

DNA-ANALYSES ESSENTAKSTERFTE MONSTERS

PROVINCIE GRONINGEN

BTL Bomendienst

Rapport : Arnold Meulenbelt
Gezien : Ron Schraven

Telefoonnummer : 055-5999 445
Faxnummer : 055-5338 844
E-mail : arnold.meulenbelt@btl.nl
Internet : www.bomendienst.nl

Datum Versie 1 : oktober 2016
Kenmerk : 16.0235/AM
Datum Versie 2 : januari 2017
Kenmerk : 16.0235-2/AM



BTL

Bomendienst

Copyright 2017 BTL Bomendienst B.V. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van BTL Bomendienst B.V. BTL Bomendienst B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schade ontstaan bij gebruik van gegevens uit dit rapport.

Inhoud

1	Inleiding	4
1.1	Aanleiding	4
1.2	Doelstelling	4
1.3	Afbakening	4
2	Werkwijze	5
2.1	Kaartanalyse	5
2.2	Monstername	5
2.3	DNA-analyse	5
3	Resultaten	6
4	Conclusie	7
Bijlage 1	Wat is essentaksterfte?	8
Bijlage 2	Complete resultaten	12

1 Inleiding

In opdracht van de Provincie Groningen zijn, verspreid over vijftien provinciale wegen, takmonsters verzameld en op essentaksterfte DNA geanalyseerd. Meer informatie over essentaksterfte (hierna ETS) zie **Bijlage 1**. De Provincie Groningen heeft langs de provinciale wegen ruim 8.000 essen in haar beheer.

1.1

AANLEIDING

Sinds 2007 worden de essen in Nederland bedreigd door een schimmelziekte, *Chalara fraxinea*, deze schimmel veroorzaakt taksterfte in es. De aanwezigheid van ETS in NL is in 2010 bevestigd. De Provincie Groningen heeft in 2016 voor de vierde keer al haar essen laten inspecteren op het voorkomen van taksterfte. Er zijn grote verschillen waargenomen in de mate van taksterfte tussen de verschillende locaties verspreid over de Provincie Groningen.

1.2

DOELSTELLING

Het doel van de DNA-analyse is; Bevestiging krijgen dat de waargenomen symptomen door ETS worden veroorzaakt.

1.3

AFBAKENING

De takmonsters zijn genomen op 26 en 27 september door Johnny van Vliet European Tree Worker bij Van Vliet boomverzorging en Arnold Meulenbelt, European Tree Technician bij BTL Bomendienst. De bemonsterde bomen staan verspreid door de gehele Provincie Groningen (zie **afbeelding 1**).

2 Werkwijze

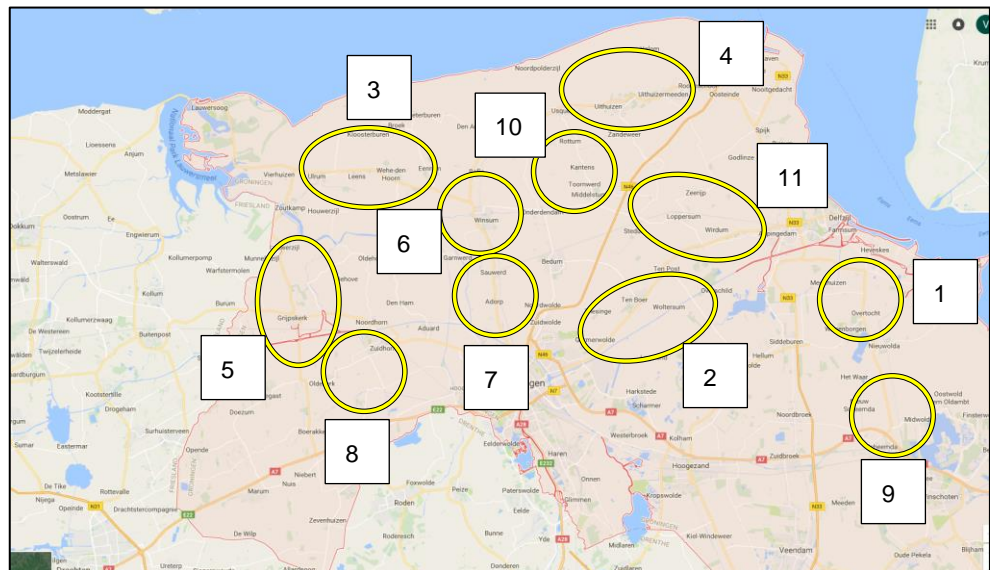
In het overleg van 5 april 2016 zijn de uitgangspunten en het doel vastgelegd. Bij dit overleg waren aanwezig; Johan Bok (Provincie Groningen), Erik Platje (Danphe BV), Johnny van Vliet (Van Vliet boomverzorging) en Arnold Meulenbelt (BTL Bomendienst).

2.1

KAARTANALYSE

In het overleg van 5 april 2016 zijn 11 locaties bepaald.

Afbeelding 1:
De 11 geselecteerde N-wegen voor bemonstering
(bron: Google.maps).



2.2

MONSTERNAME

Op bovenstaande 11 locaties zijn per locatie 7 bomen bemonsterd. Met behulp van een hoogwerker zijn de symptomen in de boomkronen beoordeeld en is een monster genomen waaruit visueel bleek dat ETS de veroorzaker is van de necrose. De verzamelde monsters hebben een label gekregen met nummer en locatie (N-weg). De monsters zijn continue gekoeld bewaard.

2.3

DNA-ANALYSE

De 77 verzamelde monsters zijn geanalyseerd met behulp van de "Loop mediated isothermal AMPlification (LAMP) assays" methode. LAMP assays zijn moleculaire toetsen waarbij DNA van het doelorganisme specifiek vermeerderd wordt. De monsters werden gedurende 30 minuten geïncubeerd bij 65 °C, waarna een smeltcurve van het geamplificeerde DNA werd bepaald.

3 Resultaten

De resultaten van de visuele opname en de DNA-analyse staan in bijlage 2 per boom uitgewerkt. Hieronder in **Tabel 1** staan de resultaten samengevat.

(De 1^e run van de N362 (met kenmerk GEN3-1060_0027.gen) had een positieve controle, een positieve controle komt voor als het controlemonster vervuild is bij aanmaken. Van alle monsters zijn meerdere analyses gedaan omwille van hoge kwaliteit borging)

Tabel 1: Samenvatting van de visuele en DNA resultaten.

Locatie (N-weg)	Aantal monsters	Visuele beoordeling	DNA-uitslag
N360	14	13 x positief	7 x positief
N361	14	13 x positief	8 x positief
N362	14	14 x positief	10 x positief
N388	14	13 x positief	5 x positief
N980	7	7 x positief	2 x positief
N996	14	14 x positief	6 x positief

Voor onderstaande tabel (**Tabel 2**) is gekeken naar het aantastingsjaar dat visueel is bepaald en de resultaten uit de DNA-analyse. Uit **Tabel 2** blijkt dat de kans op een positieve DNA-analyse af neemt wanneer een aantasting langer in de boom aanwezig is.

Tabel 2: Aantastingsjaar in relatie tot de DNA resultaten.

Visueel aantastingsjaar	Aantal keer aangetroffen	DNA resultaat	% positief
2012	2 x	0 x positief	0%
2013	10 x	6 x positief	60%
2014	24 x	10 x positief	42%
2015	25 x	14 x positief	56%
2016	14 x	9 x positief	64%

4 Conclusie

Een visuele bevestiging van ETS (met hoogwerker) is betrouwbaar. De DNA-analyse is hier een bevestiging van. Als ETS visueel is vastgesteld, en uit het DNA onderzoek komt een negatieve uitslag, dan betekent dat niet dat er geen ETS in de boom is aangetroffen maar dat in het betreffende monster geen DNA is gevonden. Het monster kan afkomstig zijn van een tak waar twijfel over bestond, en zegt dus alleen iets over die specifieke tak. Uit onderzoek blijkt dat DNA van *Chalara fraxinea* (ETS) snel wordt afgebroken door andere secundaire schimmels, het vraagt specifieke kennis en ervaring om goed materiaal te bemonsteren. Uit **Tabel 2** blijkt dat de kans op een positieve DNA-analyse af neemt wanneer een aantasting langer in de boom aanwezig is.

In **Tabel 1** staat de uitslag van de analyse samengevat. In **Bijlage 2** zijn de complete uitslagen opgenomen.

- Van de 77 verzamelde tak-, blad- en twijgmonsters zijn 74 monsters visueel positief beoordeeld op ETS.
- Van de 77 monsters zijn 38 monsters positief beoordeeld door DNA-analyse. Dit is 50% van de genomen monsters.

Bijlage 1 Wat is essentaksterfte?

Essentaksterfte (Januari 2016)

Tabel 1: Taxonomische indeling essentaksterfte

Rijk:	Fungi	Schimmels
Stam:	Ascomycetes	Zakjeszwammen
Klasse:	Leotiomycetes	Leotiomycetes
Orde:	Helotiales	Helotiales
Familie:	Helotiaceae	Helotiaceae
Ongeslachtelijke vorm:	<i>Chalara fraxinea</i>	Essentaksterfte
Geslachtelijke vorm:	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i> Synoniem: <i>H. pseudoalbidus</i>	Vals essenvlieskelkje

ETS is een schimmelinfectie/aantasting (zie **Tabel 1**) die in essen in geheel Europa taksterfte veroorzaakt. Door de verzwakking van de boom, en daarop volgende secundaire aantastingen, zijn in Midden- en Noord-Europa al grote bestanden grotendeels verdwenen. De eerste meldingen van de ziekte in Nederland kwamen in 2010 uit het noorden van ons land. Uit eigen waarnemingen en onderzoek kunnen we echter vaststellen dat ETS al in 2007 in Nederland aanwezig was en dat in 2010 niet alleen in het noorden van Nederland aantastingen te vinden waren. Het valse essenvlieskelkje is een obligate parasiet. Dit betekent dat het de levenscyclus niet kan voltooien zonder een geschikte gastheer, de es in dit geval. Het grootste deel van de levenscyclus kan de schimmel overbruggen op dood materiaal zoals de afgevallen bladstelen van de es. Een klein deel van de levenscyclus vindt plaats in het levende blad en bladsteel, wanneer dit nog aan de boom zit. De schimmelgroei die vervolgens plaatsvindt in de twijg van de boom is geen onderdeel van de levenscyclus van het valse essenvlieskelkje, de vruchtlichamen groeien immers op de bladsteel die op de grond is gevallen.

Symptomen

De infectie van de es door ETS is een onderdeel van de levenscyclus van de schimmel *Hymenoscyphus fraxineus*. De ontwikkeling van de infectie uit zich in vier visueel herkenbare fasen (zie **Foto 1, 2, 3** en **4** met beschrijving). Voor de herkenning is het van belang een duidelijk beeld te hebben van deze vier fasen.

In de winterperiode is het herkennen van de eerste en tweede fase lastig of zelfs visueel onmogelijk. Een diagnostisch onderzoek kan dan uitsluitel bieden. De ervaring die BTL Bomendienst daarmee heeft is goed. Bij verkeerde monsternamen is geen juiste analyse mogelijk. Dit komt doordat de in de boom aanwezige ongeslachtelijke fase (*Chalara fraxinea*) van de schimmel *H. fraxineus* vaak overgroeid is door andere aanwezige schimmels. Hierdoor worden de overige schimmels wel herkend, maar kan *C. fraxinea* niet worden vastgesteld door isolaties in het laboratorium. Juiste monsternamen is daarom zeer belangrijk. BTL Bomendienst maakt voor analyse gebruik van eigen DNA apparatuur.

Foto 1-4: De vier fasen van essentaksterfte



Fase 1



Fase 2



Fase 3



Fase 4

Fase 1. Sporen komen terecht op het blad. Na infectie van het blad via de sporen ontstaan op de bladsteel donkere (rode/bruine) vlekjes. Deze vlekjes zijn zeer goed herkenbaar op de groene bladsteel. Het blad krult aan de randen naar boven om.

Fase 2. Verwelking van het blad. Doordat de verwelking laat in de zomer plaatsvindt, wanneer niet geïnfecteerde bladeren nog fris groen zijn, is visuele herkenning van ETS goed mogelijk.

Fase 3. Sterfte van de éénjarige twijg met typische geel/oranje verkleuring van de aangetaste plek. Op de foto is zichtbaar dat onder de bast de verspreiding van de schimmel al verder is dan aan de buitenkant van de tak zichtbaar is.

Fase 4. Sterfte van de meerjarige tak met typische wigvormige necrose, eerst onder en vervolgens ook boven de takaanhechting.

Het verloop bij jonge essen is anders dan bij oudere bomen. Bij jonge essen sterft de gesteltak en meestal na een paar jaar ook de doorgaande spil (zie **Afbeelding 5**). Opvallend zijn de grote aantallen nieuwe uitlopers aan de basis van afgestorven gesteltakken. Bij oudere bomen is de afstand van de stam groter tot de oorspronkelijke aantasting en de stam wordt door ETS pas na vele jaren bereikt. Dit is de reden waarom ETS geen essensterfte meer genoemd wordt maar essentaksterfte. In bosverband is infectie via de stamvoet ook mogelijk, vaak is dit een combinatie van ETS (*Chalara*) en Honingzwam (*Armillaria ssp.*).

Voortplanting

Schimmels planten zich zowel geslachtelijk als ongeslachtelijk voort. De geslachtelijke voortplanting gebeurt door middel van sporen, de ongeslachtelijke voortplanting op vegetatieve wijze door schimmeldraden en zwamvlokken. Aangetoond is dat het geslachtelijke stadium (teleomorf) van de schimmel, *H. fraxineus* (vals essenvlieskelkje) betreft. Dit is voor Nederland een exoot en een "neefje" van het inheemse *H. albidus* (essenvlieskelkje), een wijdverspreide saprofyt (Kowalski en Holdenrieder, 2009b). *H. fraxineus* is de primaire veroorzaker van ETS.

Waardplanten en gevoeligheid

In nagenoeg alle *F. excelsior* soorten zijn aantastingen waargenomen. *F. excelsior* 'Altena' is mogelijk minder gevoelig voor ETS. Voor alle cultivars geldt dat de gevoeligheid (resistentie) nogal kan verschillen van soort tot soort maar ook tussen individuen binnen een soort. Er zijn soorten waar nog geen aantastingen van ETS zijn aangetroffen, bijvoorbeeld de *F. pennsylvanica*.

Er zijn twee onderzoeken naar resistentie uitgevoerd;

Een 1-jarig resistentie onderzoek door ir. J. Kopinga en ir. S.M.G. de Vries

Een 5-jarig resistentie onderzoek door Dr. H. Lösing

Uit de onderzoeken blijkt dat twee soorten zeer gevoelig zijn voor ETS, namelijk;

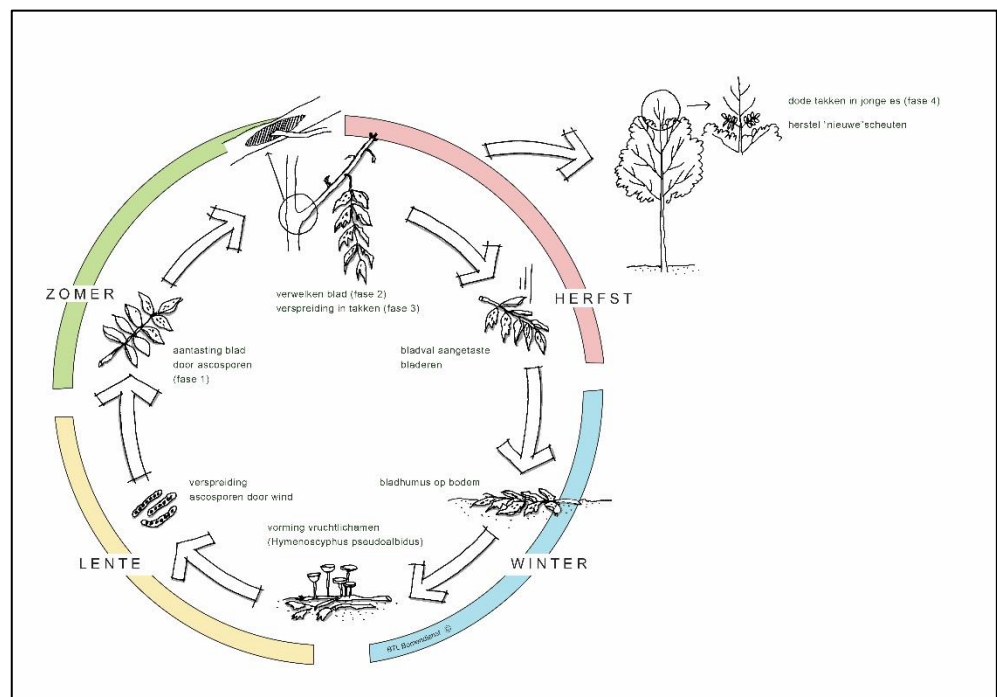
F. excelsior 'Jaspidea' en *F. excelsior* 'Pendula'.

Verspreiding

Deze schimmel behoort tot de zakjeszwammen. Hiervan is bekend dat de sporen zich eenvoudig over grote afstanden via de wind kunnen verplaatsen. De sporen van *H. fraxineus* worden door de wind gedragen en zijn verantwoordelijk voor de verspreiding van ETS.

De redenen achter de recente opkomst van ETS worden steeds duidelijker. Volgens onderzoekers kan dit worden toegeschreven aan veranderende omgevingscondities of het gedrag van de ziekteverwekker (Kowalski en Holdenrieder, 2009b). Recent onderzoek geeft aan dat in het verleden een eerste rapportage is gedaan in Japan van een schimmel waarvan nu blijkt dat dit *H. fraxineus* was. De schimmel was aangetroffen op *F. mandshurica*. Er is sprake van introductie van de schimmel in Europa via import begin jaren '90.

Afbeelding 5: De cyclus van aantasting door essentaksterfte



De verspreiding van ETS door de boom vindt plaats via schimmelgroei. De ongeslachtelijke vorm van ETS wordt *C. fraxinea* genoemd. *C. fraxinea* groeit door middel van schimmeldraden door het hout van de twijgen naar beneden. *C. fraxinea* koloniseert normaal gesproken één twijgjaar per jaar. Dit proces voltrekt zich in een periode van maximaal 3 á 4 jaar. Daarna stop de aantasting en loopt de boom opnieuw uit.

Bijlage 2 Complete resultaten