



Toekomst voor de paardenkastanje

Auteurs | J.A. Hiemstra, M. Wenneker & B.J. van der Sluis

Rapport WPR-OT-1022



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH



Den Haag

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/632630>.

Samenvatting: De voortdurende toename van de problemen met kastanje bloedingsziekte was in 2018 aanleiding voor de start van het project 'Toekomst voor de paardenkastanje' dat zich richtte op het vinden van paardenkastanjes die minder gevoelig zijn voor bloedingsziekte. Daartoe werd een brede collectie *Aesculus* genotypen (soorten en selecties) opgebouwd en tegelijkertijd een methode ontwikkeld om kastanjabomen te toetsen op hun gevoeligheid voor de bloedingsziekte veroorzaakt door de bacterie *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. Met deze methode werd een collectie van ruim 500 planten van 48 *Aesculus* genotypen getoetst. De resultaten laten zien dat er grote verschillen bestaan in gevoeligheid, zowel tussen soorten onderling, als binnen soorten. Een aantal minder bekende soorten blijkt duidelijk minder gevoelig en zelfs binnen de zeer gevoelige gewone paardenkastanje (*A. hippocastanum*) bleek een aantal van de geteste nieuwe selecties opvallend weinig gevoelig. Daarmee bieden de ontwikkelde methode en de daarmee behaalde resultaten nieuwe perspectieven voor het behoud van de paardenkastanje als stadsboom.

Trefwoorden: Paardenkastanje, *Aesculus*, kastanje bloedingsziekte, *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*, resistentietoetsing, inoculatie, laesielengte.

Dit onderzoek is in opdracht van de Stichting Oogstfonds, op initiatief van de Gemeente Den Haag, uitgevoerd door de Stichting Wageningen Research (WR), Business Unit Open Teelten (projectnummer 3750382500).

WR is een onderdeel van Wageningen University & Research, samenwerkingsverband tussen Wageningen University en de Stichting Wageningen Research.

© 2022 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Open Teelten, Postbus 16, 6700 AA Wageningen; T 0317 48 07 00; www.wur.nl/plant-research

KvK: 09098104 te Arnhem
VAT NL no. 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. 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 Stichting Wageningen Research.

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

Rapport WPR-OT-1022

Foto omslag: 'Postzegelboom' voor Paleis Noordeinde in Den Haag (bron: gemeente Den Haag)

Inhoud

Woord vooraf	5
Samenvatting	7
1 Inleiding	9
1.1 Voorgeschiedenis	9
1.2 Doel en opzet van het project	9
1.3 Opbouw van het rapport	10
2 Resultaten 1e fase van het project	11
2.1 Verkenning	11
2.1.1 Opbouw genenbank	11
2.1.2 Ontwikkeling toetsmethodiek	11
2.1.3 Toepassing nieuwe moleculaire technieken	12
2.1.4 Perspectieven innovatieve gewasbeschermingstechnieken	12
2.1.5 Aanleg City Tree Lab Den Haag	13
2.2 Vaststelling werkplan fase 2	13
3 Ontwikkeling betrouwbare toetsmethode	15
3.1 Inleiding	15
3.2 Keuze isolaten	15
3.3 Ontwikkeling toetsmethode	17
3.3.1 Test met afgesneden takken	17
3.3.2 Aangepast protocol op basis van literatuur en overleg met internationale collega's	18
3.3.3 Test van het inoculatieprotocol	19
4 Grootschalige toetsing <i>Aesculus</i> sortiment	23
4.1 Opbouw te toetsen collectie	23
4.2 Wijze van toetsing	24
4.3 Resultaten en discussie	25
4.4 Conclusies	29
5 Slotconclusies en aanbevelingen	31
Literatuur	33
Bijlage 1 Plan van aanpak "Toekomst voor de paardenkastanje"	35
Bijlage 2 Leden stuurgroep	45
Bijlage 3 Samenvatting meetgegevens	47
Bijlage 4 Laesielengte in relatie tot lengte en diameter van de geïnoculeerde scheuten	49

Woord vooraf

Wij kunnen niet zonder bomen in de stad !

De functies die bomen voor de stad vervullen zijn essentieel voor een leefbare stad. Denk bijvoorbeeld aan, schaduw, luwte, seizoen beleving, CO₂ vastlegging, verhoging van de vastgoedwaarde en de leefomgeving. Totaal meer dan 20 ecosystemendiensten, die gezamenlijk de waarden van bomen voor de stad vormen.

Toen in 2004 duidelijk werd dat de paardenkastanjes in heel het land erg ziek waren, is op initiatief van Koningin Beatrix en de wethouders van de G4 gemeenten de werkgroep Aesculaap opgericht, om onderzoek te doen naar de kastanjabloedingsziekte. Aanvankelijk leek het erop dat er net als bij de iepenziekte een vaccin zou kunnen worden ontwikkeld om de ziekte te beheersen. Helaas bleek de ziekteverwekker van de kastanjabloedingsziekte een bacterie te zijn, waardoor het niet mogelijk was een vaccin te ontwikkelen. Toch zag de universiteit van Wageningen (WUR) mogelijkheden om via de meest recente kennis op zoek te gaan naar een resistente soort. Op basis van deze kansrijke prognose heeft de gemeente Den Haag de vereniging Stadswerk als beheerder van het OOGST-fonds en de WUR Wageningen opdracht gegeven om een poging te wagen een resistente paardenkastanje te vinden. Dat is na 4 jaar zoeken gelukt!

Ik ben er trots op, dat samen met bedrijven, de kennis uit de stad en de universiteiten het gelukt is om enkele hoog resistente soorten te identificeren. Deze boompjes zijn inmiddels geplant op de gemeente kwekerij om over enkele jaren de stad in te gaan.

Het is belangrijk dat de kennis en expertise, die in dit baanbrekende onderzoek zijn opgedaan, kunnen worden ingezet om bijvoorbeeld klimaatbestendige bomen te kweken. Dat kan in de vorm van citylabs, plekken in steden waar nieuwe boomsoorten in de praktijk worden getest. Gezamenlijk onderzoek door overheden, bedrijven en universiteiten blijft ook de komende jaren van groot belang !

Arjen Kapteijns

Wethouder Duurzaamheid, Energietransitie, Klimaatadaptatie en Buitenruimte

Samenvatting

De voortdurende toename van het aantal door kastanje bloedingsziekte aangetaste kastanjabomen was in 2018 aanleiding voor de start van het project 'Toekomst voor de paardenkastanje' gericht op het vinden van oplossingen om de paardenkastanjabomen in Den Haag en in Nederland te behouden. In de eerste fase is een verkenning uitgevoerd naar perspectieven van nieuwe wetenschappelijke ontwikkelingen. Op basis daarvan is een plan voor de tweede fase gemaakt wat zich richtte op het vinden van paardenkastanje selecties die resistent of op zijn minst minder gevoelig zijn voor bloedingsziekte.

Daarvoor werd in 2019 begonnen met de opbouw van een zo breed mogelijke collectie *Aesculus* genotypen en met de ontwikkeling van een betrouwbare methode voor de toetsing van die genotypen op hun gevoeligheid voor de bloedingsziekte veroorzaakt door de bacterie *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. Dit resulteerde in een toetsingsprotocol gebaseerd op het kunstmatig infecteren (inoculeren) van de te toetsen jonge boompjes door middel van het aansnijden van een scheut en het in de wond aanbrengen van een druppel met een suspensie van bacteriecellen van de ziekteverwekker. Na een dergelijke inoculatie ontwikkelt zich rond de aangesneden plek op de behandelde scheut een laesie (uitwendig zichtbaar als een langgerekte afgestorven plek in de bast, en inwendig als een zich vaak nog verder uitstrekkende verkleuring in het hout) waarvan de lengte gezien kan worden als een maat voor de mate van gevoeligheid van de betreffende plant.

Deze methode is in de periode 2021-2022 met succes gebruikt om een collectie van ruim 500 planten van 48 *Aesculus* genotypen te toetsen. Uit de resultaten blijkt dat er grote verschillen bestaan in gevoeligheid, zowel tussen soorten onderling, als binnen soorten. Een aantal minder bekende of gebruikte kastanje soorten vertoonde significant minder symptomen dan de bekende gevoelige cultivars 'Briotii' en 'Baumannii'. Ook binnen soorten komen verschillen in gevoeligheid voor; d.w.z. verschillen tussen individuen van dezelfde soort. Zelfs binnen de zeer gevoelige gewone paardenkastanje (*A. hippocastanum*) bleek een aantal van de geteste nieuwe selecties (d.w.z. kloontjes van geselecteerde gezond gebleven exemplaren) opvallend weinig gevoelig.

Daarmee bieden de ontwikkelde methode en de daarmee behaalde resultaten nieuwe perspectieven voor het behoud van de paardenkastanje als stadsboom. In de eerste plaats voor het identificeren van minder gevoelige soorten, maar daarnaast ook voor de ontwikkeling van minder gevoelige cultivars door selectie binnen gevoelige soorten.

1 Inleiding

1.1 Voorgeschiedenis

In 2002 kwamen er uit verschillende delen van Nederland voor het eerst meldingen van een nieuwe aantasting in paardenkastanje (*Aesculus hippocastanum*). In de jaren daarna nam het aantal meldingen sterk toe, zowel in Nederland als in de landen om ons heen. Dit was in 2004 aanleiding voor de oprichting van de werkgroep Aesculaap met als doel om door krachtenbundeling en coördinatie van het onderzoek de oorzaak van de nieuwe ziekte te achterhalen en te komen tot strategieën voor beheersing ervan. Uit het in de periode 2004-2008 uitgevoerde onderzoek (Dijkshoorn & van Os, 2008; Van Os & Dijkshoorn, 2008) kwam naar voren dat deze als kastanjabloedingsziekte aangeduide aantasting wordt veroorzaakt door een bacterie (*Pseudomonas syringae*) die epifytisch aanwezig is op kastanjabomen en via wondjes en beschadigingen de boom kan infecteren. Waarom dat vanaf 2002 in toenemende mate leidde tot aantasting van daarvoor gezonde kastanjes werd niet duidelijk. Een relatie met (ongunstige) groeiplaatsfactoren zoals droogtestress, zoutschade of een slechte standplaats, of met verzwakking door de inmiddels ook wijd verspreide aantasting door de kastanjemineermot kon niet worden aangetoond.

In het onderzoek gericht op beheersing van de aantasting werd gekeken naar stoffen die de ontwikkeling van de bloedingsziekte zouden kunnen vertragen. Dit leverde echter geen algemeen bruikbare adviezen op. Wel kwamen er uit het onderzoek sterke aanwijzingen naar voren dat er genetische verschillen tussen soorten en cultivars lijken te bestaan wat betreft de mate van gevoeligheid voor de aantasting. Door het ontbreken van een goed toetssysteem was het echter niet mogelijk om de verschillen tussen soorten en selecties effectief te onderzoeken.

Aan het door Aesculaap gecoördineerde onderzoek kwam in 2008 een einde. Het onderzoek door Wageningen UR in de periode daarna richtte zich vooral op de ontwikkeling van een methode gebaseerd op het toedienen van warmte om de bacterie in zieke bomen te doden (de Keizer e.a., 2012; Kleis e.a., 2015) en op monitoring van de aantasting in met name de gemeente Den Haag (Van Kuik, 2016). Een warmtebehandeling lijkt het aantal bacteriën in de stam van zieke kastanjes inderdaad te kunnen verminderen. Voor belangrijke of waardevolle bomen kan dit mogelijk een deel van een controle strategie zijn, maar door de benodigde arbeid en techniek (en dus kosten) is het geen generieke oplossing voor een ziekte die op grote schaal door heel Nederland (en West Europa) voorkomt.

De gemeente Den Haag heeft vanaf 2004 de conditie van alle gemeentelijke kastanjabomen in Den Haag door Wageningen UR laten monitoren. Daarbij bleek het percentage zieke bomen jaarlijks toe te nemen; in 2016 (van Kuik, 2016) was inmiddels 68 % in meer of mindere mate aangetast. Omdat jaarlijks een deel van de zwaar aangetaste bomen moet worden verwijderd neemt het aantal overgebleven en gezonde kastanjabomen jaarlijks af. Ook uit de resultaten van deze monitoring blijkt dat er verschil is in gevoeligheid van de diverse soorten en cultivars. Met name de geel bloeiende *Aesculus pavia* en haar cultivar Vestita werden geregistreerd als weinig tot niet aangetast.

1.2 Doel en opzet van het project

De voortdurende toename van het aantal zwaar aangetaste bomen (in 2017 in Den Haag 10 %), en als gevolg daarvan het steeds verder afnemende aantal gezonde kastanjabomen, was in 2018 aanleiding voor een in samenwerking met de (voormalige) werkgroep Aesculaap en het Oogstfonds opgesteld plan van aanpak 'Toekomst voor de paardenkastanje' (Bijlage 1). Doel van dit plan was het ontwikkelen van oplossingen om de bloedingsziekte te voorkomen en de paardenkastanjabomen in Den Haag en in Nederland te behouden. Daarbij werd gedacht aan twee sporen:

- Het selecteren of ontwikkelen van paardenkastanje selecties die resistent zijn tegen bloedingsziekte. Uitgangspunt daarvoor zijn de sterke indicaties uit zowel het Aesculaap onderzoek als de langjarige monitoring in Den Haag dat er genetisch bepaalde verschillen lijken te bestaan in gevoeligheid van de diverse soorten en cultivars.

- Het benutten van nieuwe inzichten en wetenschappelijke ontwikkelingen uit de periode na het Aesculaap onderzoek die bij zouden kunnen dragen aan oplossingen om de bloedingsziekte te voorkomen of aan het beperken van de ontwikkeling van de ziekte in geïnfecteerde bomen.

Het daarvoor geformuleerde projectvoorstel bestond uit twee fasen:

- Een korte eerste fase waarin een verkenning wordt uitgevoerd naar de mogelijke uitkomsten (perspectieven) van verschillende onderzoeksrichtingen.
- Een onderzoeksfase van enkele jaren waarin de meest perspectiefvolle richting verder wordt uitgewerkt in de vorm van een meerjarig onderzoeksproject.

De invulling van de tweede fase is aan het eind van de eerste fase bepaald in overleg met de opdrachtgever en een hiervoor samengestelde stuurgroep.

1.3 Opbouw van het rapport

De resultaten van de eerste oriënterende fase van het project zijn samengevat in Hoofdstuk 2. In deze fase, uitgevoerd in de tweede helft van het jaar 2018, is een korte verkenning gedaan naar perspectieven en relevantie van de volgende aspecten:

- Nut en mogelijkheid van het opbouwen van een Aesculus genenbank.
- De mogelijkheden die nieuwe moleculaire technieken bieden.
- De ontwikkeling van een toetssysteem om kastanje soorten te screenen op mogelijke resistentie tegen bloedingsziekte.
- Nieuwe technieken om de ziekteverwekker (*Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*) te bestrijden.
- De aanleg van een City Tree Lab om verschillende wijzen van bestrijding te testen.

De resultaten van deze verkenning zijn in november 2018 besproken met de stuurgroep. Op basis daarvan is een plan uitgewerkt voor de tweede fase van het project (paragraaf 2.2).

De tweede fase, gericht op het toetsen van de gevoeligheid van een groot sortiment paardenkastanje soorten, cultivars en selecties, is uitgevoerd in de periode 2019-2022. Voor die toetsing moest eerst een geschikte toetsmethode ontwikkeld worden. Het daarop gerichte werk en de resultaten daarvan zijn beschreven in Hoofdstuk 3. Hoofdstuk 4 beschrijft de opbouw van de te toetsen collectie en de daadwerkelijke toetsing daarvan. Hoofdstuk 5 ten slotte bevat de slotconclusies en aanbevelingen voor verder onderzoek.

2 Resultaten 1e fase van het project

2.1 Verkenning

In de tweede helft van 2018 is een verkenning uitgevoerd om actuele informatie te verzamelen voor de uitwerking van het werkplan voor het tweede deel van het project. In deze fase is aandacht besteed aan de volgende vijf aspecten:

- Opbouw van een *Aesculus* genenbank t.b.v. een grootschalige screening op gevoeligheid voor kastanjabloedingsziekte.
- Het ontwikkelen van een toetssysteem voor het screenen van *Aesculus* genotypen op gevoeligheid, en met name afwezigheid daarvan, voor kastanjabloedingsziekte.
- Perspectieven van nieuwe moleculair biologische technieken voor de ontwikkeling van methoden voor controle of bestrijding van kastanjabloedingsziekte.
- Perspectieven van innovatieve wijzen van gewasbescherming voor toepassing bij de bestrijding van *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Pae), de veroorzaker van kastanjabloedingsziekte.
- De aanleg van een City Tree Lab in den Haag waar nieuwe bestrijdingsmethoden in de praktijk kunnen worden getest op toepasbaarheid en effectiviteit.

De uitkomsten van deze verkenning zijn samengevat in de volgende paragrafen.

2.1.1 Opbouw genenbank

Zowel tijdens het Aesculaap onderzoek (Dijkshoorn & van Os, 2008; Van Os & Dijkshoorn, 2008) als bij de monitoring in de gemeente Den Haag (van Kuik, 2016; van der Sluis e.a. 2022) werd geconcludeerd dat er sterke aanwijzingen zijn dat er verschil is in gevoeligheid voor kastanjabloedingsziekte tussen de diverse soorten en cultivars. In de praktijk wordt daarnaast regelmatig melding gemaakt van kastanjabomen die niet door bloedingsziekte lijken te worden aangetast, ook al staan ze in een omgeving met zwaar aangetaste kastanjabomen en dus een grote ziektedruk. Door deze individuen vegetatief te vermeerderen (d.m.v. stekken, enten of oculeren op een onderstam) ontstaan groepen van individuen die genetisch identiek zijn aan elkaar en aan de moederplant. Dergelijke klonen kunnen samen met planten van bekende paardenkastanje soorten en cultivars worden gebruikt om te onderzoeken of de waargenomen verschillen in gevoeligheid genetisch zijn bepaald.

De aanleg van een genenbank, d.w.z. het opbouwen van een fysieke collectie bestaande uit meerdere bomen van alle bekende *Aesculus* soorten groeiend op één perceel en aangevuld met vegetatief vermeerderde exemplaren van geselecteerde "gezonde" individuen van gevoelige soorten, bleek niet haalbaar binnen de projectperiode. Wel leek het goed mogelijk om in relatief korte tijd (max. enkele jaren) een collectie van te toetsen planten in pot op te bouwen door materiaal te verzamelen van de te testen soorten en individuen t.b.v. vegetatieve vermeerdering. Stekken van *Aesculus* is niet goed mogelijk, maar vermeerdering d.m.v. enten of oculeren van materiaal van de te testen soorten op zaailing onderstammen is goed mogelijk bij diverse Nederlandse boomkwekers.

2.1.2 Ontwikkeling toetsmethodiek

Voor het testen van soorten en selecties op (verminderde) gevoeligheid voor een aantasting door een ziekteverwekker is een betrouwbare toetsingsmethode nodig. Gewoonlijk worden daarbij jonge planten kunstmatig geïnfecteerd met een ziekteverwekker, waarna de mate van symptoom ontwikkeling wordt gebruikt als maat voor de gevoeligheid van de betreffende planten voor die ziekteverwekker. Dergelijke methoden worden bijvoorbeeld gebruikt voor het testen van iepenrassen op de mate van resistentie tegen iepziekte (Buiteveld e.a., 2014) en in het in 2015 afgeronde EU-EMPHASIS project voor onderzoek naar verschillen in gevoeligheid van essen soorten en cultivars voor essentaksterfte (Hiemstra e.a., 2019; zie ook Wiersma e.a., 2022).

Tijdens het Aesculaap onderzoek is al gewerkt aan een protocol voor kunstmatige infectie van jonge *Aesculus* planten met *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Pae). Infectie via wonden bleek daarbij mogelijk, maar tevens werd geconcludeerd dat verder optimaliseren van dit systeem nodig is om betrouwbare toetsing van verschillen mogelijk te maken (Van Os en Dijkshoorn, 2008). Gezien de ervaringen in het Aesculaap onderzoek en het reeds beschikbaar zijn van vergelijkbare methodieken voor toetsing van es (Hiemstra e.a., 2019; zie ook Wiersma e.a., 2022) en iep (Buiteveld e.a., 2014) op hun gevoeligheid voor essentaksterfte en iepziekte werd in 2018 geconcludeerd dat de ontwikkeling van een toetsmethode om kastanje te testen op gevoeligheid voor bloedingsziekte een reële mogelijkheid is.

2.1.3 Toepassing nieuwe moleculaire technieken

De ontwikkeling van niet-gevoelige selecties bij boomsoorten is met de traditionele technieken van kruising en selectie een langdurige kwestie (Woodcock e.a., 2019) waarbij herhaald grote aantallen planten moeten worden opgekweekt en getest. In recent onderzoek naar een andere ernstige boomziekte, essentaksterfte, wordt gebruik gemaakt van transcriptomie, een innovatieve DNA-techniek waarmee men versneld mogelijk resistente of minder gevoelige individuen kan opsporen met behulp van genetische merkers (Harper e.a., 2016). Voor de ontwikkeling van deze merkers waarmee individuen kunnen worden gescreend op het al dan niet (gedeeltelijk) resistent zijn tegen een ziekteverwekker is echter een collectie van soorten of individuen nodig met bekende verschillen in de mate van gevoeligheid. Die informatie ontbreekt in 2018 nog vrijwel volledig voor paardenkastanje en bloedingsziekte. Daarom lijkt toepassing van deze techniek bij het zoeken naar resistente paardenkastanjes niet haalbaar.

Naast transcriptomie zijn er nog meer nieuwe moleculaire-technieken die kunnen helpen bij het versneld zoeken naar oplossingen voor de problemen met de kastanjebloedingsziekte. Recent is Wageningen UR bijvoorbeeld gestart met zogenaamd microbiom-onderzoek. Veel planten- en boomsoorten zijn gevoelig voor insectenplagen en infecties veroorzaakt door bacteriën, schimmels, en virussen. Sommige 'plant-eigen' micro-organismen die in en op de plant leven – het zogenaamde microbiom – kunnen de plant helpen zich te weren tegen deze belagers. Het nieuwe WUR-onderzoek is nog in het stadium van het verzamelen van fundamentele kennis over de mogelijkheden het microbiom zodanig aan te passen dat de weerbaarheid van planten verder wordt vergroot. Voor praktische toepassing in het kastanje onderzoek is het daarom nog te vroeg.

2.1.4 Perspectieven innovatieve gewasbeschermingstechnieken

Bestrijding van ziekteverwekkers in bomen d.m.v. het toepassen van (chemische) gewasbeschermingsmiddelen is moeilijk en in de praktijk vaak onmogelijk omdat de ziekteverwekkers binnen in de boom slecht tot niet bereikbaar zijn. Een extra probleem bij bacterieziekten is dat daarvoor eigenlijk geen toegelaten middelen (zoals antibiotica) beschikbaar zijn. Bovendien is de toepassing van chemische gewasbescherming in het stedelijk groen niet (meer) toegestaan. Wereldwijd wordt er gewerkt aan de ontwikkeling van alternatieven voor chemische middelen.

Een alternatief zijn de zogenaamde BCA's (biocontrol agents). In het EU-project DROPSA dat eind 2017 is afgerond is onderzoek gedaan naar o.a. beheersing en bestrijding van bacterie kanker in het houtige gewas kiwi, veroorzaakt door de bacterie *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Deze bacterie vormt een serieuze bedreiging voor de productie van kiwifruit over de hele wereld en is nauw verwant aan de Pae-bacterie in paardenkastanje. Uit dit kiwi-onderzoek is een aantal interessante biocontrol agents naar voren gekomen die momenteel verder worden onderzocht op hun effect en toepasbaarheid. Voor toepassing in de praktijk is het echter nog te vroeg. Bovendien is dit probleem inmiddels (grotendeels) opgelost door andere (tolerante of resistente) cultivars te gebruiken.

Een andere recente ontwikkeling op het gebied van de bestrijding van plantenziekten veroorzaakt door bacteriën is het onderzoek naar de potentiële rol van bacteriofagen daarbij (Jones e.a., 2007). Een bacteriofaag is een klein virus dat alleen een specifieke bacterie infecteert. Bacteriofagen zijn weliswaar veelbelovend maar het onderzoek ernaar is in 2018 nog in een fundamenteel stadium. Hoewel er ook binnen Wageningen UR wel enige ervaring is met het werken met bacteriofagen is deze techniek voor onderzoek naar gebruik in de praktijk nog niet beschikbaar.

2.1.5 Aanleg City Tree Lab Den Haag

De bedoeling van een dergelijke opzet is het onder praktijkomstandigheden testen van middelen en methoden die perspectiefvol zijn gebleken in eerder laboratorium onderzoek of in andere systemen elders. De werking van zowel bestaande als nieuwe behandelmethoden tegen kastanje bloedingsziekte zou volgens wetenschappelijke normen kunnen worden onderzocht in een City Tree Lab van paardenkastanjabomen op een nog nader te bepalen locatie in Den Haag. Samen met andere partijen worden daar behandelmethoden voor kastanje bloedingsziekte getest om te zoeken naar handvatten voor beheerders. Het idee daarbij is dat marktpartijen zich kunnen aanmelden om hun methode onder gestandaardiseerde proefcondities te laten testen.

In het verleden zijn er in het door Aesculaap gecoördineerde onderzoek al vele middelen en methoden getest. Dit leverde echter geen aanknopingspunten voor in de praktijk te gebruiken methoden om kastanje bloedingsziekte te controleren. In de jaren daarna is gewerkt aan de ontwikkeling van een methode om de bacterie in zieke bomen te doden door het geven van een warmtebehandeling (de Keizer e.a., 2012; Kleis e.a., 2015). Omdat deze methode in 2018 onderdeel is van een Living Tree pilot in Dordrecht en er verder geen nieuwe te toetsen technieken beschikbaar zijn lijkt het weinig zinvol om ook in Den Haag een dergelijk City Tree Lab op te starten voor het testen van methoden en middelen voor het controleren van kastanje bloedingsziekte.

2.2 Vaststelling werkplan fase 2

De hierboven beschreven resultaten van de verkenning in de tweede helft van 2018 zijn op 13 november 2018 besproken in een stuurgroep bestaande uit vertegenwoordigers van de opdrachtgevers (gemeente den Haag en Oogstfonds) en een aantal deskundigen uit de groene sector (Bijlage 2). Op basis van de gevoerde discussie werd besloten om het onderzoek in de tweede fase te concentreren op het zoeken van minder kwetsbaar *Aesculus*-sortiment. Daarbij gaat het enerzijds om het bepalen van de mate van gevoeligheid van het huidige sortiment; en anderzijds om het vinden van nieuwe minder gevoelige soorten of selecties.

Voor de overige in de verkenning opgenomen thema's wordt het volgende geconcludeerd:

- Biocontrol agents (BCA's): de behaalde resultaten bij de bacterieziekte in kiwi leveren geen directe kandidaten voor ons onderzoek.
- Bacteriofagen: zeer interessante ontwikkeling, echter er vindt nog geen onderzoek plaats in planten waar wij bij kunnen aansluiten. Zo'n bacteriofagen-onderzoek opstarten voor kastanje is zeer kostbaar, gaat ons budget te boven. We houden de ontwikkelingen met bacteriofagen tegen plantenziekten wel in de gaten, want de perspectieven zijn groot.
- Microbioom-onderzoek: Dit staat op het punt van starten maar verkeert nog in de fundamentele fase. Ook hiervoor geldt: blijven volgen en zodra het enigszins praktijkrijp is kunnen we het oppakken. Zal best nog wat jaren duren.
- Transcriptomie: Is ontwikkeld voor *Fraxinus*, moet voor *Aesculus* nog ontwikkeld worden, de daarvoor benodigde informatie over verschillen in gevoeligheid van een getoetste reeks genotypen ontbreekt nog. Daarom is toepassing binnen dit project (nog) niet haalbaar.
- City Tree Lab Den Haag: er zijn in het verleden al vele middelen en methoden getoetst. In Dordrecht loopt momenteel een Living Tree Lab pilot van middelen tegen de bloedingsziekte. We zien nu geen meerwaarde om dit op te pakken in Den Haag. Dit onderdeel komt dus te vervallen.

Concreet betekent dit dat in de tweede fase van het project de volgende aspecten zullen worden opgepakt:

1. Opbouw van een brede collectie in pot opgekweekte jonge bomen t.b.v. toetsing op gevoeligheid voor bloedingsziekte d.m.v.:
 - Vermeerderen van schijnbaar onaangestaste exemplaren van soorten die wel gevoelig zijn.
 - Verzamelen van materiaal van alle in Nederland beschikbare *Aesculus* soorten en cultivars.
2. Ontwikkeling van een betrouwbaar protocol voor toetsing op gevoeligheid voor bloedingsziekte; d.w.z.
 - Ontwikkeling van een effectieve inoculatietechniek
 - Bepalen criteria voor vaststellen gevoeligheid
 - Validatie d.m.v. pilot experiment met materiaal van enkele bekende genotypen.
3. Bepalen van de mate van gevoeligheid van de genotypen in de onder 1 opgebouwde collectie d.m.v.
 - Opkweek van 10-15 exemplaren van elk genotype.
 - Uitvoeren kunstmatige infectie van hele populatie op containerveld van Wageningen UR.

- Volgen symptoom ontwikkeling en eindbeoordeling van in- en uitwendige symptomen.
- Bepalen relatieve gevoeligheid van geteste genotypen o.b.v. de toetsresultaten.

De onderdelen 1 en 2 lopen parallel en zijn uitgevoerd in de periode 2019-2021, onderdeel 3 is uitgevoerd in de periode 2021-2022.

3 Ontwikkeling betrouwbare toetsmethode

3.1 Inleiding

Om de gevoeligheid van plantensoorten of selecties voor aantasting door ziekteverwekkers te onderzoeken wordt vaak gebruik gemaakt van kunstmatige infectie (inoculatie) van individuen van die soorten met de betreffende ziekteverwekker. Daarvoor zijn betrouwbare en efficiënte toetsmethoden nodig. In Nederland zijn vergelijkbare methoden bijvoorbeeld toegepast in het onderzoek naar de mate van resistentie van nieuwe iepenrassen (*Ulmus* cultivars) tegen iepziekte (Buiteveld e.a., 2014) en het onderzoeken van de gevoeligheid van essensoorten (*Fraxinus* spp.) en cultivars voor essentaksterfte (Hiemstra e.a., 2019; zie ook Wiersma e.a., 2022).

Het Aesculaap onderzoek liet zien dat kunstmatige infectie van paardenkastanje bomen (*Aesculus*) met de bacterie *Pseudomonas syringae* pv *aesculi* (Pae) mogelijk is. In de internationale wetenschappelijke literatuur is dit in de jaren daarna bevestigd (o.a. Laue e.a., 2014), maar het ontbrak in 2018 nog aan een gestandaardiseerde methode voor toetsing van plantmateriaal op grotere schaal. Daarom werd in 2019 bij de start van de tweede fase van het project, naast het beginnen met de opbouw van een te toetsen collectie, gestart met de ontwikkeling van zo'n protocol.

Essentiële onderdelen voor een goede toetsmethode die met kunstmatige infectie werkt zijn drie zaken:

- het gebruik van een isolaat van de ziekteverwekker dat voldoende pathogeen is, d.w.z. ziekteverschijnselen (symptomen) veroorzaakt in kunstmatig geïnfecteerde en gevoelige planten;
- een gestandaardiseerde methode voor kunstmatige infectie van de te testen planten (inoculatie protocol) die betrouwbare en herhaalbare resultaten geeft;
- een duidelijke en eenduidige methode om de symptoom ontwikkeling na infectie te kwantificeren zodat resultaten van verschillende rassen en proeven onderling kunnen worden vergeleken.

Het werk aan deze drie aspecten om te komen tot een betrouwbare toetsmethode voor het screenen van een grote collectie paardenkastanje soorten en selecties wordt in dit hoofdstuk beschreven.

3.2 Keuze isolaten

Voor een toetsing op gevoeligheid voor een pathogeen is een isolaat van dat pathogeen nodig dat in staat is planten te infecteren en daar dan ook ziektesymptomen in te veroorzaken. In april 2019 is daarom begonnen met het testen van een drietal binnen Wageningen UR beschikbare stammen van *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. Daarbij werd gebruik gemaakt van twee recent door het laboratorium in Bleiswijk uit monsters van kastanjes met bloedingsziekte geïsoleerde bacterie-stammen (codes Pae 4 en Pae 20) en een stam uit de collectie van de business unit Biointeracties (code Pae PRI = PD5126).

Deze drie stammen zijn in het laboratorium in Randwijk getest op hun pathogeniteit. Daartoe zijn cultures van de drie stammen vermeerderd door overzetten op King's B agar platen. Vanuit deze nieuwe cultures zijn na 1-2 dagen vloeibare cultures gestart in King's B broth. Na een aantal dagen in een schudmachine bij 25 °C zijn de bacteriecellen uit deze cultures verzameld en opgelost in PBS buffer en verdund tot een concentratie van 10⁶ bacteriën/ml. Deze suspensie is gebruikt als inoculum.

Voor het testen van de pathogeniteit van de drie stammen (Afbeelding 1) is een methodiek gevolgd zoals beschreven door Laue e.a. (2014). In april 2019 werden verse takstukken geknipt van een jonge *Aesculus hippocastanum*, het eventueel (net) uitgelopen blad verwijderd door afsnijden op ca. 1 cm van de tak. Deze takken werden geïnoculeerd door ze onder te dompelen in een celsuspensie van één van de drie bacteriestammen. Daarnaast is een controle behandeling uitgevoerd door onderdompeling in PBS medium zonder bacteriecellen. Voor onderdompeling werden er op elk takstuk meerdere prikwonden aangebracht met een steriele naald. Na de inoculatie werden de takstukken onder hoge luchtvochtigheid 3-4 weken bewaard in een plastic zak bij kamertemperatuur en gedempt licht.

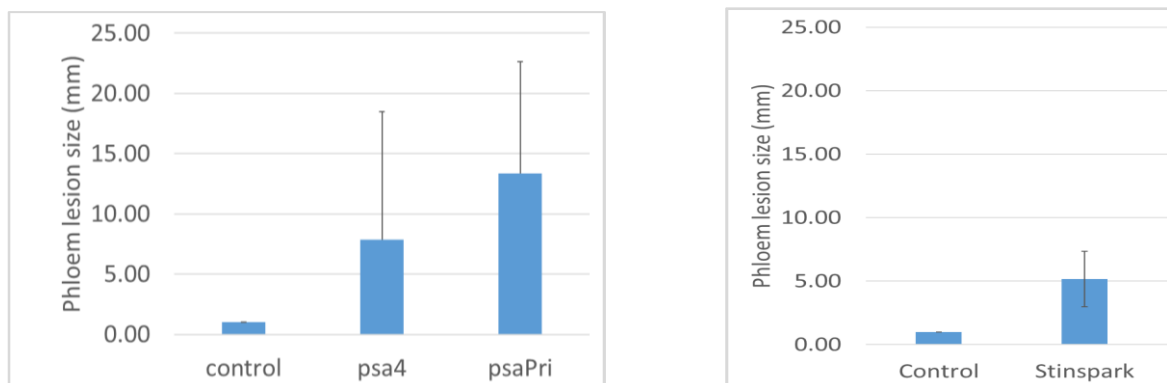


Afbeelding 1 Toetsing pathogeniteit van *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* stammen; bacteriesuspensie (links), gebruikte *Aesculus hippocastanum* takken (midden) en bewaring geïnoculeerde takken onder hoge luchtvochtigheid (rechts).

Na 3 (Pae 4 en Pae PRI) respectievelijk 4 weken (Pae 20) zijn de takken beoordeeld. Daarbij werd de lengte van de laesie (afgestorven plek) in de bast gemeten, zowel aan de buitenkant als na oppervlakkig wegsnijden van de bast. Alle drie stammen bleken duidelijke laesies te veroorzaken rondom de inoculatiewond in tegenstelling tot de controle behandeling waar slechts een beperkte verkleuring direct rond de wond zichtbaar was (afbeelding 2). De gemiddelde lengte van de laesie verschilde wel per stam (Figuur 1). Er vanuit gaande dat de laesielengte een maat is voor de mate van pathogeniteit van de bacteriestammen kan worden geconcludeerd dat de drie stammen allemaal pathogeen zijn maar dat de mate waarin verschilt. Tevens blijkt opnieuw dat het mogelijk is om planten via een wond kunstmatig te infecteren.



Afbeelding 2 Toetsing pathogeniteit van *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* stammen; verkleuring bij controle beperkt tot directe omgeving wond (links) en duidelijke laesie (verkleuring en necrotisch weefsel) rondom wond op tak geïnoculeerd met de Pae-PRI stam (rechts).



Figuur 1 Toetsing pathogeniteit van drie *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* stammen; lesielengte na wond-inoculatie van *Aesculus hippocastanum* takken (NB. Stinspark = Pae 20).

3.3 Ontwikkeling toetsmethode

De volgende stap in het onderzoek was het ontwikkelen en testen van een protocol waarmee kastanje soorten op een betrouwbare en herhaalbare wijze kunnen worden getest op hun gevoeligheid voor bloedingsziekte. Een belangrijke randvoorwaarde daarbij is dat de methode geschikt moet zijn voor het testen van een groot aantal bomen in dezelfde proef om het screenen van de hele opgebouwde collectie genotypen (zie hoofdstuk 4) mogelijk te maken. Hiervoor zijn twee oriënterende proeven en een consultatie van Europese collega onderzoekers uitgevoerd.

3.3.1 Test met afgesneden takken

Voor een grootschalige toetsing van genotypen is het werken met eenjarige takken of delen van takken een stuk eenvoudiger dan het werken met hele planten. Daarom is uitgaande van een publicatie van Laue e.a. (2014) is in eerste instantie geprobeerd om een toetsmethode te ontwikkelen gebaseerd op het inoculeren van afgesneden takken. In juni 2019 is een test uitgevoerd met takken van 10 kastanje genotypen:

<i>Aesculus carnea</i> 'Briotii'	<i>Aesculus parviflora</i>
<i>Aesculus carnea</i> 'Theo Janson'	<i>Aesculus chinensis</i>
<i>Aesculus hippocastanum</i> 'Lichtenvoorde'	<i>Aesculus turbinata</i>
<i>Aesculus hippocastanum</i> 'Baumannii'	<i>Aesculus indica</i>
<i>Aesculus flava</i> 'Vestita'	<i>Aesculus pavia</i>

Per genotype werden 4 takken gebruikt die steeds op 4 plaatsen werden aangeprikt met een naald gedoopt in een suspensie van één van drie verschillende *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Pae) stammen (Afbeelding 3). Daarnaast werd een controle wond aangebracht die niet werd besmet. De takken werden beoordeeld na een incubatieperiode van 3 weken bij kamertemperatuur in een omgeving met hoge luchtvochtigheid. Daarbij werd gekeken naar het al dan niet aanwezig zijn van afgestorven weefsel (laesie) rond de inoculatieplekken, zowel uitwendig als na het wegsnijden van de bast.



Afbeelding 3 Tak van *A. carnea* 'Briotii' na inoculatie; prikwonden zichtbaar net rechts van labels.
Verklaring codes: A, B en C stammen van *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*, O controle; C1 = *Briotii*.

De resultaten waren echter niet eenduidig. In veel gevallen was er, ook bij de geïnoculeerde takken, slechts een kleine verkleurde plek rond de wond zichtbaar, wat kan worden toegeschreven aan de normale wondreacties. Bij een aantal geïnoculeerde takken was er weliswaar wel een duidelijke laesie aanwezig; maar ook bij een deel van de controle behandelingen was een deel van de weefsels rond de inoculatieplek afgestorven (afbeelding 4). Mogelijk is dit een effect van secundaire aantastingen die een kans kregen door de incubatie omstandigheden van de afgesneden takken. Hierdoor bleek het niet mogelijk om met zekerheid onderscheid te maken tussen geïnoculeerde takken en controle takken.



Afbeelding 4 Voorbeelden van het effect van prikinoculaties met een isolaat van *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* in takken van *Aesculus carnea* "Briotii"; zeer beperkte (wond)reactie rond een geïnoculeerde plek (links), sterke verkleuring en weefselsterfte rond een geïnoculeerde plek (midden) en rond een controle plek (rechts). Verklaring codes: A, B en C isolaten van *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*, O controle; C1=Briotii.

Het experiment met inoculatie d.m.v. aanprikken met een met Pae besmette naald is in de zomer van 2019 herhaald met acht planten van elk van vier genotypen; twee waarvan bekend is dat ze (zeer) gevoelig zijn voor bloedingsziekte (*Aesculus carnea* 'Briotii', *Aesculus hippocastanum* 'Baumannii') en twee die naar verwachting minder tot niet gevoelig zijn (*Aesculus indica*, *Aesculus parviflora*). Hierbij werden de takken aan de plant gelaten en de helft van de planten binnen en de andere helft buiten op een containerveld geplaatst. De beoordeling na 3 weken, en voor een deel van de planten na 5 weken, gaf opnieuw geen duidelijk beeld. Slechts een deel van de geïnoculeerde planten van de gevoelige cultivars ontwikkelde symptomen. Daarnaast ontwikkelden zich in dezelfde planten rond de controles vaak ook aanzienlijke laesies.

Op basis van deze twee experimenten werd geconcludeerd dat inoculatie d.m.v. deze methode (aanprikken en beoordelen na enkele weken) niet geschikt is voor een betrouwbare toetsing van een groot sortiment. Daarnaast bleek het werken met losse takken geen goede methode om te komen tot een goed beeld van de gevoeligheid van het te toetsen materiaal.

3.3.2 Aangepast protocol op basis van literatuur en overleg met internationale collega's

Hoewel kastanje bloedingsziekte in heel Europa voorkomt is er internationaal veel minder onderzoek naar gedaan dan naar bijvoorbeeld iepziekte of essentaksterfte. Het aantal publicaties op dit gebied is daardoor zeer beperkt. Twee instituten waar wel aan dit probleem is gewerkt zijn de afdeling Bacteriologie van het Tsjechische Crop Research Institute (VURV) in Praag en het Northern Research Station in Roslin, onderdeel van het Britse Forest Research (Green e.a., 2009; Laue e.a., 2014; Pankova e.a., 2015). Met de betreffende onderzoekers, resp. dr. Iveta Pankova en dr. Sarah Green, is contact gezocht om te vragen naar hun ervaringen en te overleggen over de beste strategie voor het testen van een grote collectie genotypen van paardenkastanje op de mate van gevoeligheid voor kastanje bloedingsziekte.

Uit deze contacten kwam een aantal punten naar voren:

- Het is van belang om isolaten te gebruiken die hun pathogeniteit niet zijn verloren; een goede manier om meer zekerheid in te bouwen is het gebruik van een mix van isolaten en uit te gaan van vers geïsoleerde of goed bewaarde isolaten.
- Het bespuiten van bomen of takken met een bacteriesuspensie en dan inhullen in plastic (of plaatsen in omgeving met hoge luchtvochtigheid) om symptoomontwikkeling te stimuleren is een risicovolle methode en wordt afgeraden.
- Inoculatie via prik- of snijwonden waarbij een bacterie-suspensie actief in een kunstmatige wond op stam of takken van de te testen plant wordt gebracht lijkt een goede methode die ook voor diverse andere ziekten als standaard methode wordt gebruikt.
- De grootte van de laesies die ontstaan rond dergelijke inoculatiewonden lijkt een goede maat voor het kwantificeren van de mate van gevoeligheid van het geteste plantmateriaal.
- De ontwikkeling van laesies is het sterkst op éénjarige scheuten (t.o.v. oudere takken of stam).

- De beste periode hiervoor is laat in de herfst, d.w.z. als de planten net in rust zijn gegaan. Na inoculaties d.m.v. een snijwond in die periode werden laesies tot 15 cm lengte waargenomen.

Op basis van deze inventarisatie en de eigen ervaringen als beschreven in de voorgaande paragrafen is het volgende protocol opgesteld voor de toetsing (hoofdstuk 4) van paardenkastanje genotypen:

- Uitgangsmateriaal: 2-3 jarige planten in containers, buiten op het containerveld in Randwijk.
- Inoculatie met een mix van twee Pae isolaten.
- Kunstmatige infectie via een "stab-inoculation" midden op een eenjarige scheut (topscheut en eventueel zijtakken) waarbij het pathogeen direct in de wond wordt gebracht.
- Uitvoering van de inoculatie vroeg in het rustseizoen (november).
- Beoordeling van het resultaat d.m.v. het meten van de ontstane laesies na 3-6 maanden.

Tevens werd besloten om dit protocol eerst te testen op een beperkte set van genotypen en daarbij twee manieren van "stab-inoculation", aanprikken of aansnijden, te vergelijken op effectiviteit.

3.3.3 Test van het inoculatieprotocol

Werkwijze

In november 2020 werd een inoculatieproef gestart met vier paardenkastanje soorten; twee gevoelige soorten (*A. hippocastanum* 'Baumannii' en *A. carnea* 'Briotii') en twee minder gevoelige soorten (*A. flava* en *A. pavia*). Het centrale doel van het experiment was het testen van de methode als voorbereiding op de voor 2021 geplande grootschalige toetsing. De concrete vragen waren gericht op drie aspecten:

1. Vaststellen van de meest effectieve wijze van inoculeren (d.m.v. prikwond of snijwond);
2. Onderzoeken van de benodigde tijdsduur voor het ontstaan van duidelijke verschillen tussen de te testen soorten;
3. Het controleren van de pathogeniteit van de gebruikte isolaten.

De inoculatie werd uitgevoerd met een celsuspensie bestaande uit een mix van 2 *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* stammen (Pae-PRI en Pae-PD4818) met een concentratie van ca. 10^6 cfu/ml. Het inoculum werd d.m.v. twee verschillende wondtypen (snijwond of prikwond) in contact gebracht met de kastanjabomen. Bij de snij-behandeling werd met een scalpel een snede schuin naar beneden in de bast gemaakt waarna met een injectiespuit 20 µl van het inoculum (Pae mix) in de openstaande wond werd aangebracht. De prikinoculatie werd uitgevoerd door met een prepareernaald gedrenkt in de bacteriesuspensie in de bast te prikken. Beide typen inoculatie werden om en om drie maal per boom uitgevoerd op de bast van 1-jarige scheuten (top en/of zijscheuten). De controle-bomen werden op dezelfde wijze behandeld met het steriele medium (PBS) waarin de bacterie was opgekweekt. Vocht is belangrijk voor een geslaagde infectie. Daarom werden de wonden omwikkeld met parafilm die na 2 weken weer werd verwijderd.

Voor de onderdelen 1 en 2 werden van elke kastanje-soort 6 exemplaren geïnoculeerd; 4 exemplaren kregen een controle behandeling. De helft van de planten van elke soort werd na 3 maanden beoordeeld (planten nog in rust), de andere helft na 6 maanden, d.w.z. na een aantal maanden actieve groei in het volgende seizoen (Afbeelding 5). Daarbij werd voor elke inoculatieplek de lengte van de ontstane laesie gemeten; eerst de uitwendig zichtbare lengte ervan, daarna aan het oppervlak van het hout na het wegsnijden van de bast, en ten slotte in het hout op de plek waar de laesie lengte het grootst was. Voor de laatste meting werd het weefsel in laagjes weggesneden tot de grootste lengte van de laesie was bereikt.

Voor onderdeel 3 werd een aparte set planten gebruikt bestaande uit 6 planten van elk van de twee gevoelige soorten die na 3 maanden werden beoordeeld. De inoculatie werd op exact dezelfde wijze uitgevoerd met als enig verschil dat er nu gebruik werd gemaakt van bacteriecelsuspensies van de afzonderlijke stammen. Een controle behandeling met schoon medium werd niet opnieuw uitgevoerd.



Afbeelding 5 Planten voor beoordeling 3 maanden (links) en 6 maanden na inoculatie (rechts).

Resultaten en discussie

Bij beide wijzen van inoculeren had de controle behandeling geen negatieve effecten op de bomen. De wonden groeiden weer dicht en ook inwendig was er alleen een beperkte verkleuring zichtbaar direct rond de plek van de verwonding (Afbeelding 6). De behandelingen met de Pae-mix daarentegen veroorzaakten in veel gevallen duidelijke laesies. Daarbij waren de uitwendig zichtbare laesies op de bast bij de Baumannii's en Briotti's over het algemeen groter en hadden een wat ander uiterlijk, meer "natte", vlekkerige afgestorven plekken in de bast, terwijl de laesies op de bast bij de Flava's en Pavia's over het algemeen kleiner waren met een meer "droog", vaak gebarsten oppervlak (Afbeelding 7).



Afbeelding 6 Voorbeelden van het effect van de controle behandelingen: goed geheelde prik- (links) en snijwond (midden) op de scheut van een 'Baumannii', 6 maanden na de inoculatie; en een zeer beperkte inwendige verkleuring in de directe omgeving van de wond (rechts) hier in een 'Briotti' 3 maanden na behandeling.

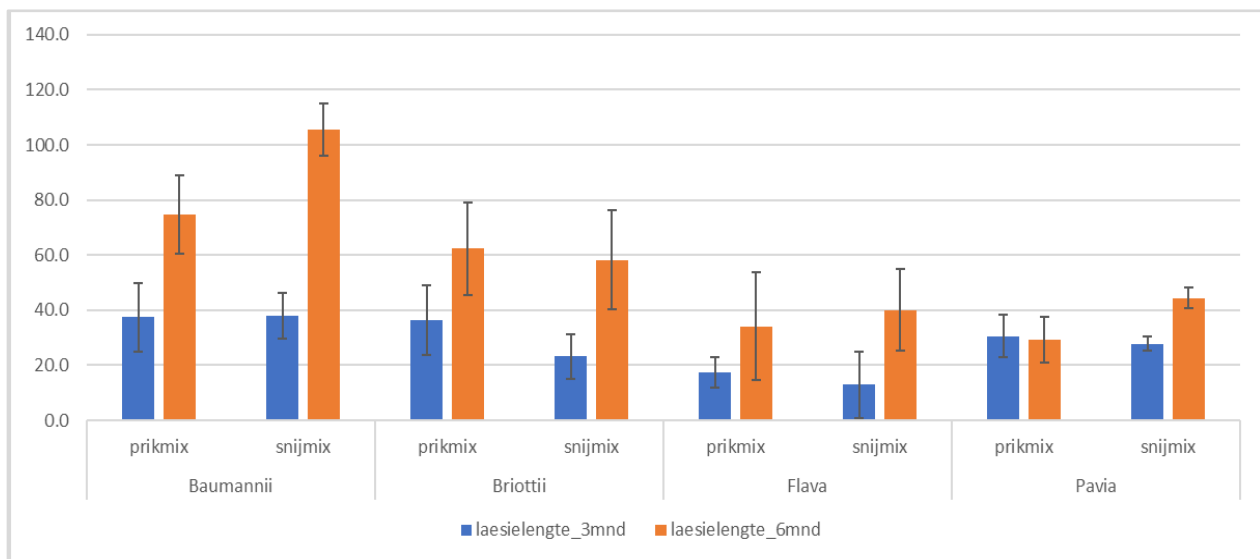


Afbeelding 7 Voorbeelden van verschillende typen laesies; "natte" vlekkerige plekken op *Aesculus hippocastanum* 'Baumannii' en meer droge afgestorven plek op bast van *Aesculus flava*.

Inwendig bleken de laesies (Afbeelding 8) zeker bij de gevoelige soorten vaak veel groter dan aan de buitenkant zichtbaar was. Een eerste analyse van de resultaten van de metingen na 3 en 6 maanden liet zien dat de lengte van de inwendige laesies, met name in de (gevoelige) 'Baumannii' en 'Briotii', in de periode 4 tot 6 maanden na de inoculatie (dus gedurende het groeiseizoen) sterk toenam, waarbij ook de verschillen tussen de soorten groter werden (Figuur 2). Om die reden is de verdere analyse beperkt tot de resultaten na 6 maanden.



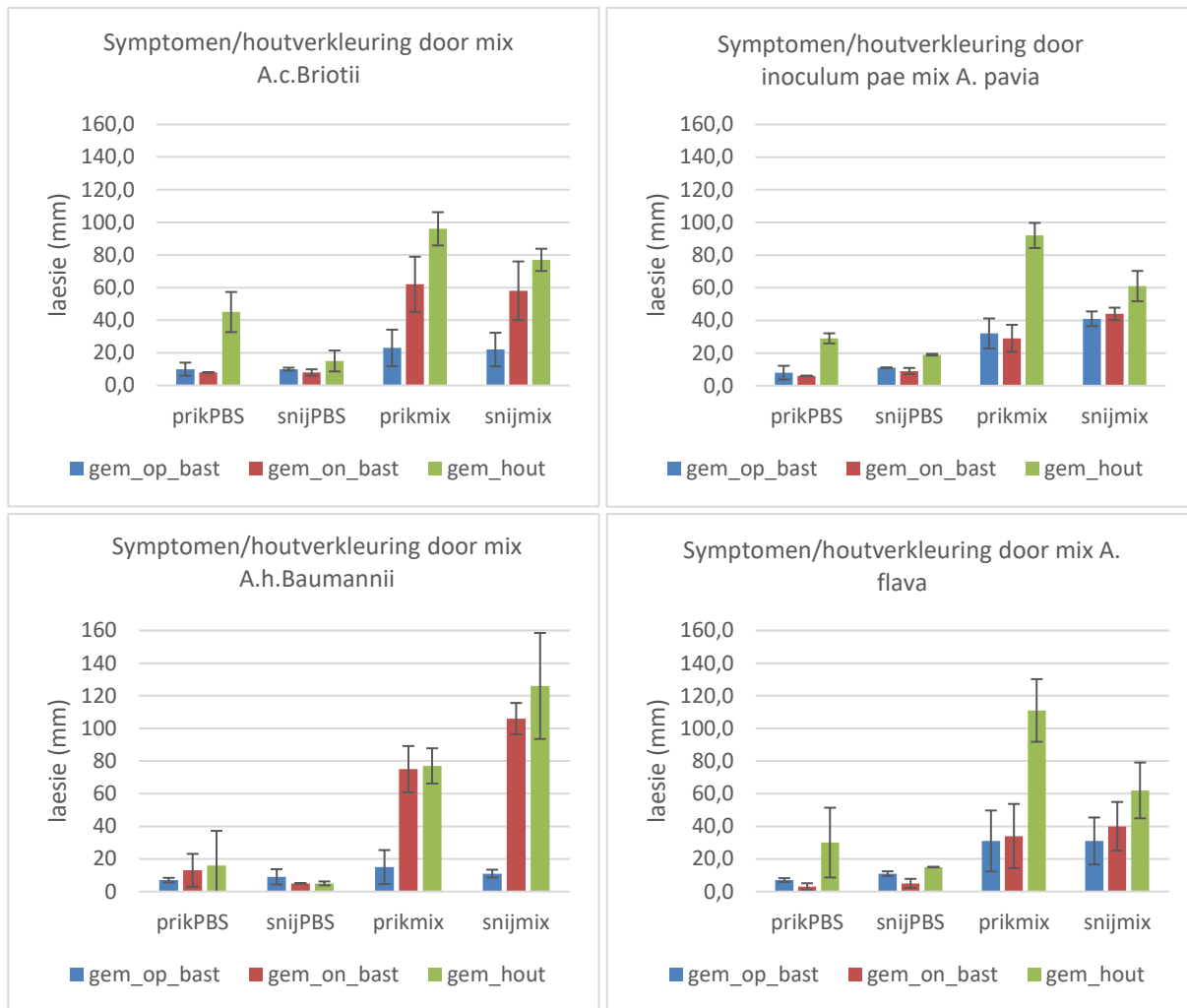
Afbeelding 8 Uitgebreide inwendige laesie in *A. hippocastanum* 'Baumannii' na een prikinoculatie met een mix van twee *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* stammen.



Figuur 2 Gemiddelde lengte (mm) van de laesie gemeten onder de bast op 3 en 6 maanden na de inoculatie; resultaten voor beide wijzen van inoculatie voor de vier in de proef opgenomen *Aesculus* genotypen. Codes behandelingen: Prikmix - inoculatie d.m.v. aanprikken, snijmix - inoculatie d.m.v. aansnijden, in beide gevallen met een inoculum bestaande uit een mix van de twee *P. syringae* pv. *aesculi* stammen.

Uit de analyse van de resultaten na 6 maanden (samengevat in Figuur 3) blijkt dat de aanwezigheid van de bacterie leidt tot grotere laesies dan verwonding alleen. In alle gevallen zijn de laesies na inoculatie (verwonding met bacteriesuspensie in wond) groter zijn dan die veroorzaakt door de controlebehandelingen (verwonding met alleen steriel medium). Daarbij is voor alle vier soorten, onafhankelijk van de inoculatiemethode, de lengte van de laesies binnen in het hout (groene kleur in figuur 3) het grootst, met lengtes tussen 80 en 110 mm na de prikinoculatie en 60 tot 125 mm na snijinoculatie. De verschillen tussen

de geteste soorten zijn na de snijinoculaties (groen) duidelijker, en meer in lijn met de verwachting (*flava* en *pavia* minder gevoelig) dan na de prikinoculaties (rood). Bij prikmethode is bovendien bij twee van de geteste soorten ook een aanzienlijke verkleuring waargenomen in de controleplanten. Hierdoor is ook het verschil tussen de controles en de geïnoculeerde planten bij de snijmethode duidelijker en meer consistent.



Figuur 3 Gemiddelde lengte van de laesies 6 maanden na inoculatie; resultaten van alle behandelingen voor de vier in de proef opgenomen *Aesculus* genotypen. Lengte laesies uitwendig gemeten (blauw), onder de bast (rood) en maximaal in het hout gemeten lengte (groen). Zie voor codes van de behandelingen figuur 2, prikPBS en snijPBS zijn de controle behandelingen.

Conclusie

Het blijkt goed mogelijk om verschillende *Aesculus* soorten d.m.v. een wondinoculatie met een celsuspensie van *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*, de veroorzaker van de kastanje bloedingsziekte, kunstmatig te infecteren. De uitgevoerd inoculaties leidden tot duidelijke laesies, waarvan de omvang binnen in het hout (t.o.v. uitwendig zichtbare bastlaesies en de verkleuring in het hout onder de bast) het grootst zijn. De verschillen in de waargenomen gemiddelde lengte van de laesies per soort correspondeerden met de verwachte verschillen in gevoeligheid van de in de test gebruikte *Aesculus* soorten. Daarbij waren de verschillen tussen geïnoculeerde en controleplanten het duidelijkst na inoculatie via een snijwond.

Geconcludeerd kan worden dat een procedure uitgaande van inoculatie d.m.v. een snijwond en beoordeling van de mate van gevoeligheid van de genotypen door het meten van de inwendige laesies 6 maanden na inoculatie een geschikte methode is om te gebruiken in de toetsing van een grote collectie genotypen.

4 Grootschalige toetsing *Aesculus* sortiment

4.1 Opbouw te toetsen collectie

Het doel van de tweede fase in het project was het vinden van minder voor kastanje bloedingsziekte gevoelige typen paardenkastanje door de toetsing van een zo groot mogelijk sortiment *Aesculus* genotypen. Daartoe is vanaf het begin van het project gewerkt aan de opbouw van een grote collectie *Aesculus* soorten en cultivars. Zo veel mogelijk in Nederland beschikbare soorten en cultivars zijn aangekocht via diverse boomkwekerijen. De aangekochte soorten zijn gewoonlijk vermeerderd uit zaad, de cultivars via enten op zaailing onderstammen.

Deze collectie is verder aangevuld met planten gekweekt uit materiaal van tot nog toe gezond gebleven, en daarmee mogelijk minder gevoelige, *Aesculus hippocastanum* individuen. Door medewerkers van de gemeentes Den Haag en Utrecht, en elders in het land door Jaap Smit (Trompenburg Tuinen en Arboretum) en Ronnie Nijboer (Noordplant Kwekerijen), zijn individuen geselecteerd die opvallend gezond bleven in een omgeving met veel door kastanje bloedingsziekte aangetaste bomen. Hiervan is entmateriaal verzameld wat door boomkwekerij 't Herenland (selecties Utrecht) en boomkwekerij Noordplant (alle andere selecties) t.b.v. het project is vermeerderd d.m.v. enten op zaailing onderstammen.

Dit materiaal werd in de periode 2019-2021 geleverd aan Wageningen Plant Research en is op het containerveld in Randwijk (Afbeelding 9) doorgekweekt tot aan de inoculatie in november 2021. Hoewel dit om praktische redenen voor de zeldzame soorten en de nieuwe selecties niet altijd lukte werd daarbij gestreefd naar de opbouw van een collectie van minimaal 15 planten per genotype. Eind 2021 was zo een verzameling van ca. 800 planten van 48 genotypen (16 soorten, 11 cultivars en 25 nieuwe selecties) opgebouwd (Tabel 1). Binnen deze collectie zijn door de wijze van vermeerdering alle planten van een cultivar of van één van de nieuwe selecties genetisch identiek (klonen). Voor 12 van de 16 soorten waren ook planten op soortniveau aanwezig, d.w.z. planten gekweekt uit zaailingen en daarmee genetisch niet geheel identieke planten.

Tabel 1 Voor toetsing opgebouwde collectie van *Aesculus* genotypen.

Soorten	Soortniveau	Cultivars	Aantal nieuwe Selecties
<i>Aesculus hippocastanum</i>	ja	'Umbraculifera' 'Baumannii' 'Lichtenvoorde'	25
<i>Aesculus bushii</i>	ja	--	--
<i>Aesculus californica</i>	ja	--	--
<i>Aesculus carnea</i>	--	'Briotii' 'Theo Janson'	--
<i>Aesculus chinensis</i>	ja	--	--
<i>Aesculus flava</i>	ja	'Vestita'	--
<i>Aesculus glabra</i>	--	'Autumn Blaze'	--
<i>Aesculus indica</i>	--	'Sydney Pearce'	--
<i>Aesculus mississippiensis</i>	ja	--	--
<i>Aesculus mutabilis</i>	--	'Induta'	--
<i>Aesculus neglecta</i>	ja	'Georgiana'	--
<i>Aesculus parviflora</i>	Ja	--	--
<i>Aesculus pavia</i>	ja	'Koehnei'	--
<i>Aesculus turbinata</i>	ja	--	--
<i>Aesculus sylvatica</i>	ja	--	--
<i>Aesculus indica</i>	ja	--	--
Aantal: 16	12	11	25

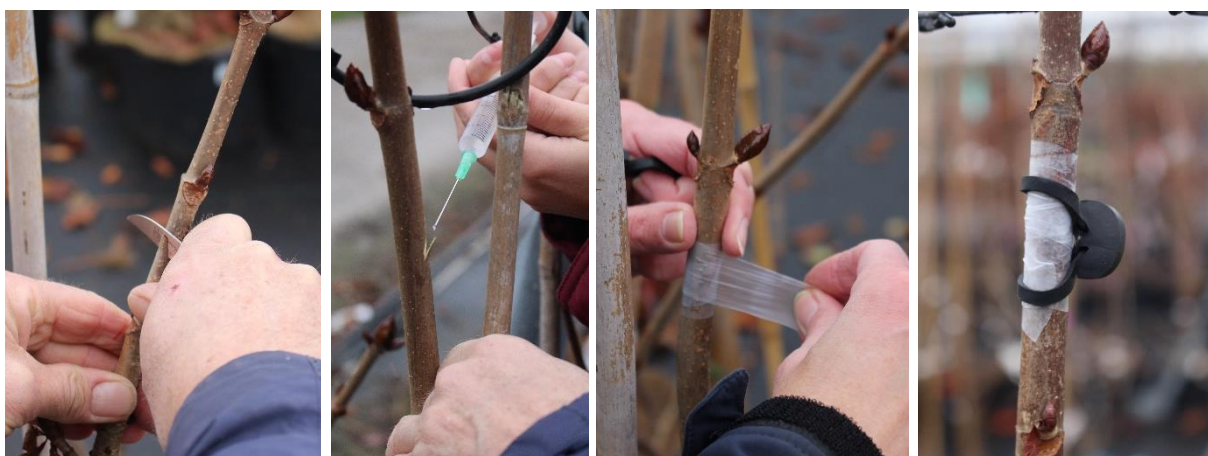


Afbeelding 9 Proefveld in Randwijk met (deel van) Aesculus collectie in april (links) en juli (rechts) 2020.

4.2 Wijze van toetsing

Het voor de toetsing ontwikkelde protocol (zie hoofdstuk 3) gaat uit van inoculatie van de topscheut. Daarom zijn in november 2021 uit de collectie de planten geselecteerd die gezond waren en een voldoende lange topscheut hadden zodat de ontwikkeling van de laesie na inoculatie niet beperkt zou worden door de overgang (internodium) naar de voorgaande scheut. In de praktijk is uitgegaan van een minimale lengte van minstens 20 cm. Voor enkele zeer langzaam groeiende soorten is daarvan afgeweken en zijn de grootste exemplaren geselecteerd. Het streven daarbij was om minimaal 15 scheuten (10 om te inoculeren en 5 controles) per genotype te gebruiken. Dit aantal planten was niet voor alle genotypen beschikbaar, in dergelijke gevallen is geprobeerd om door ook op zijscheuten inoculaties te plaatsen toch zo dicht mogelijk bij het aantal van 15 behandelde takken per genotype te komen. De voor de toetsing te gebruiken planten en takken zijn vooraf gemerkt met labels met daarop de uit te voeren behandeling (inoculatie/controle). De inoculatie is uitgevoerd op 24, 25 en 26 november 2021 op het containerveld in Randwijk. Hier zijn de planten ook blijven staan tot aan de eindbeoordeling. De soorten en cultivars stonden door elkaar in een volledig gerandomiseerd plaatsingsschema.

Bij de uitvoering van de inoculatie werd halverwege de eindscheut van een te inoculeren plant een schuin omlaag gerichte snede in de bast tot aan het hout gemaakt, waarna met een injectiespuit een druppel van 20 µl bacteriesuspensie in de wond werd aangebracht. De controle behandeling bestond uit het aanbrengen van een druppel steriele PBS buffer in de wond. Alle wonden werden na inoculatie afgedekt met parafilm, dat na 2 weken weer werd verwijderd (Afbeelding 10).



Afbeelding 10 Uitvoering inoculatie; van links naar rechts aansnijden, aanbrengen inoculum, omwikkelen met parafilm, aanbrengen van elastiek.

Voor de inoculatie is een bacterie suspensie gebruikt bestaande uit een mix van 2 *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* stammen (Pae-PD4818 en Pae-PRI = PD5126), dezelfde mix als in het voorbereidende experiment (zie hoofdstuk 3). De twee Pae stammen, bewaard bij -80 °C in glycerol stocks, zijn geënt op King's B agar platen (duchefa K5165). Deze platen zijn afhankelijk van groeisnelheid 1-2 dagen weggezet bij 25 °C. Vervolgens is een vloeibare cultuur gestart in King's B broth door enten met een losliggende kolonie van een

agar plaat. Na enkele dagen in een schudmachine (25 °C en 125 rpm) zijn de bacteriën uit deze schudcultures verzameld d.m.v. centrifugeren en daarna opgelost in een PBS buffer en verdund tot 10^6 bacteriën per μl . Ten slotte zijn gelijke hoeveelheden van suspensies van de twee bacteriestammen samengevoegd tot één mix die is gebruikt als inoculum.

De eindbeoordeling is uitgevoerd in de eerste week van augustus 2022, d.w.z. ruim 8 maanden na inoculatie. Daarbij werden van alle behandelde bomen de stam- of takdelen waarop de inoculatie was uitgevoerd uit de boom geknipt, gelabeld en naar het laboratorium gebracht voor het meten van de rond de inoculatiewonden ontstane laesies (Afbeelding 11). Voorafgaande aan het knippen is van alle geïnoculeerde stammen en takken de lengte van de betreffende jaar scheut en de diameter ervan aan de basis (1 cm boven jaargrens) bepaald. Op het laboratorium zijn vervolgens per afgeknipte scheut de volgende metingen verricht:

- Lengte uitwendige laesie: totale lengte en lengte van inoculatieplek omlaag.
- Maximale lengte inwendige laesie: totaal en van inoculatieplek omlaag; hiervoor werd het weefsel voorzichtig in laagjes weggesneden.

Daarbij werden van elke scheut twee foto's gemaakt; van de uitwendige laesie en van de maximale inwendige laesie.



Afbeelding 11 Waarnemingen: knippen geïnoculeerde scheut op veld (links), takken op labtafel (midden), idem na verwijderen blad t.b.v. meten laesie lengtes (rechts).

4.3 Resultaten en discussie

In totaal werden er in augustus 2021 659 inoculaties (incl. controle behandelingen) uitgevoerd op in totaal 514 planten van 48 genotypen. Gedurende het groeiseizoen van 2022 zijn er enkele planten om onbekende redenen afgestorven en is bij een aantal andere planten de top afgebroken of boven de inoculatieplek afgestorven. Van 4 genotypen bleven te weinig planten over om een analyse uit te kunnen voeren. Hierdoor waren er bij de beoordeling in augustus 2022 nog 415 bruikbare geïnoculeerde scheuten en 146 controlescheuten over. Een samenvatting van de meetgegevens van de 44 overgebleven genotypen is opgenomen in Bijlage 3.

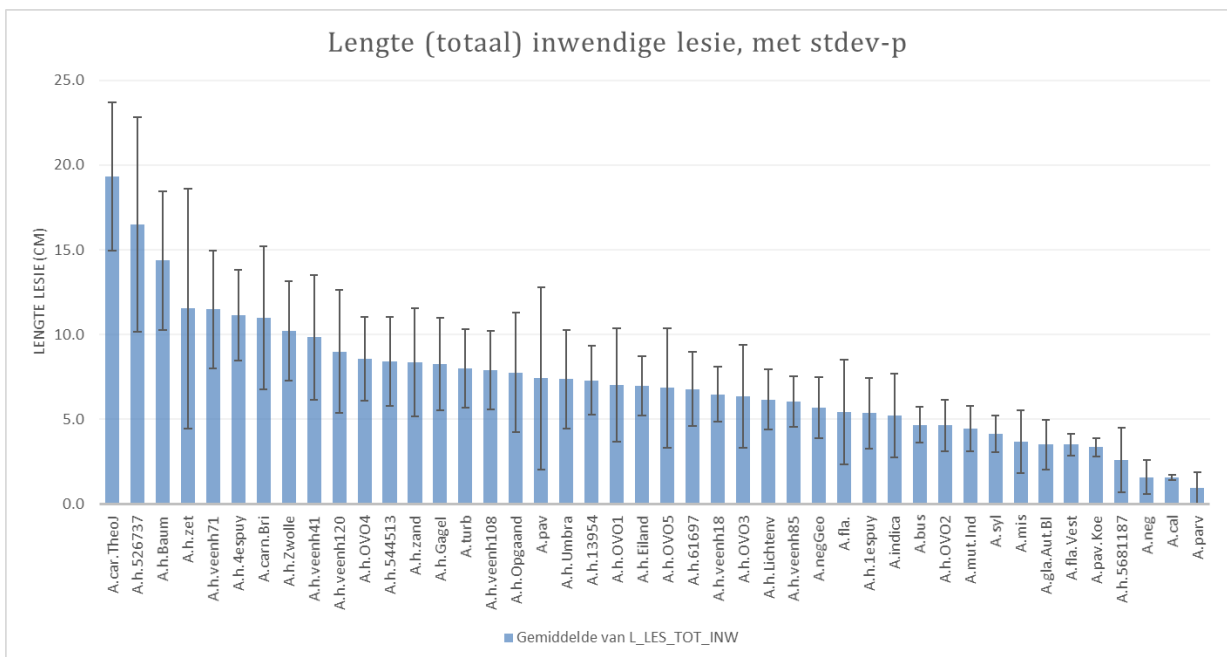
De selectie van planten met voldoende lange scheuten blijkt goed te hebben gewerkt. De laesies bleven ruim verwijderd van de jaargrens van het betreffende internodium, zowel naar boven als naar beneden. Hierdoor kon in alle gevallen de totale lengte worden gemeten zonder dat deze lijkt te zijn beperkt door de lengte van het betreffende internodium. Bij de analyse van de meetgegevens bleek er geen duidelijke correlatie te zijn tussen de gevonden laesielengtes en die van de internodia waarop die laesies aanwezig waren (zeer lage R^2). Op dezelfde wijze werd er geen duidelijk verband gevonden tussen de laesielengtes en de diameter van de betreffende scheuten (zie figuren in Bijlage 4).

Al bij het verzamelen van de meetgegevens bleek dat ook nu de laesies in de controle planten (behandeld met een oplossing zonder bacteria) veel kleiner zijn dan in geïnoculeerde planten (behandeld met oplossing met bacteria). In de controle planten was er gewoonlijk alleen een beperkte verkleuring onder de bast in de onmiddellijke omgeving van de wond zichtbaar. In geïnoculeerde planten van hetzelfde genotype was de laesie meestal al aan de buitenkant zichtbaar en veel uitgestrekter (Afbeelding 12).



Afbeelding 12 Beperkte verkleuring rond inoculatiewond in controleplant (links) en uitgebreide lesie in geïnoculeerde plant.

De gemeten laesielengtes varieerden sterk. Daarbij was er enerzijds vaak sprake van veel variatie binnen een genotype en anderzijds grote verschillen tussen de gemiddelde laesielengtes van de verschillende genotypen (Figuur 4). Door de grote standaard deviatie van die gemiddelden is het lastig om de individuele genotypen onderling te vergelijken. Als de genotypen worden gerangschikt volgens aflopende laesielengte zoals in Figuur 4, zijn twee naast elkaar geplaatste genotypen daarom statistisch niet van elkaar te onderscheiden. De rangorde is daarmee niet volledig zeker, maar de verschillen tussen verder van elkaar geplaatste genotypen zijn wel significant. Met andere woorden er kunnen wel groepen worden onderscheiden waarbij de genotypen met zeer beperkte laesies ook statistisch gezien minder gevoelig voor kastanje bloedingsziekte zijn dan die met veel grotere laesies (Tabel 2).



Figuur 4 Gemiddelde totale lengte (met standaard deviatie) van de inwendige laesies voor alle geteste genotypen.

Tabel 2

Statistische analyse van de verschillen in de gemeten gemiddelde laesielengtes per soort; de verschillen tussen soorten gevolgd door dezelfde letter zijn statistisch niet significant ($p = 0.05$; analyse na worteltransformatie van de waarden om de variantie te stabiliseren)

naam													
A.parv	a
A.neg	a	b
A.cal	a	b	c
A.h.5681187	.	b	c
A.mis	.	b	c	d
A.pav.Koe	.	b	c	d	e
A.flav.Vest	.	b	c	d	e
A.gla.Aut.BI	.	b	c	d	e	f
A.syl	.	.	c	d	e	f
A.mut.Ind	.	.	c	d	e	f
A.h.OVO2	.	.	c	d	e	f
A.bus	.	.	c	d	e	f	g
A.indica	.	.	.	d	e	f	g
A.flav.	.	.	.	d	e	f	g
A.h.1espuy	.	.	.	d	e	f	g
A.negGeo	.	.	.	d	e	f	g	h
A.h.OVO3	.	.	.	d	e	f	g	h
A.h.veenh85	.	.	.	d	e	f	g	h
A.h.Lichtenv	e	f	g	h
A.h.OVO1	e	f	g	h
A.h.veenh18	e	f	g	h	i
A.h.OVO5	f	g	h	i
A.pav	f	g	h	i
A.h.61697	f	g	h	i
A.h.Umbra	f	g	h	i
A.h.Eiland	f	g	h	i
A.h.Umbra	f	g	h	i
A.h.13954	f	g	h	i
A.h.veenh108	f	g	h	i	j	.	.	.
A.turb	g	h	i	j	.	.	.
A.h.zand	g	h	i	j	.	.	.
A.h.Gagel	g	h	i	j	.	.	.
A.h.544513	g	h	i	j	.	.	.
A.h.OVO4	h	i	j	.	.	.
A.h.veenh120	h	i	j	.	.	.
A.h.veenh41	h	i	j	k	.	.
A.h.Zwolle	i	j	k	.	.
A.carn.Bri	j	k	.	.
A.h.zet	j	k	.	.
A.h.4espuy	j	k	.	.
A.h.veenh71	j	k	.	.
A.h.Baum	k	l	.
A.h.526737	l	m
A.car.TheoJ	m

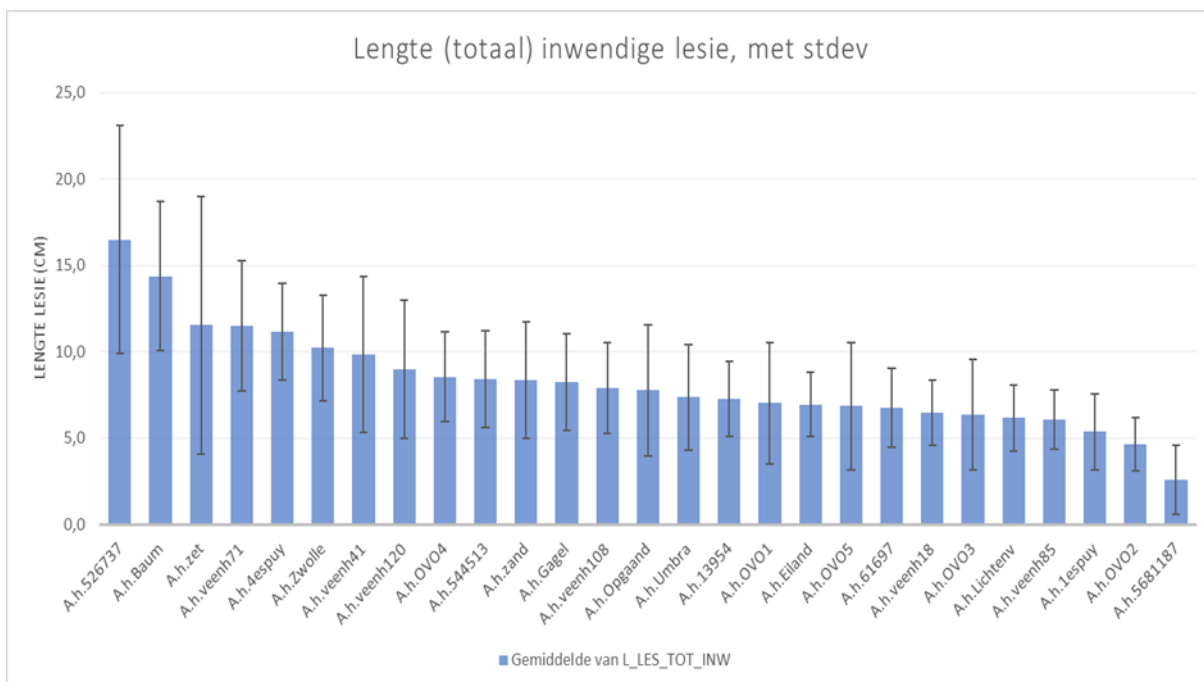
De volgorde van de bekendere soorten en cultivars in figuur 4 is zoals verwacht kon worden op basis van praktijk ervaringen. Zeer gevoelige genotypen als zoals 'Baumannii' (code A.h.Baum) en 'Briotii' (A.h.Bri) en ook de *Aesculus hippocastanum* zaailingen (A.h.zet) staan aan de kant met de grote laesies en *Aesculus flava* (A.fl.a.) en 'Vestita' (A.fl.a.Ves) die in de praktijk minder last lijken te hebben staan aan de kant met beperkte laesievorming na inoculatie. Vergelijking van de resultaten voor de soorten die zowel in de jaarlijkse monitoring van de gemeente den Haag als in deze toets zijn opgenomen bevestigt dit beeld (Tabel 3). De resultaten van de toetsing corresponderen voor de meer algemene genotypen dus goed met de ervaringen in de praktijk.

Tabel 3 Vergelijking van de toetsingsresultaten met de resultaten van de jaarlijkse monitoring van de kastanjes in den Haag (vdSluis e.a., 2022) voor genotypen die voorkomen in beide onderzoeken.

Soort	Zaailingen/ cultivar	Monitoring Den Haag (% aangetast)	Toetsingsexperiment (lengte inwendige laesie)
<i>Aesculus carnea</i>	'Theo Janson'	--	193 mm
<i>Aesculus carnea</i>	'Briotii'	73 %	110 mm
<i>Aesculus hippocastanum</i>	'Baumannii'	73 %	144 mm
<i>Aesculus hippocastanum</i>	zaailingen	60 %	115 mm
<i>Aesculus pavia</i>	zaailingen	7 %	74 mm
<i>Aesculus pavia</i>	'Koehnei'	--	33 mm
<i>Aesculus flava</i>	zaailingen	12 %	54 mm
<i>Aesculus flava</i>	'Vestita'	3 %	35 mm

De spreiding in de laesielengte van de verschillende genotypen (Figuur 4) is groot. Dit geldt niet alleen voor het getoetste sortiment als geheel (van maximaal 165 mm tot minimaal 10 mm), maar ook binnen de soort *Aesculus hippocastanum*. Van deze soort zijn in de toetsing niet alleen de soort (als groep zaailingen) en 3 cultivars ('Baumannii', 'Lichtenvoorde' en 'Umbraculifera') getoetst, maar ook 23 selecties (klonen van "opvallend gezonde" *A. hippocastanum* zaailingen). Opvallend is dat in deze groep *hippocastanum* genotypen de variatie in laesielengte (Figuur 5) bijna even groot is als in de totale geteste groep! De maximale laesielengte (165 mm) is zelfs de maximaal gemeten laesielengte in de hele toets en de minimale (26 mm) is maar 3 plekken verwijderd van de minimale laesielengte in de hele toets. De drie van deze soort geteste cultivars zitten verspreid in dit spectrum, 'Baumannii' zoals verwacht aan de kant van de meest gevoelige genotypen, 'Umbraculifera' ergens in de midden en 'Lichtenvoorde' helemaal aan de kant van de minder gevoelige genotypen.

In de praktijk staat *A. hippocastanum* als soort bekend als zeer gevoelig voor kastanje bloedingsziekte. De resultaten van de selecties van deze soort (= kloontjes van geselecteerde individuen) in de toets zijn zeker niet strijdig daarmee. De geteste selecties zijn ontwikkeld uit bomen die gekozen waren, juist omdat ze opvallend gezond bleven in een omgeving met hoge ziektedruk. Daarmee zijn ze geen doorsnee van de soort, die op soortniveau (code A.h.zet) ook als een van de meest gevoelige genotypen in de test scoorde. Maar het toont wel aan dat er zelfs binnen deze soort variatie is in de mate van gevoeligheid, en er zelfs individuen zijn met een sterk verlaagde gevoeligheid t.o.v. wat voor de soort gebruikelijk is.



Figuur 5 Gemiddelde totale lengte (met standaard deviatie) van de inwendige laesies voor alle geteste *A. hippocastanum* genotypen (cultivars, selecties en onderstammen (*A.h.zet*)).

4.4 Conclusies

Het in dit project ontwikkelde inoculatie protocol blijkt een effectieve wijze om jonge kastanjabomen (*Aesculus sp.*) kunstmatig te infecteren met de veroorzaker van de kastanje bloedingsziekte, *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. De lengte van de laesies die na inoculatie ontstaan bleken niet beïnvloed te worden door de lengte of diameter van de geïnoculeerde scheut. De waargenomen verschillen in de lengte van de laesie bij verschillende genotypen zijn daarom niet het gevolg van de groeikracht van de betreffende planten, maar kunnen worden toegeschreven aan de mate waarin de betreffende plant de activiteit van de ziekteverwekker weet te beperken. De gemeten laesielengtes kunnen daarom gezien worden als een maat voor de mate van gevoeligheid van het betreffende genotype.

Uit de resultaten blijkt tevens dat het gebruikte inoculatieprotocol goed geschikt is om *Aesculus* genotypen te toetsen op hun gevoeligheid voor kastanje bloedingsziekte. Zowel op soortniveau (dus tussen soorten onderling) als binnen soorten (tussen cultivars of selecties van één soort) werden duidelijke verschillen in gevoeligheid waargenomen:

- De soorten *A. parviflora*, *A. neglecta*, *A. californica*, *A. missipiensis*, *A. sylvatica*, *A. bushii*, *A. indica* en *A. flava* evenals de cultivars *A. pavia* 'Koehnei', *A. flava* 'Vestita', *A. mutabilis* 'Induta' en twee selecties van *A. hippocastanum* (5681187 en OVO2) vertoonden significant minder symptomen dan de groep met de meeste symptomen (volgende bullet).
- Daarentegen was er ook een groep met significant sterker symptomen dan de hiervoor genoemde groep. Tot deze zeer gevoelige groep behoren, zoals verwacht, de cultivars 'Briotii' (*A. carnea*) en 'Baumannii' (*A. hippocastanum*) en daarnaast nog een *A. carnea* cultivar (Theo Janson) en 5 van de geteste nieuwe *A. hippocastanum* selecties.
- Tot de grote middengroep die, als gevolg van de grote variatie in de laesielengtes per soort, statistisch niet goed valt te onderscheiden van de voorgaande groepen behoren de soorten *A. pavia* en *A. turbinata*, een cultivar van *A. neglecta* en een groot aantal van de *A. hippocastanum* selecties.

5 Slotconclusies en aanbevelingen

Het in dit project ontwikkelde inoculatie protocol is een effectieve wijze om jonge kastanjabomen (*Aesculus* sp.) kunstmatig te infecteren met de veroorzaker van de kastanje bloedingsziekte, de bacterie *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. De gemiddelde lengte van de resulterende laesies rond de inoculatieplek kan daarbij gebruikt worden als een maat voor de mate van gevoeligheid van het betreffende genotype.

Uit de resultaten van de toetsing van een groot sortiment *Aesculus* genotypen blijkt dat niet alle genotypen even gevoelig zijn. Dit geldt niet alleen bij vergelijking van de verschillende soorten onderling, maar ook bij vergelijking van selecties binnen soorten. Zelfs binnen de als soort zeer gevoelige gewone paardenkastanje (*A. hippocastanum*) bleek een aantal van de geteste nieuwe selecties opvallend weinig gevoelig. Dit biedt mogelijkheden voor de ontwikkeling van nieuwe voor kastanje bloedingsziekte minder gevoelige kastanje typen, in de eerste plaats door het kiezen van minder gevoelige soorten, maar daarnaast ook door selectie binnen gevoelige soorten. Daarmee bieden de resultaten nieuwe perspectieven voor het behoud van de paardenkastanje als stadsboom.

Om dit te realiseren dient het onderzoek naar minder gevoelige selecties voortgezet te worden. Onderdelen daarvan zijn:

- Voortzetting van het opsporen van veelbelovende gezonde bomen van *A. hippocastanum* en uitbreiding van de zoektocht naar andere gevoelige soorten.
- Vermeerdering van de beste selecties uit het huidige onderzoek en van de nieuwe selecties uit het voorgaande punt.
- Opzetten van een testprogramma voor de selecties uit de voorgaande twee punten.

Als basis voor dergelijk onderzoek is een brede collectie van *Aesculus* genotypen nodig. Daarom wordt aanbevolen om een *Aesculus* genenbank op te bouwen door een zo groot mogelijke collectie van soorten, cultivars en selecties bijeen te brengen om verder onderzoek te faciliteren.

Voor het gebruik van DNA technieken om de aanwezigheid van resistentie in een populatie van genotypen te onderzoeken (genotypering) is een betrouwbare methode nodig om de gevoeligheid voor de betreffende ziekteverwekker vast te stellen aan de hand van symptoomontwikkeling na infectie (fenotypering). De nu ontwikkelde toetsmethode voor fenotypering en de daarmee opgebouwde kennis van de verschillen in mate van resistentie van een redelijk grote collectie *Aesculus* genotypen zijn daarom een eerste stap om het gebruik van moleculair biologische technieken voor de selectie van resistente kastanje genotypen mogelijk te maken. Dergelijke technieken kunnen selectie op resistentie sterk versnellen en bovendien kan daarmee op veel groter schaal worden geselecteerd. In de afgelopen jaren zijn de technieken daarvoor sterk verbeterd. Aanbevolen wordt om opnieuw de mogelijkheden te verkennen om deze technieken toe te passen om oplossingen te vinden voor het probleem van de kastanje bloedingsziekte. Ook voor dergelijk onderzoek is de hiervoor genoemde *Aesculus* collectie (genenbank) zeer waardevol.

Literatuur

- Buiteveld, J., B. van der Werf & J.A. Hiemstra, 2014. Comparison of commercial elm cultivars and promising unreleased Dutch clones for resistance to *Ophiostoma novo-ulmi*. iForest (early view): e1-e7 [online 2014-08-07] URL: <http://www.sisef.it/forest/contents/?id=ifor1209-008>
- de Keijzer, J., L.A.M. van den Broek, T. Ketelaar & A.A.M. van Lammeren, 2012. Histological Examination of Horse Chestnut Infection by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* and Non-Destructive Heat Treatment to Stop Disease Progression. PLoS ONE 7(7): e39604. doi:10.1371/journal.pone.0039604
- Dijkshoorn-Dekker, M.W.C. & G.J. van Os, 2008. Eindrapport Onderzoeksprogramma "Behoud de kastanje" DEEL 2. Werkgroep Aesculaap, 96 blz. <https://edepot.wur.nl/214834>
- Green, S., B. Laue, C.G. Fossdal, S.W. A'Hara & J. E. Cottrell, 2009. Infection of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* and its detection by quantitative real-time PCR. Plant Pathology 58:731-744
- Harper, A. L. et al. Molecular markers for tolerance of European ash (*Fraxinus excelsior*) to dieback disease identified using Associative Transcriptomics. Sci. Rep. 6, 19335; doi: 10.1038/srep19335 (2016).
- Hiemstra, J.A. et al., 2019. Report on ash tree varieties less susceptible or resistant to *Chalara fraxinea* and their availability to practice. Deliverable 3.7 of the EU-EMPHASIS project. See: www.emphasisproject.eu Deliverable page 7.
- Jones, J.B., L.E. Jackson, B. Balogh, A. Obradovic, F.B. Iriarte & M.T. Momol, 2007. Bacteriophages for plant disease control. Annu. Rev. Phytopathol 45:245-262.
- Kleis, R., A.A.M. van Lammeren & C.A. Korsuize, 2015. Een groot deel van de kastanjabomen in ons land bloedt. De oorzaak is een lastig te bestrijden bacterie. Wageningse wetenschappers hebben nu een oplossing die even simpel als geniaal is: verwarmen. RESOURCE 30 april 2015. <https://edepot.wur.nl/341442>
- Laue, B.E., H. Steele & S. Green, 2014. Survival, cold tolerance and seasonality of infection of European horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. Plant Pathology 63:1417-1425
- Pánková, I., V. Krejzar, J. Mertelík & K. Kloudová, 2015. The occurrence of lines tolerant to the causal agent of bleeding canker, *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*, in a natural horse chestnut population in Central Europe. Eur. J. Plant Pathol. (2015) 142:37-47.
- van der Sluis, B.J., J.A. Hiemstra & L. Slingerland, 2022. Inventarisatie van de uitbreiding van de bloedingsziekte in paardenkastanjabomen in Den Haag. Rapport WPR-OT-958
- van Kuik, F., 2016. Een inventarisatie van de uitbreiding van de bloedingsziekte in paardenkastanjabomen in Den Haag; 2016. Wageningen Plant Research, Rapport 2017-02. <https://edepot.wur.nl/404336>
- van Os, G.J. & M.W.C. Dijkshoorn-Dekker, 2009. Vier jaar onderzoek naar de kastanjeziekte. In: Bomen - Nieuwsbrief van Het Boschap 2009-8. <https://edepot.wur.nl/136968>
- Wiersma, H., J. Buiteveld, J. Hiemstra & P. Copini, 2022. Assessment of lesion development in *Fraxinus excelsior* cultivars Altena, Atlas and Westhof's Glorie inoculated with different isolates of *Hymenoscyphus fraxineus*. Forest Pathology 52, e12772. <https://doi.org/10.1111/efp.12772>
- Woodcock, P., M. Marzano & C.P. Quine, 2019. Key lessons from resistant tree breeding programmes in the Northern Hemisphere. Annals of Forest Science 76:51. <https://doi.org/10.1007/s13595-019-0826-y>

Bijlage 1 Plan van aanpak "Toekomst voor de paardenkastanje"

Plan van aanpak

"Toekomst voor de paardenkastanje"



In samenwerking met het Oogstfonds en met
de werkgroep Aesculaap

Concept ter voorlegging aan de begeleidingscommissie d.d. 13
november 2018

INHOUDSOPGAVE

<u>1</u>	<u>Inleiding</u>	37
<u>2</u>	<u>Plan van aanpak</u>	38
<u>2.1</u>	<u>Fase 1</u>	38
<u>2.2</u>	<u>Fase 2</u>	38
<u>2.3</u>	<u>Te verkennen methoden en technieken voor fase 2:</u>	39
<u>2.3.1</u>	<u>Genenbank Aesculus</u>	39
<u>2.3.2</u>	<u>Moleculaire technieken</u>	39
<u>2.3.3</u>	<u>Toetssysteem WUR</u>	39
<u>2.3.4</u>	<u>Bestrijding van de ziekteverwekker Psa</u>	40
<u>2.3.5</u>	<u>City Tree Lab Den Haag</u>	40
<u>3</u>	<u>Communicatie en programmacoördinatie</u>	41
<u>4</u>	<u>Raming tijd en kosten</u>	42
<u>5</u>	<u>Organisatiestructuur</u>	43

Colofon

Ir. A.J. (Fons) van Kuik Programmacoördinator

Wageningen University & Research

1. Inleiding

De paardenkastanjabomen *Aesculus hippocastanum* in Nederland worden bedreigd door de bloedingsziekte, veroorzaakt door de bacterie *Pseudomonas syringae* pv 'aesculi'. Vele beeld- en sfeerbepalende kastanjabomen zijn al verdwenen uit stadsgezichten.

In 2005 is voor de toen nog onbekende bloedingsziekte in paardenkastanje-bomen een onderzoeksprogramma gestart. Het doel van het programma was het opsporen van de oorzaak van de ziekte en het vaststellen van de ernst en omvang van de ziekte in Nederland. De veroorzaker (Psa) werd al snel gevonden en het bleek dat de ziekte in heel Nederland aanwezig was en ook in omliggende landen. Verder werd duidelijk dat vrijwel alle paardenkastanjesoorten kunnen worden aangetast, maar dat er grote verschillen zitten in gevoeligheid voor de ziekte. Geconcludeerd werd dat er mogelijk een resistentiefactor aanwezig is.

Om het onderzoeksprogramma te coördineren is toen de werkgroep Aesculaap opgericht, een samenwerkingsverband van onderzoekers, gemeenten en boomspecialisten. Gemeente Den Haag heeft een vooraanstaande rol gespeeld bij de oprichting en ook bij het functioneren van Aesculaap. De werkgroep is nadat het onderzoeksprogramma in 2009 werd afgesloten niet meer actief naar buiten getreden. Vanaf 2005 tot en met heden is de gemeente Den Haag wel actief gebleven in het volgen van het verloop van de kastanjeziekte. Elk jaar worden alle kastanjabomen in de gemeente Den Haag beoordeeld op de mate van aantasting door de kastanjeziekte. De ziekte blijft zich uitbreiden en de verwachting is dat uiteindelijk een fractie van de paardenkastanjabomen in Den Haag ontsnapt aan de bloedingsziekte.

Enkele feiten:

- anno september 2017 was 68% van alle paardenkastanjabomen van de gemeente Den Haag in meer of mindere mate aangetast door de bloedingsziekte
 - tien op de honderd paardenkastanjabomen (10%) in Den Haag zijn ernstig ziek.
- Dit is een forse toename vergeleken met voorgaande jaren

Het gevolg is dat in de komende jaren rekening moet worden gehouden met voortijdige kap van ernstig aangetaste en onveilige kastanjabomen.

In de afgelopen 10 jaar zijn weer nieuwe inzichten gekomen over het aanpakken van de ziekte en om gezonde kastanjabomen voor de toekomst te kweken. De werkgroep Aesculaap wordt daarom weer geactiveerd om de kastanjeziekte weer onder de aandacht te krijgen en om oplossingen te vinden om de bloedingsziekte te voorkomen en om te werken aan het behoud van de paardenkastanjabomen in Den Haag en in Nederland.

In het hier gepresenteerde plan van aanpak wordt beschreven welke mogelijke onderzoeksrichtingen er zijn. De aanpak is verdeeld in 2 fasen. In fase 1 wordt een verkenning uitgevoerd naar de mogelijke uitkomsten van de verschillende onderzoeksrichtingen en bijbehorende kosten. Na afstemming met de opdrachtgever/ stuurgroep wordt dan in fase 2 het onderzoeksprogramma uitgevoerd.

2 Plan van aanpak

2.1 Fase 1

Dit plan van aanpak bestaat uit 2 fasen. Fase 1 is het verkennen van de hieronder aangegeven onderzoeksrichtingen voor een succesvolle praktijktoepassing met als doel: gezonde kastanjabomen in de stedelijke omgeving. Fase 1 duurt 3 maanden. In fase 1 worden 2 bijeenkomsten belegd met de te vormen stuurgroep. In de eerste bijeenkomst (medio september 2018) worden de verschillende onderzoeksrichtingen voorgelegd en besproken met de opdrachtgever/ stuurgroep. Als uitkomst van deze bijeenkomst wordt bepaald welke onderzoeksrichtingen verder moeten worden uitgewerkt tot een onderzoeksvoorstel. De onderzoeksvoorstellen worden vervolgens in een tweede stuurgroepbijeenkomst (medio november 2018) voorgelegd. Naast een inhoudelijk uitleg worden ook de te verwachte uitkomsten en de bijbehorende kosten gepresenteerd. De stuurgroep bepaalt dan welke onderzoeksrichtingen worden opgenomen in fase 2, waarmee het definitieve onderzoeksprogramma van start kan gaan.

2.2 Fase 2

Fase 2 start in januari 2019. Voor elke gekozen onderzoeksrichting wordt een projectleider aangesteld. Te voorzien is dat na 2 jaar niet alle onderzoeksvragen zijn beantwoord. Zo is voor het kweken van gezonde bomen meer tijd nodig. Dit onderzoeksprogramma kent na 2 jaar een go/ no go moment om dan te bepalen welke onderdelen continuering van onderzoek behoeven. Als financieringsbron komt dan wellicht het Oogstfonds i.o. in zicht. Tevens worden andere financieringsbronnen verkend.

Dit project kent 2 onderzoekslijnen:

1. selectie en kweken van voor de bloedingsziekte ongevoelige paardenkastanjes.
Dit is per definitie langjarig onderzoek
2. het zoeken naar middelen en methoden om monumentale en anderszins waardevolle paardenkastanjabomen in Den Haag te behouden. Dit onderzoek kan na 2 – 4 jaar zijn eerste vruchten afwerpen.

De onderzoekslijnen worden op hoofdlijnen hieronder omschreven. Het uitwerken van de onderzoekslijnen zal gebeuren in fase 1 na de eerste bijeenkomst van de stuurgroep medio september 2018. Als uitkomst van fase 1 wordt een onderzoeksvoorstel gemaakt, waarin de onderzoeksonderwerpen in detail worden beschreven, met de te verwachten uitkomsten, tijdspad en financiën. Het complete onderzoeksvoorstel zal dan medio november 2018 worden voorgelegd aan de opdrachtgever/ stuurgroep. Op basis van het beschikbare budget zal een keuze gemaakt moeten worden uit onderstaande methoden en technieken.

2.3 Te verkennen methoden en technieken voor fase 2:

2.3.1 Genenbank Aesculus

In de praktijk zijn er kastanjabomen die schijnbaar niet aangetast worden door *Psa*. Ze staan in een omgeving waar andere kastanjabomen ziek zijn en waar dus een grote ziektedruk heerst. Toch worden ze niet ziek. Deze individuele bomen zijn mogelijk ongevoelig voor de *Psa*-bacterie. Hun genenpakket is zodanig samengesteld dat de bacterie geen vat op ze krijgt. Van deze ongevoelige kastanjabomen wordt materiaal verzameld, bv. stekken, die worden opgekweekt op een perceel waar ze gedurende meerdere jaren kunnen worden gevolgd.

Daarnaast is het bekend dat enkele *Aesculus*-soorten niet of weinig worden aangetast door *Psa*. o.a. *Aesculus flava*, *A. pavia*. Deze soorten kunnen worden gebruikt om kruisingen uit te voeren met andere ongevoelige soorten. Op het perceel wordt een groot sortiment *Aesculus*-soorten opgeplant. Het proefveld wordt gebruikt als genenbank voor het *Aesculus*-sortiment.

2.3.2 Moleculaire technieken

Traditioneel is het vinden van niet gevoelige boomsoorten een langdurige kwestie. In onderzoek naar een andere ernstige boomziekte, essentaksterfte, wordt gebruik gemaakt van transcriptomie, een DNA-techniek waarmee men versneld mogelijk resistente/ minder gevoelige soorten kan opsporen. Naast transcriptomie zijn er nog meer moleculaire-technieken die kunnen helpen in het versneld zoeken naar minder gevoelige soorten. Het is niet duidelijk of dit ook voor kastanje gaat werken. Er moet verder onderzocht worden wat de mogelijkheden zijn op succes bij paardenkastanje. De onderzoeksgroep Plant Breeding en Vegetatie, Bos- en Landschapsecologie van WUR zijn hierin gespecialiseerd. Bij de NAKT is ook specifieke expertise aanwezig op dit gebied.

2.3.3 Toetssysteem WUR

Het opzetten van een toetssysteem is de basis voor wetenschappelijk onderzoek. Met een toetssysteem kan de bloedingsziekte op reproduceerbare wijze worden opgewekt. Daarnaast kan met behulp van een toetssysteem de effectiviteit van middelen en methoden tegen de bloedingsziekte zorgvuldig worden bestudeerd onder geconditioneerde omstandigheden. Voor het toetssysteem worden jonge *Aesculus*-planten gebruikt die in containers worden gekweekt. Hiervoor wordt een containerveld en een kas van de WUR gebruikt voor het verkrijgen van de juiste proefcondities. In het eerste *Aesculaap*-onderzoek is een protocol ontwikkeld voor het toetsen van de gevoeligheid van *Aesculus* voor *Psa*. Een belangrijke component in het protocol is het verzamelen van een collectie van virulente *Psa*-isolaten, zowel van 'verse' isolaten uit zieke bomen als het verzamelen van isolaten uit bestaande collecties (bv. NVWA, en collecties uit buurlanden).

2.3.4 Bestrijding van de ziekteverwekker Ps

In onderzoek is aangetoond dat de Ps-bacterie te maken heeft met de bloedingsziekte. Dit is wetenschappelijk aangetoond door de bevestiging van de zgn. postulaten van Koch.

2.3.4.1 Biocontrol agents (BCA's), het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen van biologische oorsprong

In het EU-project DROPSA dat eind 2017 is geëindigd is onderzoek gedaan naar o.a. beheersing en bestrijding van bacterie kanker in het houtige gewas kiwi, veroorzaakt door de bacterie *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Deze bacterie vormt een serieuze bedreiging voor de productie van kiwifruit over de hele wereld en is nauw verwant aan de Ps-bacterie in paardenkastanje. Uit dit kiwi-onderzoek is een aantal interessante biocontrol agents naar voren gekomen die mogelijk ook een bestrijdende werking hebben tegen Ps in paardenkastanje.

2.3.4.2 Een andere potentiële bestrijder van Ps zijn bacteriofagen

Een bacteriofaag is een klein virus dat alleen een specifieke bacterie infecteert. Bij de onderzoeksgroep Biointeracties en Plantgezondheid van WUR heeft men ervaring met het werken met bacteriofagen ter voorkoming van plantenziekten veroorzaakt door bacteriën. Bacteriofagen zijn veelbelovend maar nog weinig onderzocht in Nederland.

2.3.4.3 Nieuwe methoden in onderzoek

Recent is door de WUR een nieuw onderzoek gestart dat ook nuttig kan zijn voor het hier beschreven onderzoek: microbiom-onderzoek.

Veel planten- en boomsoorten zijn gevoelig voor insectenplagen en infecties veroorzaakt door bacteriën, schimmels, en virussen. Sommige 'eigen' micro-organismen van de plant die in en op de plant leven – het zogenaamde microbiom – kunnen de plant echter helpen zich te weren tegen deze belagers.

In het nieuwe WUR-onderzoek wordt fundamentele kennis verzameld over de mogelijkheden het microbiom zodanig aan te passen dat de weerbaarheid van de plant verder wordt vergroot. Zodra er praktische toepassingen zijn of als we het systeem kunnen toetsen kunnen we dat meenemen in het kastanjeonderzoek.

2.3.5 City Tree Lab Den Haag

Middelen en methoden die perspectiefvol zijn gebleken in het toetssysteem worden getest onder praktijkomstandigheden, in een City Tree Lab. De werking van zowel bestaande als nieuwe behandelmethoden worden volgens wetenschappelijke normen onderzocht in een City Tree Lab van paarden-kastanjabomen op een locatie in Den Haag die nog nader moet worden bepaald. Samen met andere partijen worden behandelmethoden voor kastanjabloedings-ziekte getest om zo tot de best mogelijke oplossing te komen en om te zoeken naar handvatten voor beheerders. Marktpartijen kunnen zich aanmelden om hun methode onder gestandaardiseerde proefcondities te laten testen.

3 Communicatie en programmacoördinatie

De coördinator zorgt ervoor dat het plan van aanpak wordt omgezet in een onderzoeksprogramma. Hiertoe worden projectleiders gezocht voor de verschillende onderdelen van het plan van aanpak. In overleg met alle betrokkenen van dit programma stelt de coördinator het onderzoeksprogramma samen. Gedurende de uitvoering van het onderzoek zorgt de coördinator voor continue afstemming van de diverse onderwerpen binnen het onderzoeksprogramma door het organiseren van projectbijeenkomsten waarin de vorderingen van het onderzoek worden besproken. De resultaten worden samengevat en zowel schriftelijk als mondeling gecommuniceerd naar de stuurgroep. Zo nodig kan het programma worden bijgesteld. De coördinator is woordvoerder van het programma en bewaakt de voortgang van het programma binnen tijd en budget. Den Haag is de initiatiefnemer naar het vinden van de toekomstbestendige paardenkastanje als stadsboom. De communicatie verloopt daarom primair via communicatiebureau van Den Haag.

Het is belangrijk dat de resultaten van het onderzoek op een juiste manier worden geïnterpreteerd en eenduidig worden gecommuniceerd. De programmaleider onderhoudt daarom intensieve contacten met de communicatieadviseur van gemeente Den Haag.

De onderzoekresultaten worden naar gecommuniceerd naar een breed publiek o.a. via lezingen, publicatie in bomennieuws Den Haag, in vakbladen en in wetenschappelijke tijdschriften. Tevens wordt de website kastanjeziekte.wur.nl geactiveerd waar actuele ontwikkelingen en onderzoeksresultaten zijn te vinden inclusief achtergrondinformatie. Dit onderdeel leent zich ook goed voor het betrekken van de bevolking bij de bloedingsziekte in paardenkastanje, vergelijkbaar als met de essentaksterfte gebeurt, zie website van [Nature Today](http://NatureToday).

4 Raming tijd en kosten

De begroting van het hier gepresenteerde plan van aanpak "Toekomst voor de paardenkastanje" bedraagt 250k€, waarbij de kosten voor fase 1 14k€ bedragen.

Dit project kent in fase 2 de volgende 2 onderzoekslijnen:

1. het vinden en kweken van voor de bloedingsziekte ongevoelige paardenkastanjes. Dit kost de nodige jaren voordat de gezonde paardenkastanjabomen in het straatbeeld verschijnen.
2. het zoeken naar middelen en methoden om monumentale en anderszins waardevolle paardenkastanjabomen in Den Haag te behouden. Dit onderzoek kan na 2 jaar zijn eerste vruchten afwerpen. Aesculaap is op de hoogte van al het kastanje-onderzoek dat in Nederland en internationaal gebeurt.

De precieze invulling van fase 2 wordt bepaald aan de hand van de resultaten van fase 1, waarbij alle bovengenoemde middelen en methoden nader worden verkend en op basis van verwachte resultaten en benodigde kosten samen met de stuurgroep wordt besloten tot een andere invulling van fase 2.

Het onderzoek dient uit te monden in een bestrijdings- of beheersadvies voor de bloedingsziekte in kastanjabomen en op langere termijn naar een gezond kastanjebestand.

Schematisch overzicht van de startmaand en de duur van de verschillende onderzoeksfasen.

Fase 1 met als doel te komen tot een onderzoeksprogramma *Toekomst voor de kastanje*.

Fase 1 2018		sep	okt	nov	dec	Kosten In k€
Onderwerp						
Verkenning van onderzoeksrichtingen		xxx	xxx	xxx		8
Opstellen van onderzoeksvoorstellen voor fase 2					xxx	4
Communicatie en coördinatie		xxx	xxx	xxx	xxx	2
subtotaal in k€						14

Invulling fase 2 nader te bepalen.

5 Organisatiestructuur

Stuurgroep/
opdrachtgever:

is eigenaar van dit programma, is verantwoordelijk voor het programma binnen de omschreven doelstellingen, geld en tijd.

De samenstelling van de stuurgroep gebeurt in overleg met de opdrachtgever.

Programma coördinator:

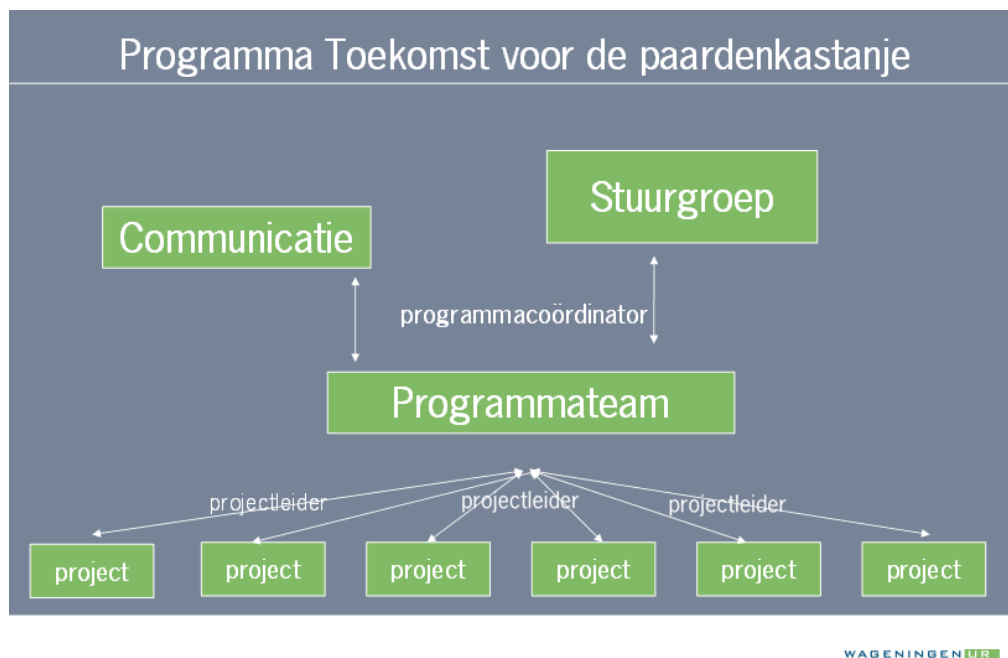
is verantwoordelijk voor het opstellen van het programmaplan, draagt zorg voor de bewaking van samenhang tussen de verschillende programmaonderdelen, onderzoeksteam en communicatie.

Projectleider:

is verantwoordelijk voor het opstellen van een projectplan (elk programmaonderdeel heeft een eigen projectleider)

Communicatie:

communicatiebureau van Den Haag verzorgt de externe communicatie, het naar buiten brengen van de resultaten van het onderzoeksprogramma. Dit gebeurt in samenwerking met de programma coördinator.



Bijlage 2 Leden stuurgroep

Aletta de Ruiter

Jorn Copijn

Ronnie Nijboer

Jaap Smit

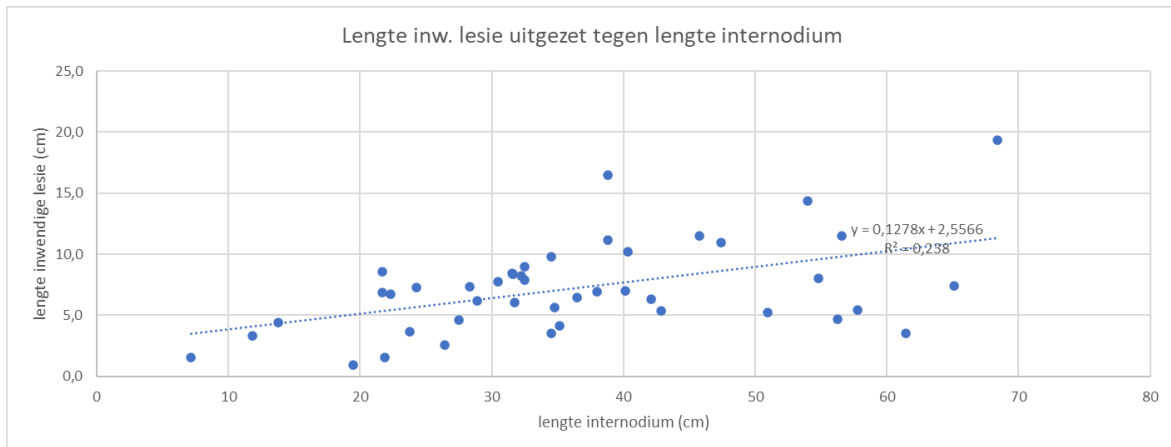
Bas Steenks

Bijlage 3 Samenvatting meetgegevens

Soort	Naam	# bomen in proef	# Pae inoculaties	# controles	Gemiddelde diameter basis internodium	Gemiddelde lengte internodium	# bruikbare lesies*	Lengte lesie uitwendig	Lengte lesie inwendig
Aesculus hippocastanum	'Umbraculifera'	15	12	3	13,9	30	10	6,6	7,4
Aesculus hippocastanum	'Baumannii'	14	11	3	18,6	51	10	9,0	14,4
Aesculus hippocastanum	'Lichtenvoorde'	15	12	3	13,4	30	7	6,7	6,2
Aesculus hippocastanum	Den Haag Gagelpad	13	15	3	14,5	31	15	7,5	8,2
Aesculus hippocastanum	nr. 13954	15	12	3	17,2	23	9	7,0	7,3
Aesculus hippocastanum	nr. 526737	15	12	3	18,3	37	12	15,7	16,5
Aesculus hippocastanum	nr. 544513	15	12	3	16,9	33	8	9,6	8,4
Aesculus hippocastanum	nr. 56 81 187	15	12	3	16,5	25	12	4,2	2,6
Aesculus hippocastanum	nr. 61697	15	12	3	15,6	25	12	6,1	6,8
Aesculus hippocastanum	OVO 1	15	12	3	18,4	44	12	8,0	7,0
Aesculus hippocastanum	OVO 2	15	14	3	15,9	27	14	4,6	4,6
Aesculus hippocastanum	OVO 3	15	12	3	17,8	40	11	7,2	6,4
Aesculus hippocastanum	OVO 4	15	12	3	17,0	25	12	8,2	8,6
Aesculus hippocastanum	OVO 5	15	12	3	16,3	24	12	6,1	6,9
Aesculus hippocastanum	selectie 1e Spuyweg	11	12	3	16,5	41	11	5,0	5,4
Aesculus hippocastanum	selectie 4e Spuyweg	10	15	3	16,7	40	10	11,0	11,2
Aesculus hippocastanum	selectie in zand.	15	12	3	16,6	31	10	8,1	8,3
Aesculus hippocastanum	selectie Zwolle	15	12	3	15,9	41	12	9,6	10,2
Aesculus hippocastanum	Voorburg Eilandje	10	14	3	15,5	37	11	6,2	7,0
Aesculus hippocastanum	zetstammen	15	12	3	21,5	45	10	13,0	11,5
Aesculus bushii		4	5	3	11,3	45	4	5,6	10,9
Aesculus californica		2	3	3	7,5	7	3	1,2	1,6
Aesculus carnea	'Briotii'	9	19	3	13,9	48	15	9,2	11,0
Aesculus carnea	'Theo Janson'	15	12	3	18,0	69	12	17,4	19,3
Aesculus chinensis		12	12	3			(1)		
Aesculus flava		15	12	3	17,6	56	12	6,6	5,4
Aesculus flava	Vestita'	15	12	3	13,4	59	10	5,3	3,5
Aesculus glabra	'Autumn Blaze'	3	4	3	13,3	30	3	4,2	3,5
Aesculus indica	'Sydney Pearce'	3	3	3			(2)		
Aesculus mississippiensis		9	12	2	11,7	25	12	4,1	3,7
Aesculus mutabilis	'Induta'	15	12	3	8,5	15	5	3,6	4,4
Aesculus neglecta		9	14	3	10,5	21	12	2,0	1,6
Aesculus neglecta	'Georgiana'	6	12	6	10,8	29	8	6,0	5,7
Aesculus parviflora		15	12	3	9,4	20	12	1,6	1,0
Aesculus pavia		15	12	3	16,9	64	11	6,6	7,4
Aesculus pavia	'Koehnei'	15	12	3	8,7	13	7	3,5	3,3
Aesculus turbinata		15	12	3	20,8	54	10	8,4	8,0
Aesculus sylvatica		4	9	3	10,6	35	9	5,1	4,1
Aesculus hippocastanum	veenhuizen 108	4	6	3	16,4	33	4	5,0	7,9
Aesculus indica		15	12	3	17,5	53	10	6,3	5,2
Aesculus hippocastanum	veenhuizen 85	3	4	3	20,9	35	4	6,3	6,1
Aesculus hippocastanum	veenhuizen 18	3	4	3	17,3	37	4	6,4	6,5
Aesculus hippocastanum	veenhuizen 120	4	9	3	15,6	30	6	8,3	9,0
Aesculus hippocastanum	veenhuizen 62	3	7	3			(0)		
Aesculus hippocastanum	veenhuizen 130	3	7	3			(1)		
Aesculus hippocastanum	veenhuizen 41	2	3	3	18,3	32	3	9,1	9,8
Aesculus hippocastanum	veenhuizen 71	4	10	3	18,8	57	7	10,6	11,5
Aesculus hippocastanum	Voorburg opgaand	9	13	3	17,8	33	8	7,4	7,8
		514	513	146			415		

* Getallen tussen () niet meegenomen in analyse

Bijlage 4 Laesielengte in relatie tot lengte en diameter van de geïnoculeerde scheuten



To explore
the potential
of nature to
improve the
quality of life



Wageningen University & Research
Correspondentie adres voor dit rapport:
P.O. Box 16
6700 AA Wageningen
T +31 (0)317 48 07 00
www.wur.nl/plant-research
Wageningen, Januari 2023
VERTROUWELIJK Rapport WPR-OT 1022

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 7.200 medewerkers (6.400 fte) en 13.200 studenten en ruim 150.000 Leven Lang Leren-deelnemers behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak
