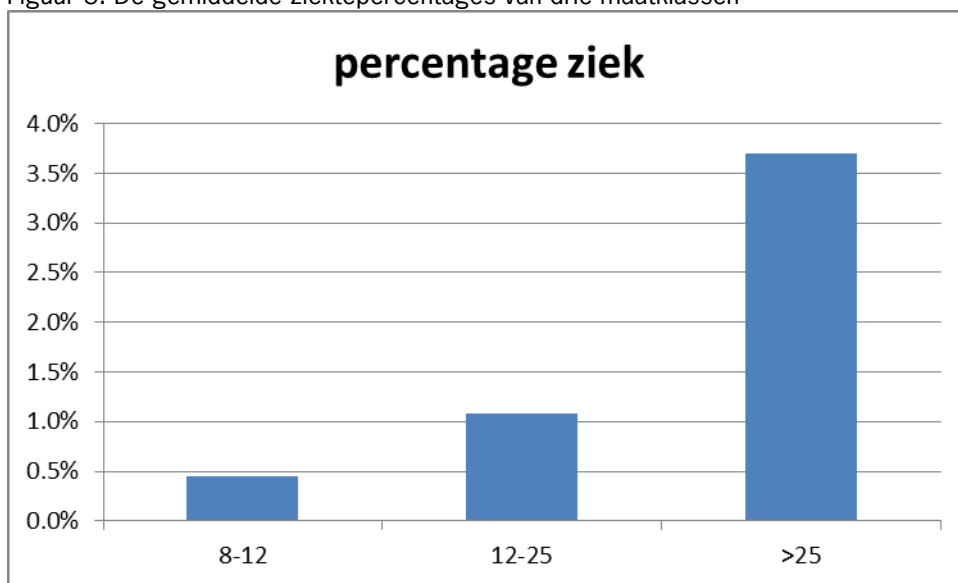
De meeste bomen van bedrijf H vielen in de maat 12_18. De bomen van bedrijf K vielen allemaal in de maat >25. Op bedrijf M vielen de meeste bomen in de kleinere maat 8_12 en op bedrijf O vielen de meest in de grotere maat >25.

De verschillen in ziektepercentages zijn waarschijnlijk terug te voeren op de maatverdeling per bedrijf. De bedrijven met de grootste aantasting hebben relatief veel grotere maten en de bedrijven met de kleinste aantasting hebben relatief veel bomen in de kleinere maten.

Tabel 5. Het aantal zieke bomen en het percentage zieke bomen per boommaat.

Boommaat	aantal	aantal ziek	percentage ziek
8-12	3789	17	0.4%
12-25	1564	17	1.1%
>25	1081	40	3.7%
totaal	6434	74	1.2%

Figuur 3. De gemiddelde ziektepercentages van drie maatklassen



In tabel 5 en figuur3 is te zien dat bij de maatklasse 8-12 de gemiddelde aantasting 0.4% bedroeg. In de maatklassen 12-25 was dat 1.1% en in de maatklasse >25 was de gemiddelde ziektepercentage 3.7%. De bloedingsziekte kwam meer voor bij de grotere boommaten.

Verdeeld over de 4 bedrijven zijn 22 percelen beoordeeld. Het aantal bomen per perceel varieerde sterk, nl. van 9 t/m 1848 bomen. In tabel 6 staat het overzicht van de mate van aantasting van alle 22 percelen.

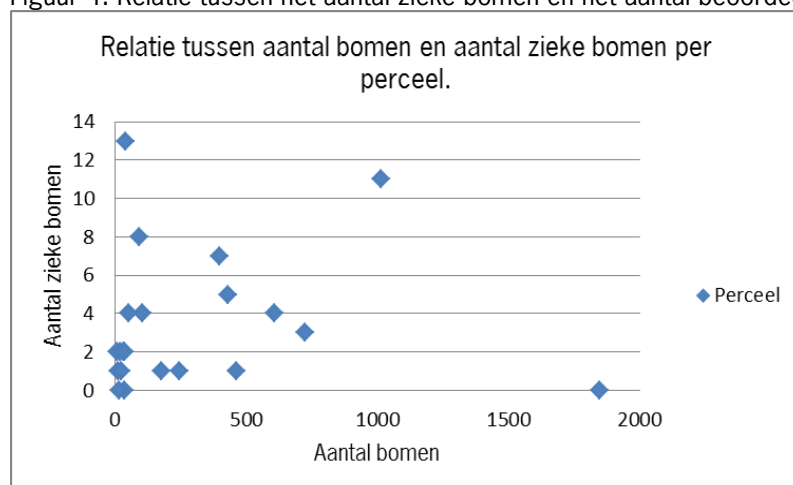
Tabel 6. De ziektepercentages, aantal zieke bomen en de mate van aantasting in 3 klassen voor 22 percelen, gerangschikt in oplopend aantal bomen per perceel.

Perceelnr	aantal bomen	licht	matig	ernstig	aantal ziek	% ziek
1	9	2	0	0	2	22.2%
2	14	0	0	1	1	7.1%
3	17	0	0	0	0	0.0%
4	19	0	2	0	2	10.5%
5	23	0	1	0	1	4.3%
6	33	1	1	0	2	6.1%
7	36	1	1	0	2	5.6%
8	38	2	0	0	2	5.3%
9	39	0	0	0	0	0.0%
10	41	5	8	0	13	31.7%
11	54	2	2	0	4	7.4%
12	94	2	4	2	8	8.5%
13	106	0	4	0	4	3.8%
14	176	0	1	0	1	0.6%
15	246	0	1	0	1	0.4%
16	398	3	4	0	7	1.8%
17	432	5	0	0	5	1.2%
18	464	0	1	0	1	0.2%
19	609	0	4	0	4	0.7%
20	724	0	3	0	3	0.4%
21	1014	0	11	0	11	1.1%
22	1848	0	0	0	0	0.0%

Er waren grote verschillen te zien tussen de percelen. Het percentage ziekte varieerde tussen de 0 en 32%.

Om te zien of er een relatie is tussen het aantal bomen op een perceel en het aantal zieke bomen is in figuur 4 het aantal zieke bomen uitgezet tegen het aantal bomen per perceel.

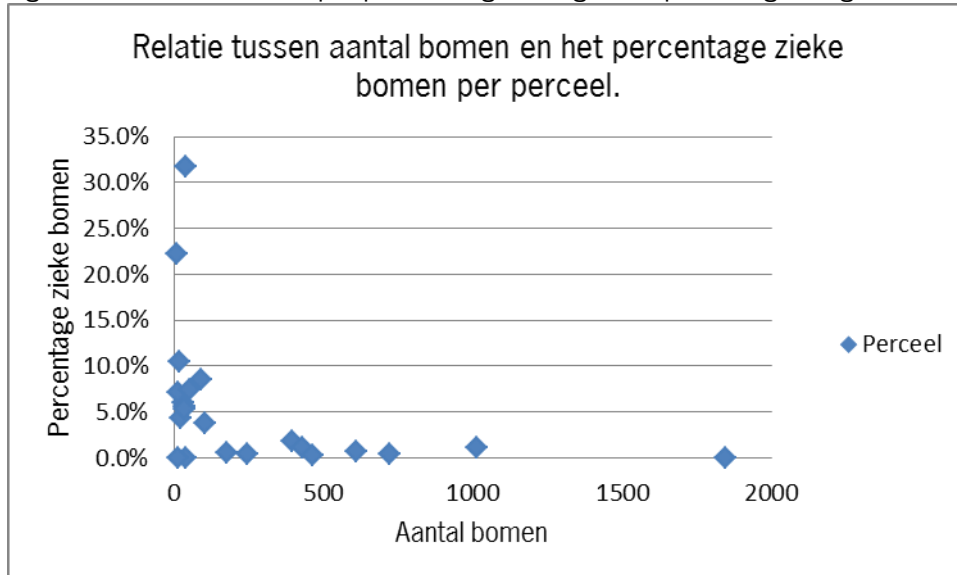
Figuur 4. Relatie tussen het aantal zieke bomen en het aantal beoordeelde bomen per perceel.



Figuur 4 laat zien dat er geen relatie is tussen het aantal bomen op een perceel en het aantal zieke bomen. Op 3 percelen werden geen zieke bomen aangetroffen, waarvan 1 perceel bestond uit 1848 bomen. Op andere percelen werden 1 tot 13 zieke bomen aangetroffen.

In figuur 5 zijn de ziektepercentages van de 22 percelen nog eens uitgezet tegen het aantal bomen op een perceel.

Figuur 5. Het aantal bomen per perceel uitgezet tegen het percentage aangetaste bomen.



Figuur 5 laat zien dat het aantal bomen en het percentage aangetaste bomen sterk verschilde per perceel. In percelen met weinig bomen telt een zieke boom relatief meer bij aan het percentage zieke bomen dan in een perceel met veel bomen. Dat beeld is in figuur 5 terug te vinden.

De volgende percelen met relatief veel zieke bomen vallen op:

Op het perceel met 31.7% zieke bomen stonden 41 bomen (Baumannii), van bedrijf O. Op het perceel waren al eerder bomen weggehaald die ziek waren. Het gaat om een perceel met 41 *Aesculus hippocastanum* Baumannii's met maat 50-60.

Op het perceel met 22.2% zieke bomen stonden 9 bomen (Baumannii), van bedrijf H.

Op het perceel met 10.5% zieke bomen stonden 19 bomen (*hippocastanum* sp.), van bedrijf H.

Op het perceel met 8.5% zieke bomen stonden 94 bomen (*hippocastanum* sp. en *Briotii*), van bedrijf K. (6 zieke bomen van de 34 *Aesculus hippocastanum* sp. met maat 40-80 waren ziek.)

5.2 Monsters PCR

Van 20 bomen zijn tijdens de inventarisatie monsters genomen. Zowel bomen met aantasting als bomen zonder aantasting zijn bemonsterd. In tabel 7 staan de resultaten.

Tabel 7. Uitslag van PCR-detectie op aanwezigheid van *Pseudomonas syringae* pv *aesculi* bij 20 bomen.

nr.	bedrijf	geslacht	soort	cultivar	perceelnr	aantasting	Uitslag
1	H	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	1	aangetast	+
2	H	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	1	aangetast	+
3	H	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	1	gezond	+
4	H	Aesculus	hippocastanum	sp	4	aangetast	+
5	M	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	6	gezond	+
6	M	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	6	aangetast	+
7	M	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	10	gezond	+
8	M	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	10	aangetast	+
9	M	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	14	aangetast	+
10	M	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	16	aangetast	+
11	M	Aesculus	hippocastanum	sp	16	aangetast	+
12	M	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	17	gezond	+
13	M	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	17	aangetast	+
14	M	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	18	aangetast	+
15	M	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	21	aangetast	+
16	M	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	21	aangetast	+
17	M	Aesculus	hippocastanum	sp	21	aangetast	+
18	H	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	22	gezond	+
19	H	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	22	aangetast	+
10	H	Aesculus	hippocastanum	Baumannii'	22	aangetast	+

De monsternummers van de gezonde bomen zijn grijs gearceerd.

Alle monsters bleken positief voor *Psa*, ook de op het oog gezonde bomen.

Monsternummer 3 is afkomstig van een perceel met een hoog gemiddeld ziektepercentage (22%).

Monsternummer 5 en 7 zijn afkomstig van twee percelen met een redelijk hoog gemiddeld ziektepercentage (6%).

Monsternummer 12 is afkomstig van een perceel met een gemiddeld ziektepercentage (1.2%).

Monsternummer 18 is afkomstig van een perceel waar geen zieke bomen aanwezig waren, ziektepercentage (0%).

De resultaten lijken aan te geven dat de bacterie *Pseudomonas syringae* pv *aesculi* altijd aanwezig is op de stam van paardenkastanjabomen.

De PCR-methode is een zeer gevoelige detectiemethode. Zelfs bij lichte verontreinigingen van de monsters kan de uitslag positief zijn. Bij deze eerste bemonsteringsronde mag niet helemaal uitgesloten worden dat er kruisbesmetting heeft plaatsgevonden. Dus dat de monsters van de gezonde bomen verontreinigd zijn geraakt met sporen van de *Pseudomonas* bacterie. Er kunnen dus valse positieve meldingen zijn.

In een tweede ronde is een bemonstering uitgevoerd op een perceel met op het oog gezonde kastanjabomen. De monsters waren afkomstig van 2 percelen.

Tabel 8: Uitslag van PCR-detectie op aanwezigheid van *Pseudomonas syringae* pv *aesculi* bij 4 bomen. (3 dec 2010)

Nr.	Beschrijving	PCR resultaat
1	bastmonster 1TS	neg
2	bastmonster 2TS	neg
3	bastmonster E1	neg
4	bastmonster E2	neg
5	Water (Neg Contr.)	neg
6	Water (Neg Contr.)	neg
7	Bastmonster (positieve controle)	pos
8	DNA van zieke kastanje #3 (28 sept.2010), Pos. Contr.	pos

Uit deze controle bleken alle 4 monsters negatief. De bacterie kon niet worden aangetoond.

Op dit perceel waar geen zichtbare zieke bomen stonden werd de bacterie niet gevonden.

Deze resultaten geven aan dat niet alle paardenkastanjabomen besmet zijn met bacterie die bloedingsziekte kan veroorzaken.

Nader onderzoek is nodig om te bepalen in welke mate de bacterie aanwezig is op stammen, bladeren of in de grond. Het is niet bekend via welke wegen de bacterie zich verspreid en de bomen besmet.

6 Conclusies

- Een representatieve inventarisatie bij 6434 Aesculus-bomen naar het voorkomen van bloedingsziekte bij Aesculus soorten en cultivars op diverse percelen, verdeeld over het land leverde op dat anno oktober 2010 gemiddeld 1,2% van de paardenkastanjabomen ziek waren.
- De zieke bomen vielen in de categorie matig en licht aangetast. Er waren na genoeg geen ernstig aangetaste bomen.
- Van de cultivars *A. carnea* Plantierensis, *A. hippocastanum* Pyramidalis werden geen zieke bomen aangetroffen, maar van deze soorten zijn relatief weinig bomen beoordeeld. Van de 78 beoordeelde *Aesculus indica* bomen waren er 2 aangetast (=2.6%). De ziektepercentages van de andere soorten en cultivars lagen dicht bij elkaar. In afnemende ziektepercentages: *Aesculus hippocastanum* sp. 1.5%, *Aesculus hippocastanum* 'Baumannii' 1.1% en *Aesculus carnea* 'Briotii' 0.9%.
- De bloedingsziekte kwam meer voor bij de grotere maten 18-25 en >25, dan bij de kleinere maten.
- De bacterie *Pseudomonas syringae* pv aesculi, de veroorzaker van de bloedingsziekte in Aesculus, kan aanwezig zijn op zowel aangetaste als niet aangetaste bomen, maar werd soms ook niet aangetroffen op niet aangetaste bomen.

7 Aanbevelingen

Nu is aangetoond dat de bloedingsziekte in *Aesculus* ook voorkomt op boomkwekerijen wordt aanbevolen om te onderzoeken hoe de ziekte valt te voorkomen en eventueel te bestrijden.

Onderzoek is nodig om te bepalen in welke mate de bacterie aanwezig is op stammen, bladeren of in de grond. Het is niet bekend via welke wegen de bacterie zich verspreidt en de bomen besmet.

Om de kennis te verspreiden onder de boomkwekers zou een brochure: "Hoe om te gaan met paardekastanjeziekte" nuttig zijn. Het voortijdig herkennen en vernietigen van zieke bomen kan de infectiedruk op kwekerijen verlagen.