



Moleculaire identificatie en detectie van *Cylindrocladium buxicola*

Khanh Pham, Teresia Hollinger, Peter Vink & Fons van Kuik

e-mail: kxanh.pham@wur.nl

Introductie

Eind jaren negentig werd in Engeland ernstige bladval en taksterfte gemeld bij *Buxus sempervirens*. De laatste jaren treedt ook in Nederland grote schade bij kwekers van Buxus op. Kenmerkende symptomen zijn donkerbruine vlekken op de bladeren gevolgd door bladval en zwarte langgerekte vlekken op de stengels (Figuur 1). De schimmel *Cylindrocladium buxicola* bleek verantwoordelijk voor de aantasting. Visueel treedt vaak verwarring op met aantasting door de schimmel *Volutella buxi* waarbij roze sporenhoopjes ontstaan en die soms samen met *Cylindrocladium buxicola* voorkomt.

Een specifieke, gevoelige en snelle toets is gewenst om beide schimmels te kunnen onderscheiden en om bovendien in symptoomloos materiaal een betrouwbare diagnose te kunnen stellen.

Moleculaire identificatie

Buxusbladeren met en zonder symptomen uit een infectieproef werden gebruikt voor DNA isolatie en PCR detectie van *Cylindrocladium buxicola*. Bovendien werden enkele afgevallen bladeren meegenomen in de toetsen (Tabel 1). Detectieprimers werden gemaakt die gebaseerd zijn op de beschikbare ITS (C.buxiFor/ C.buxiRev) en β - Tubuline (C.bTubFor/ C.bTubRev) gensequenties. De specificiteit en gevoeligheid van de primers werden getest op beschikbaar praktijkmateriaal.

Resultaten & Discussie

De primers die op de ITS sequenties zijn gebaseerd bleken specifiek te zijn voor *Cylindrocladium buxicola*. Geen kruisreactie werd gevonden met een groot aantal plantpathogene schimmels (resultaten niet getoond). De primers op basis van het β - Tubuline gen bleken ook specifiek voor *Cylindrocladium buxicola*. De gevoeligheid van deze test was echter lager (Tabel 1).

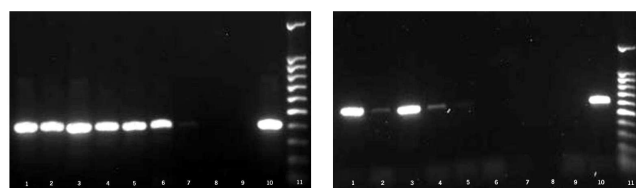
De PCR toets is zo gevoelig dat *Cylindrocladium buxicola* ook werd aangetoond in bladeren zonder symptomen (Tabel 1 + Figuur 2). De toets zal worden toegepast voor epidemiologisch onderzoek en voor diagnostische doeleinden.



Figuur 1. Symptomen veroorzaakt door *Cylindrocladium buxicola* op buxus.

Tabel 1. PCR-toetsresultaten van twee sets PCR-primers voor *Cylindrocladium buxicola* op diverse Buxus monsters die wel of geen symptomen lieten zien.

Nr.	Plant code	Symptoom	C.buxiF/C.buxiR	C.bTubF/C.bTubR
1	VC 2.1	Positief	++	++
2	VC 2.1	Negatief	++	+
3	VC 3.3	Positief	++	++
4	VC 3.3	Negatief	++	+
5	O 2.2	Negatief	++	-
6	O 2.2	Negatief	++	-
7	VC 1.2	(afgevallen blad)	+	-
8	VC 3.3	(afgevallen blad)	-	-



Figuur 2. PCR producten (409bp) geamplificeerd met primers C.buxiFor/C.buxiRev voor *Cylindrocladium buxicola* (Links) en PCR producten (623bp) geamplificeerd met primers C.bTubFor/C.bTubRev voor *Cylindrocladium buxicola* (Rechts). Laan 1-8: Bladmonsters 1-8 uit Tabel 1, Laan 9: water als negatieve controle, Laan 10: DNA van *Cylindrocladium buxicola* als positieve controle, Laan 11: Marker 100bp ladder.