Onderzoek toont grote verschillen in gevoeligheid voor kastanjebloedingsziekte

AUTEURS: HANS KALJEE EN JELLE HIEMSTRA

De voortdurende toename van kastanjebloedingsziekte was in 2018 aanleiding voor de start van een onderzoek door Wageningen Research dat zich richt op het vinden van paardenkastanjes die minder gevoelig zijn voor bloedingsziekte. Het blijkt dat het ontwikkelde inoculatieprotocol goed geschikt is om *Aesculus*-genotypen te toetsen op hun gevoeligheid voor kastanjebloedingsziekte. De toetsing van ruim 500 planten van 48 *Aesculus*-genotypen laat zien dat er grote verschillen bestaan in gevoeligheid, zowel tussen soorten als binnen soorten.

Binnen het onderzoek is een zo groot mogelijk sortiment *Aesculus*-genotypen onderzocht

Pierre van der Wielen van Groenadvies Amsterdam riep precies twintig jaar geleden in de toenmalige KPB Nieuwsbrief ('Mysterieuze ziekte in paardenkastanjes', jaargang 6, nummer 17, 2003) op om opvallende verschijnselen bij paardenkastanjes te melden. De aanleiding hiervoor was dat in de gemeente Haarlemmermeer en in enkele andere gemeenten in Noord-Holland verschijnselen van een onbekende aantasting waren te zien die hij als volgt in de KPB Nieuwbrief beschrijft: 'De bomen doorlopen enkele goed herkenbare stadia. In de eerste fase worden op de stam en takken oranjebruine plekken zichtbaar waaruit vaak puntsgewijs donker slijm naar buiten treedt. Bij het aansnijden blijkt het cambium onder en rond deze plekken bruin verkleurd met een grillige donkerbruine tot zwarte tekening. In een volgend stadium drogen de vlekken op de bast in tot ruwe, zwarte korsten. De bast droogt dan snel verder in en barst open in lange scheuren. In een vergevorderd stadium sterven takdelen af. In enkele gevallen zijn bomen geheel dood.'

Na deze oproep werd in 2004 duidelijk dat paardenkastanjes in heel het land ziek werden. Op initiatief van Koningin Beatrix en de wethouders van de G4-gemeenten werd de werkgroep Aesculaap opgericht die opdracht gaf tot een grootschalig landelijk onderzoek. Uit het in de periode 2004-2008 uitgevoerde onderzoek kwam naar voren dat de aantasting wordt veroorzaakt door een bacterie (*Pseudomonas syringae*) die epifytisch aanwezig is op kastanjebomen en via wondjes en beschadigingen de boom kan infecteren. Het onderzoek bracht bovendien sterke aanwijzingen aan het licht 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 toetsingsmethode was het echter niet mogelijk om de verschillen tussen soorten en selecties effectief te onderzoeken. >

In de eerste fase worden op de stam en takken oranjebruine plekken zichtbaar met donker slijm

Nieuw onderzoek vanuit de WUR

De voortdurende toename van de problemen met kastanjebloedingsziekte was in 2018 aanleiding voor de start van een onderzoek dat zich richtte op het vinden van paardenkastanjes die minder gevoelig zijn voor bloedingsziekte. Hierbij zijn door middel van kunstmatige infectie ruim 500 paardenkastanjes met heel verschillende genetische achtergrond getest. Hieronder volgt een samenvatting van het onderzoek.

Het hele onderzoek, inclusief een uiteenzetting van de zoektocht naar een betrouwbare toetsingsmethode, is te lezen in het eindrapport *Toekomst voor de paardenkastanje* door J.A. Hiemstra, M. Wenneker en B.J. van der Sluis van de Wageningen University & Research (WUR) en is gratis te downloaden op https://doi.org/10.18174/632630. Het onderzoek is in opdracht van de Stichting Oogstfonds en op initiatief van de Gemeente Den haag, uitgevoerd door Stichting Wageningen Research (WR), Business Unit Open Teelten.

Onderzoek door kunstmatige infectie

Toen Van der Wielen twintig jaar geleden de noodklok luidde, bestond er nog geen toetsingsmethode om de verschillen tussen soorten en selecties van paardenkastanjes effectief te onderzoeken. Inmiddels zijn de onderzoekstechnieken sterk verbeterd en is een toetsingsprotocol ontwikkeld gebaseerd op het kunstmatig infecteren (inoculeren) van jonge boompjes door middel van het aansnijden van een scheut en het in de wond aanbrengen van een druppel met een suspensie van cellen van de ziekteverwekker, de bacterie *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*.
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.

Collectie paardenkastanjes

Binnen het onderzoek is een zo groot mogelijk sortiment *Aesculus*-genotypen onderzocht. De soorten zijn gewoonlijk vermeerderd uit zaad, de cultivars via enten op zaailing onderstammen.
Deze collectie is verder aangevuld met bomen gekweekt uit materiaal van mogelijk minder gevoelige *Aesculus hippocastanum*-individuen. Daarvoor zijn individuen geselecteerd die opvallend gezond bleven in een omgeving met veel door kastanjebloedingsziekte aangetaste bomen. Hiervan is entmateriaal verzameld en vermeerderd door middel van enten op zaailing-onderstammen.

Dit materiaal werd in de periode 2019-2021 op het containerveld in Randwijk doorgekweekt tot aan de inoculatie in november 2021. Daarbij werd gestreefd naar de opbouw van een collectie van minimaal 15 boompjes per genotype. Eind 2021 was een verzameling van circa 800 planten van 48 genotypen (16 soorten, 11 cultivars en 25 nieuwe selecties) opgebouwd. 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, ofwel planten gekweekt uit zaailingen en daarmee genetisch niet geheel identiek.

< Afbeelding 1 en 2. Proefveld in Randwijk met (deel van) *Aesculus*-collectie in april (boven) en juli 2020.

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

Tabel 1. Voor toetsing opgebouwde collectie.

Wijze van toetsing

Voor de toetsing is een speciaal protocol (zie hoofdstuk 3 van het onderzoeksrapport) ontwikkeld dat uitgaat 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. Het streven daarbij was om minimaal 15 scheuten (10 om te inoculeren en 5 controles) per genotype te gebruiken. De inoculatie is uitgevoerd in november 2021.

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 controlebehandeling bestond uit het aanbrengen van een druppel steriele PBS-buffer in de wond. Voor de inoculatie is een bacteriesuspensie gebruikt bestaande uit een mix van twee *Pseudomonas syringae* pv. *Aesculi-stammen*. Alle wonden werden om uitdroging te voorkomen na inoculatie afgedekt met parafilm, dat na twee weken weer werd verwijderd.

De eindbeoordeling is uitgevoerd in de eerste week van augustus 2022, ruim acht maanden na inoculatie. Daarbij werden aan alle behandelde bomen de volgende metingen verricht:

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

< Uitvoering inoculatie:
Afbeelding 3: aansnijden.
Afbeelding 4: aanbrengen inoculum.
Afbeelding 5: omwikkelen met parafilm.
Afbeelding 6: aanbrengen van elastiek.

Afbeelding 7. Waarnemingen: knippen geïnoculeerde scheut op veld.
Afbeelding 8. Takken op labtafel.
Afbeelding 9. Takken na verwijderen blad ten behoeve van meten laesie-lengtes.
Afbeelding 10. Beperkte verkleuring rond inoculatiewond in controleplant.
Afbeelding 11. Uitgebreide laesie in geïnoculeerde plant.

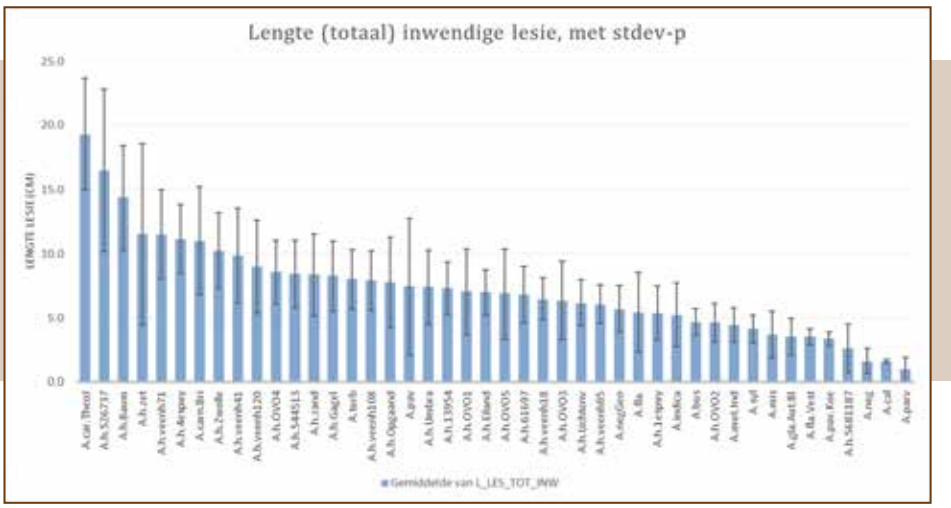
Resultaten en discussie

In totaal werden in augustus 2021 659 inoculaties (inclusief controlebehandelingen) uitgevoerd op in totaal 514 planten van 48 genotypen. Gedurende het groeiseizoen van 2022 zijn enkele planten om onbekende reden afgestorven en is bij een aantal andere planten de top afgebroken of boven de inoculatieplek afgestorven. Hierdoor waren er bij de beoordeling in augustus 2022 nog 415 bruikbare geïnoculeerde scheuten en 146 controlescheuten over.

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 beperkt lijkt te zijn 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 de lengte 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.
Al bij het verzamelen van de meetgegevens bleek dat de laesies in de controleplanten (behandeld met een oplossing zonder bacteria) veel kleiner zijn dan in geïnoculeerde planten (behandeld met oplossing met bacteria). In de controleplanten 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.
De gemeten laesielengtes varieerden sterk. Daarbij was er enerzijds vaak sprake van veel variatie binnen een genotype en anderzijds van grote verschillen tussen de gemiddelde laesielengtes van de verschillende genotypen.

Door de grote standaarddeviatie van die gemiddelden is het lastig om de individuele genotypen onderling te vergelijken. Als de genotypen worden gerangschikt volgens aflopende laesielengte zoals in Figuur 1, 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 kastanjebloedingsziekte zijn dan die met veel grotere laesies.

Een aantal minder bekende soorten blijkt duidelijk minder gevoelig



Figuur 1. Gemiddelde totale lengte (met standaarddeviatie) van de inwendige laesies voor alle geteste genotypen.

Conclusie

Het in dit project ontwikkelde inoculatieprotocol blijkt een effectieve wijze om jonge kastanjebomen (*Aesculus sp.*) kunstmatig te infecteren met de veroorzaker van de kastanjebloedingsziekte, *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. De lengte van de laesies die na inoculatie ontstaan blijkt niet beïnvloed te worden door de lengte of diameter van de geïnoculeerde scheut. De gemeten laesielengtes kunnen daarom gezien worden als een maat voor de 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 kastanjebloedingsziekte. Zowel op soortniveau (dus tussen soorten onderling) als binnen soorten (tussen cultivars of selecties van één soort) worden 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 OVO_2) vertoonden significant minder symptomen dan de groep met de meeste symptomen (volgende bullet).
- Daarentegen was er ook een groep met significant sterkere 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.

Kortom, de toetsing van 500 planten van 48 *Aesculus*-genotypen laat 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*) blijkt 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.

Om deze perspectieven ook daadwerkelijk te verzilveren zou een vervolg op dit project gericht moeten zijn op twee dingen: 1. Herhaalde toetsing van de betere genotypen uit het bovenbeschreven onderzoek om zekerheid te verkrijgen dat de verschillen ook consistent zijn. 2. Opsporen en vermeerderen van meer tot nog toe niet aangetaste exemplaren van de zeer gevoelige *A. hippocastanum* (en eventueel ook van *A. carnea*), om te komen tot minder gevoelige vervangers voor de zeer gevoelige 'Baumannii' en 'Briotii'. ■