

# Taksterfte in Buxus, veroorzaakt door *Cylindrocladium buxicola*

Fons van Kuik en Pieter van Dalfsen

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van  
Wageningen UR  
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit  
December 2010  
PPO nr. 32 340 558 00/PT nr. 12547

© 2010 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Alle intellectuele eigendomsrechten en auteursrechten op de inhoud van dit document behoren uitsluitend toe aan de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO). Elke openbaarmaking, reproductie, verspreiding en/of ongeoorloofd gebruik van de informatie beschreven in dit document is niet toegestaan zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

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

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

Projectnummer: 32 340 558 00  
PT nr. 12547

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

---

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

Adres : Prof. Van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse  
: Postbus 85, 2160 AB Lisse  
Tel. : 0252 – 46 21 21  
Fax : 0252 - 46 21 00  
E-mail : [infobomen.ppo@wur.nl](mailto:infobomen.ppo@wur.nl)  
Internet : [www.ppo.wur.nl](http://www.ppo.wur.nl)

# Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
VOORWOORD .....	9
1 INLEIDING .....	11
2 DOELSTELLINGEN .....	13
3 WERKWIJZE.....	15
4 RESULTATEN .....	17
4.1 Biologie van <i>Cylindrocladium buxicola</i> .....	17
4.1.1 Herkennen en schadebeeld.....	17
4.1.2 Levenswijze en verspreiding .....	18
4.1.3 Proef temperatuurgevoeligheid van 2 isolaten van <i>Cylindrocladium buxicola</i> .....	20
4.1.4 Waardplanten van <i>Cylindrocladium buxicola</i> .....	21
4.2 Middelenonderzoek.....	22
4.2.1 Screening middelen tegen taksterfte in Buxus, 2006 .....	22
4.2.2 Veldproeven middelen tegen taksterfte in Buxus, 2006.....	24
4.2.3 Middelenonderzoek tegen <i>Cylindrocladium buxicola</i> , in 2007. ....	28
4.2.4 Middelenonderzoek tegen <i>Cylindrocladium buxicola</i> , in 2008. ....	32
4.2.5 Middelenonderzoek tegen <i>Cylindrocladium buxicola</i> , in 2009. ....	34
4.2.6 Algemene conclusies middelenonderzoek .....	39
4.3 Ontsmetting van Buxusstek .....	41
4.3.1 Bepaling van voor de schimmel dodelijke temperatuur, labproef. ....	44
4.4 Moleculaire Detectie .....	46
4.4.1 Moleculaire identificatie en detectie van <i>Cylindrocladium buxicola</i> . ....	46
4.4.2 Detectie van <i>Cylindrocladium buxicola</i> uit praktijkmonsters. ....	51
4.5 Gevoeligheid van Buxus-sortiment voor <i>Cylindrocladium buxicola</i> . ....	55
4.6 Effect van bemesting op ziekteontwikkeling .....	59
5 SAMENVATTING EN AANBEVELINGEN .....	61
6 CONCLUSIES .....	65
7 LITERATUUR.....	67
BIJLAGE 1. AFBEELDINGEN VAN TAKSTERFTE IN BUXUS.....	69
BIJLAGE 2. OVERZICHTFOTO'S VAN BEMESTINGSPROEF 2008.....	73
BIJLAGE 3 DATA FROM CBS FUNGI DATABASE: CYLINDROCLADIUM BUXICOLA.....	75
BIJLAGE 4. BUXUSPOSTER.....	77



## Samenvatting

De laatste jaren wordt de Buxusteelt geplaagd door een ziekte die veroorzaakt wordt door de schimmel *Cylindrocladium buxicola*. Gezien de snelle uitbreiding van de ziekte is het voor kwekers en afnemers van Buxus van groot belang dat deze problematiek wordt aangepakt. Daarom is begin 2006 in opdracht van het Productschap Tuinbouw (PT) een onderzoek naar de oorzaak en de bestrijding van deze taksterfte opgestart. Hierin is vooral aandacht gegeven aan het zoeken naar effectieve gewasbeschermingsmiddelen. Daarnaast zijn zowel praktijkervaringen met betrekking tot deze ziekte geïnventariseerd als ook de aanwezige biologische kennis van de schimmel in kaart gebracht. Deze kennis moet in de toekomst leiden tot een meer efficiënte klassieke bestrijding, aangevuld met teeltechnische en resistentiemaatregelen.

De schimmel *Cylindrocladium buxicola* tast bladeren en stengels aan van Buxus. De ziektebeelden zijn duidelijk omschreven en goed te herkennen. Op jonge bladeren ontstaan oranje-bruine vlekken met een donkere rand. Op de oudere bladeren zijn donkerbruine vlekken zichtbaar en verkleurt het blad in zijn geheel. Typisch voor deze schimmelaantasting zijn de zwarte langgerekte plekken de takjes. Bij een ernstige aantasting vallen de bladeren en sterven de takjes af.

*Cylindrocladium buxicola* moet niet verward worden met *Volutella buxi*, een andere veel voorkomende schimmel in Buxus. *Volutella* vormt bij hoge luchtvochtigheid aan de onderkant van het blad en aan de stambasis oranje/roze sporenhoopjes. De schors van geïnfecteerde takjes kan gemakkelijk worden losgemaakt van het onderliggende hout. De sapstroom wordt verhinderd zodat verwelking optreedt. Uiteindelijk sterven geïnfecteerde takken af. Er wordt aangenomen dat *Cylindrocladium buxicola* optreedt als primaire pathogeen, terwijl *Volutella buxi* optreedt als wond- of secundaire parasiet.

De eerste aantastingen door *C. buxicola* in een Buxusteelt worden vaak gevonden aan de randen (pad, haag of sloot) van percelen. Dat zijn vaak verstoorde bodemstructuurplekken, plekken waar het gewas vaak langer vochtig blijft of minder gespoten plekken. Regelmatige controle van het Buxusperceel op eventuele aantasting door *C. buxicola* is belangrijk om een uitbraak te voorkomen. Belangrijk te weten is dat de schimmelsporen zich gemakkelijk kunnen verspreiden via teelthandelingen, dus via mensen, via kleding, snoeiapparatuur, stekmes etc. Daarnaast kan verspreiding ook plaatsvinden via wind en water via versleping van grond en planten, dieren, insecten etc. Ook afgevallen blad is een bron van infectie. Bedrijfshygiëne is dus van het grootste belang om een Buxusteelt gezond te houden. In de praktijk kunnen verschillende maatregelen worden genomen om problemen met *Cylindrocladium* of verspreiding van de schimmel te voorkomen:

- Gebruik uitgangsmateriaal dat vrij is van *Cylindrocladium*.
- Controleer stekplanten en spuit deze mee
- Rij of loop niet door een nat gewas
- Voorkom dat door werkzaamheden schimmelsporen van een aangetaste hoek worden meegenomen naar een gezonde hoek
- Verwijder zieke planten en afgevallen blad
- Geef in de containerteelt 's ochtends water zodat het gewas sneller opdroogt
- Pas teeltwisseling toe. Hierdoor vermindert de infectiedruk
- Zorg voor een goede bodemstructuur

Bij een aantasting door *Cylindrocladium* kunnen verschillende gewasbeschermingsmiddelen worden ingezet. In diverse effectiviteitsproeven zijn verschillende middelen getest op hun werking tegen *Cylindrocladium* in Buxus. Uit deze proeven bleek dat de bestrijding van *Cylindrocladium* mogelijk is als er op tijd wordt ingegrepen met de toegelaten middelen: Mirage Plus, Switch, Folicur, Ortiva, Flint, Kenbyo, maneb, captan. Het middel Spirit (folpet+tebuconazool) is niet meegenomen in dit onderzoeksproject, maar uit ander onderzoek blijkt Spirit ook te werken tegen *Cylindrocladium* in Buxus. De meeste middelen blijken vooral preventief te werken, dus voordat er een duidelijk aantasting in het Buxusgewas zichtbaar is. Als tijdig wordt ingegrepen is een bestrijding van deze ziekte goed mogelijk.

De spuittechniek is een aandachtspunt bij deze schimmelziekte. *Cylindrocladium* is vooral in Buxusbollen en piramide-teelt lastig te bestrijden. Dat heeft te maken met vaak een slechte indringing van de spuitvloeistof in de compacte Buxusbol en -piramiden. Het advies is om met veel water te spuiten en bij voorkeur van twee kanten door bijvoorbeeld heen en terug te rijden.

Voor een goede werking is verder een juist spuitmoment belangrijk. De weersomstandigheden vóór, tijdens en na een bespuiting hebben grote invloed op het uiteindelijke effect van die bespuiting. De middelen tegen *Cylindrocladium* kunnen worden ingedeeld in contact middelen, systemische middelen en een specifieke groep: de strobilurinen. Contactfungiciden hebben over het algemeen een breed werkingspectrum. Ze worden gespoten op droog blad en bij drogend weer. Een goede bedekking van het blad is van belang, niet geraakte delen en nieuw aangegroeide delen van de plant zijn onbeschermd. Voorbeelden van contactmiddelen zijn: captan, maneb, Daconil. Systemische middelen worden opgenomen door de plant en kunnen zich verplaatsen in de plant. Systemische middelen kunnen het beste bij groeizaam weer worden gespoten bij niet al te hoge temperaturen en niet bij zogenaamd scherp weer. Voorbeelden van systemische middelen zijn: Mirage Plus, Switch, Folicur en Spirit. De derde groep, de strobilurinen worden vastgelegd in de waslaag van het blad. Deze middelen hebben een lange werking. Nadeel is dat de strobilurinen gevoelig zijn voor resistentie. Om die reden moeten deze middelen worden afgewisseld met middelen uit de andere groepen. Voorbeelden van strobilurinen zijn: Kenbyo, Ortiva en Flint. In het laatste jaar van dit onderzoeksproject is aandacht gegeven aan het toetsen van verschillende bestrijdingstrategieën. Het is gebleken dat vooralsnog beter preventief kan worden gespoten dan wachten op de eerste bladvlekken. De huidige beheersing van deze schimmelziekte bestaat voornamelijk uit een regelmatige chemische bestrijding door middel van kalenderbespuitingen, waarbij de frequentie en middelenkeuze afhankelijk is van de weersomstandigheden en de mate van aantasting.

Een gezonde start van een Buxusteelt, kan later in de teelt veel problemen voorkomen. In dit project is onderzocht of dompeling van het stek in ontsmettingsmiddel of in warmwater de schimmelproblemen bij aanvang van de Buxusteelt kan voorkomen. Het ontsmetten van Buxusstek door middel van een ontsmettingsmiddel was perspectiefvol. Een warmwaterbehandeling rond de 45°C gedurende een half uur gaf een vermindering van aantasting in Buxusstek. De temperatuurgrens tussen het afdoden van *C. buxicola* en de schade voor Buxus ligt echter dicht bij elkaar.

In dit onderzoeksproject is een snelle DNA-toets ontwikkeld om *Cylindrocladium buxicola* te kunnen aantonen. De nadruk lag vooral op het detecteren van deze schimmel in symptoomloos plantmateriaal. In monsters van symptoomloze bladeren kon *Cylindrocladium buxicola* worden aangetoond. Met deze DNA-detectiemethode kan in geval van twijfel nu dus snel een juiste diagnose worden gesteld.

*Cylindrocladium buxicola* kan in het gehele Buxussortiment voorkomen. Wel zijn er verschillen in kwetsbaarheid tussen soorten en cultivars. *Buxus*. Het is niet bekend welke factoren een rol spelen in soortgevoeligheid. In dit onderzoekproject is een snelle laboratoriumtest ontwikkeld om te kunnen bepalen wat de gevoeligheid is van een bepaalde Buxussoort of -cultivar voor *C. buxicola*. Buxuscultivars werden kunstmatig besmet met de schimmel. In deze proef bleken de meeste onderzochte Buxus cultivars gevoelig tot zeer gevoelig te zijn voor *C. buxicola*. Eén cultivar *Buxus microphylla* 'Herrenhausen' bleek niet gevoelig voor de schimmel. Dat wordt ook door praktijkervaringen ondersteund. Echter, bij andere cultivars waren er duidelijke verschillen tussen de uitslag van de proef en de praktijkervaringen. Op de lange termijn is het vinden van minder gevoelige Buxuscultivars erg belangrijk. Weliswaar kan met een intensief spuitschema de Buxusteelt (redelijk) vrij worden gehouden van *C. buxicola*, maar wanneer de planten op hun eindbestemming zijn en geen bescherming meer krijgen dan kan de ziekte alsnog toeslaan. Buxussoorten die door meerdere onderzoekers worden genoemd als redelijk ongevoelig voor taksterfte zijn *Buxus microphylla* 'Herrenhausen' en *Buxus sempervirens* 'Arborescens'. Dit onderzoek wijst wel uit dat binnen het Buxussortiment grote verschillen bestaan in gevoeligheid voor *Cylindrocladium buxicola*. Meer onderzoek naar de gevoeligheid van het Buxussortiment is nodig.

Halverwege het Buxusproject, na bijna 2 jaar onderzoek zijn de bevindingen voor het beheersen van *Cylindrocladium* in Buxus samengevat in een informatieposter over taksterfte in Buxus. De informatieposter is in augustus 2007 uitgebracht in een samenwerking van de NBvB, PPO Bomen, Anthos, Productschap Tuinbouw (PT), Naktuinbouw en diverse boomteeltadviseurs. De toen meest actuele informatie over het schadebeeld, bestrijding, preventie en ontwikkeling en verspreiding van de ziekte wordt op de poster weergegeven. Tevens werden eind 2007 de bevindingen gepresenteerd in 3 voorlichtingsbijeenkomsten, in Boskoop, Apeldoorn en Eindhoven over de toen nieuwe Buxusziekte. Een van de vragen die naar voren kwam was de rol van bemesting op de ziekteontwikkeling. In het voorjaar van 2008 is daarom een proef gedaan naar een mogelijke preventieve werking van aangepaste basisbemesting tegen *C. buxicola*. In deze proef is gekeken of een extra Kali bemesting Buxus weerbaarder maakt tegen *Cylindrocladium buxicola*. De proef liet zien dat een extra kalium –gift geen effect had op de ontwikkeling van *Cylindrocladium buxicola* in Buxus.

Praktijkervaringen zijn wel dat het opjagen van Buxus met extra stikstof de planten gevoeliger maakt voor aantastingen, dus ook voor *Cylindrocladium*. Voor een gezonde teelt is een gezonde bodem (goede structuur, goede ontwatering en een evenwichtige voedingstatus) natuurlijk wel belangrijk, maar het is geen garantie dat planten geen last kunnen krijgen van *Cylindrocladium*.

De genetische variatie tussen verschillende isolaten die zijn gevonden in Groot Brittannië en Nieuw Zeeland is gering. Om een indruk te krijgen van de genetische variatie van isolaten van *C. buxicola* verkregen uit verschillende locaties in Nederland zijn 6 isolaten onderzocht op hun genetische variatie. Het bleek dat er geen variatie was en dat de schimmels identiek waren. Het lijkt er dus op dat de verspreiding door het land is gebeurd vanuit één aantastingsbron. Aangenomen mag worden dat de verspreiding vooral is gebeurd via de intensieve Buxushandel en transport tussen Buxuskwekerijen. Aangezien het één stam is, is het aannemelijk dat de schimmel op verschillende locaties in het land (nog) geen verschillen in gevoeligheid heeft kunnen ontwikkelen voor de gebruikte gewasbeschermingsmiddelen.

De kennis die in dit project is verkregen heeft van de in 2006 nog onbekende schimmel *C. buxicola* een bekende schimmel gemaakt. Buxustelers kennen de schimmel inmiddels. Het belang van bedrijfshygiëne is duidelijk en er kan gebruik worden gemaakt van een aantal gewasbeschermingsmiddelen. Toch blijven vragen bestaan over de juiste bestrijdingstrategie. Ook vragen over de overleving en verspreiding van de schimmel zijn nog niet volledig beantwoord. Tevens heeft het onderzoek laten zien dat er mogelijkheden zijn om minder bevreesd te zijn voor *C. buxicola* door aandacht te geven aan het ontwikkelen van weinig vatbare of zelfs resistente cultivars.

Het geheel van chemische en teelttechnische maatregelen en gebruik van waardplantresistentie moet uiteindelijk leiden tot een goede controle van de ziekte en het veilig stellen van de toekomst van de belangrijke Nederlandse Buxusteelt.





# Voorwoord

Dit project bestrijkt een periode van 4 jaar. Op 1 mei 2006 is het project *Taksterfte in Buxus* van start gegaan in samenwerking met Lucel. Vanaf 1 januari 2008 is het onderzoek uitgevoerd in samenwerking met DLV-Boomteelt. Dit project eindigde eind december 2009. Hiervan wordt in deze eindrapportage verslag van gedaan.

Anno 2010 wordt in de praktijk nog veel gespoten tegen taksterfte in Buxus. Het risico op resistentie-ontwikkeling van de schimmel tegen veel gebruikte middelen is reëel aanwezig. Daarom heeft de sector ingestemd met een vervolgproject met als doel een effectieve bestrijdingstrategie te ontwikkelen. Vanaf 1 januari 2010 is het nieuwe project van start gegaan: Taksterfte Buxus II. De eindrapportage van het nieuwe project is in mei 2012.

In België is in september 2009 een 4-jarig IWT-project van start gegaan met deelname van het Proefcentrum voor Sierteelt (PCS) en het Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO). In dit project worden de diversiteit en epidemiologie van de schimmel en de mogelijke resistentie aanwezig in de waardplant onderzocht. Met de verantwoordelijke Belgische onderzoekers, Kurt Heungens en Bjorn Gehesquière wordt regelmatig contact onderhouden om de onderzoekresultaten van beide projecten te bespreken en op elkaar af te stemmen.



# 1 Inleiding

De Buxusteelt in Nederland wordt al sinds 2005 geteisterd door een nieuwe ziekte: bladvlekken, taksterfte en bladval, veroorzaakt door de schimmel *Cylindrocladium buxicola*. De schimmel geeft op veel bedrijven ernstige schade. Bij een aantasting door *Cylindrocladium* gaat de plant meestal heel snel achteruit in zijn sierwaarde. Een aanzienlijk deel van de takken van de Buxusplant verliest zijn blad en twijgen drogen in. Op de aangetaste bladeren ontstaan donkerbruine vlekken, vaak met een bleek centrum. Op aangetaste takken zien we zwarte streep-vormige vlekken. De aantasting zorgt voor taksterfte en bladval, waardoor planten onverkoopbaar worden.

De ziektedruk in Buxus was de laatste jaren in bepaalde perioden erg hoog. Langdurige natte weersomstandigheden in combinaties met hoge temperaturen zijn hiervan de oorzaak. In de praktijk bleken vele Buxustelers vaak wekelijks te spuiten tegen *Cylindrocladium*. Meestal langdurig met dezelfde middelen. Daardoor is het gevaar groot dat de schimmel ongevoelig wordt voor deze gewasbeschermingsmiddelen. Het gevolg kan zijn dat *Cylindrocladium* niet meer afdoende bestreden kan worden.

Aanvankelijk werd het probleem van *Cylindrocladium* in Buxus niet door iedereen herkend en erkend. Veel kwekers hebben zich laten verrassen door de snelheid van ziekte-ontwikkeling in hun Buxusperceel en hebben grote schade geleden. De ervaring is dat wanneer de ziekte zich eenmaal heeft gevestigd in het Buxusgewas het erg moeilijk is om de planten weer ziektevrij te krijgen. Zeer intensieve spuitschema's waren het gevolg en zelfs die frequente bespuitingen konden het probleem niet verhelpen.

Begin 2006 is in opdracht van het Productschap Tuinbouw (PT) een onderzoek naar de oorzaak en de bestrijding van deze toen nieuwe schimmelziekte opgestart. Het eerste onderzoeksdeel bestond uit 2 jaar onderzoek naar effectieve gewasbeschermingsmiddelen en daarnaast is de biologische kennis van de schimmel in kaart gebracht. Eind 2007 bleek dat er meer onderzoek gewenst was, naar de biologie, naar middelen en vooral naar effectieve spuitschema's. Ook was er behoefte aan meer kennis van de gevoeligheid van het Buxussortiment voor *Cylindrocladium*. Tot slot kwam uit de praktijkinventarisatie naar voren dat de ziekte vooral toeslaat in het jonge schot van snelgroeïende Buxusplanten. Daarom is ook een proef gedaan naar het effect van een andere bemesting op de ziekteontwikkeling.



## 2 Doelstellingen

- Kennis over de biologie van *Cylindrocladium buxicola* en ervaringen met de bestrijding van deze schimmel in andere landen wordt verzameld.
- In effectiviteitsproeven worden verschillende gewasbeschermingsmiddelen getest op hun werking tegen *Cylindrocladium* in Buxus. De middelen worden zowel in een buitenproef op een praktijkbedrijf uitgevoerd als in een kasproef.
- In de praktijk worden verschillen in aantasting tussen bedrijven geconstateerd. In dit onderzoek wordt geïnventariseerd of er teeltmaatregelen zijn die de aantastingsverschillen kunnen verklaren. Hieruit kunnen handvatten voor een goede bestrijdingsstrategie worden gehaald.
- Bestudering van de epidemiologie (overleving en verspreiding) van de schimmel met als doel om de juiste maatregelen te treffen, zowel preventief als curatief. Dit om de infectiedruk zo laag mogelijk te houden.
- Het ontwikkelen van een effectieve bestrijdingsstrategie. Essentieel hierin is een juist afwisselingschema van de beschikbare gewasbeschermingsmiddelen.



## 3 Werkwijze

### Biologie van de schimmel

De aanwezige en verzamelde kennis op het gebied van de biologie van *Cylindrocladium* is verzameld om de overleving, infectie en verspreiding van deze schimmel goed te kennen. De levenscyclus van de schimmel is beschreven. Speciale aandacht wordt gegeven aan de rol van rustsporen in het ziekteproces. Ook is onderzocht of de zwarte strepen op de stengels een belangrijke rol spelen in de verspreiding van de ziekte. Zie paragraaf 4.1

### Effectiviteitsproeven

Op basis van o.a. eerder uitgevoerd Brits onderzoek is in 2006 een reeks van bestrijdingsmiddelen onderzocht op hun werking tegen taksterfte. Om de kans op een succesvolle kasproef te vergroten zijn de Buxusplanten kunstmatig besmet met de schimmel. In 2007 zijn effectiviteitsproeven gedaan op een praktijkbedrijf en op de proeflocatie Rijnveld, Boskoop. De perspectieven van de middelen voor toelating in de boomkwekerij zijn steeds afgestemd met de industrie/ toelatingshouders. Ook in 2008 en 2009 zijn middelen onderzocht, maar is ook aandacht gegeven aan het afwisselen van middelen uit verschillende resistentiegroepen. Zie paragraaf 4.2

### Bestrijdingstrategie gewasbeschermingsmiddelen

Op basis van het eerder uitgevoerd onderzoek zullen de gewasbeschermingsmiddelen die een werking hebben tegen taksterfte afwisselend worden ingezet. In verschillende proeven, zowel op praktijkbedrijven als op proeflocaties, worden verschillende spuitschema's onderzocht op hun effectiviteit. Zie paragraaf 4.2

### Inventarisatie van teeltverschillen

De teeltpraktijk van verschillende Buxusbedrijven wordt door Lucel en DLV-plant in kaart gebracht. Samen met de resultaten van de effectiviteitsproeven wordt een bestrijdingsstrategie opgesteld. Zie paragraaf 4.2

### Ontsmetting van Buxussteek

Een gezonde start van een Buxusteelt, vrij van *C. buxicola*, kan later in de teelt veel problemen voorkomen. In een proef zijn stekjes behandeld met ontsmettingsmiddel en met warmwater. Zie paragraaf 4.3

### Moleculaire detectie

Om *Cylindrocladium buxicola* te kunnen identificeren en detecteren wordt een snelle moleculaire (PCR)-toets ontwikkeld. Zie paragraaf 4.4

### Gevoeligheid Buxussortiment

In laboratorium en kasproeven wordt de relatieve gevoeligheid van het Buxussortiment voor *Cylindrocladium buxicola* onderzocht. Wanneer er grote verschillen worden gevonden, dan kan gekozen worden voor het telen van Buxussoorten die minder gevoelig zijn. Zie paragraaf 4.5

### Invloed bemesting op taksterfte

In een potproef op een proeflocatie wordt de invloed van verschillende bemestingsniveaus op taksterfte onderzocht. Er wordt bepaald of er een relatie is tussen hoge mestgiften en snelle groei van Buxusplanten en de mate van aantasting en verspreiding van taksterfte. Zie paragraaf 4.6

### Communicatie

Communicatie van bevindingen naar de praktijk, middels open dagen, lezingen, poster en artikelen. Voor het bespreken van de resultaten en het bewaken van de voortgang van het project wordt een begeleidingscommissie samengesteld bestaande uit Buxustelers. De resultaten van de middelenproeven worden besproken met de Werkgroep toelatingen Boom- en vaste plantenteelt, van de NBvB.





## 4 Resultaten

### 4.1 Biologie van *Cylindrocladium buxicola*

#### 4.1.1 Herkennen en schadebeeld

De schimmel *Cylindrocladium buxicola* tast de bladeren en stengels aan van Buxus. Op jonge bladeren ontstaan oranje-bruine vlekken met een donkere rand. Op de oudere bladeren zijn donkerbruine vlekken zichtbaar en verkleurt het blad in zijn geheel. Op takken ontstaan zwarte streepjes die zich ontwikkelen tot grotere plekken. Uiteindelijk kan een aantasting leiden tot complete bladval en het afsterven van de takjes. Zie afbeeldingen 1t/m 5.



Afbeelding 1. Bladvlekken in Buxus.



Afbeelding 2. Zwarte strepen op de stengels.



Afbeelding 3. Ernstige aantasting met bladval.



Afbeelding 4. Complete bladval in een Buxusteelt.



Afbeelding 5. Van links naar rechts, het verloop van een *Cylindrocladium* aantasting in Buxus.

In een dicht gewas zijn de eerste symptomen vaak niet direct te zien. Zodra de bladeren ineens massaal van de plant vallen, is de schade al aanzienlijk. Planten kunnen zich na een aantasting wel herstellen, vooral als accuraat wordt ingegrepen, door het verwijderen van aangetast materiaal en met een goede chemische bestrijding van de schimmel. Uiteraard geeft zo'n aantasting wel groeiremming of misvorming van de plant. De eerste aantastingen worden vaak gevonden aan de randen (pad, haag of sloot) van percelen. Dat zijn vaak verstoorde bodemstructuurplekken, plekken waar het gewas vaak langer vochtig blijft of minder gespoten plekken.

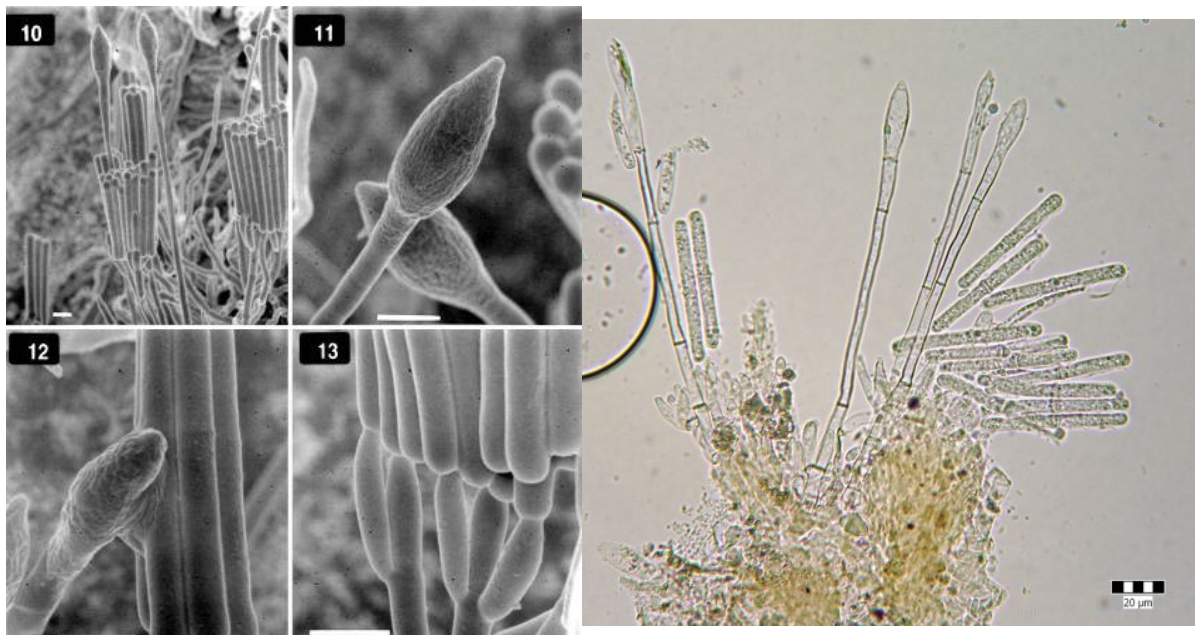
N.B. Deze aantasting door *Cylindrocladium buxicola* moet niet worden verward met de aantasting die wordt veroorzaakt door *Volutella buxi* (typische vorming van oranje/roze schimmelpluis bij hoge luchtvochtigheid).

#### 4.1.2 Levenswijze en verspreiding

*C. buxicola* ontwikkelt zich het beste bij vochtige omstandigheden en bij een temperatuur rond de 25°C. Bij een hoge luchtvochtigheid kiemen de sporen van *C. buxicola* al na 3 uur. Na 5 uur kan de schimmel al het Buxusblad hebben geïnfecteerd. Als de schimmel in het blad zit, dan ontwikkelt de ziekte zich snel. *C. buxicola* heeft geen wondjes of beschadigingen nodig om de planten binnen te dringen. Infectie kan dus ook op gezond blad plaatsvinden. Ook bij lagere temperaturen kan de schimmel zich ontwikkelen. In de literatuur wordt gesproken over een temperatuur vanaf 5°C. Vanaf 30°C stopt de groei en bij een langdurige temperatuur boven 33°C sterft de schimmel af. Schimmelsporen verspreiden zich vooral via teelthandelingen, dus via mensen, via kleding, snoeiapparatuur, stekmes etc. Daarnaast kan verspreiding ook plaatsvinden via wind en water via versleping van grond en planten, dieren, insecten etc. Uit oudere zwarte streepjes op de stengels kan de schimmel weer nieuwe sporen maken, die weer een bron zijn van nieuwe aantastingen. Op afgevallen blad kan de schimmel vrij lang overleven. Hierdoor kan in het voorjaar weer een nieuwe aantasting ontstaan.

Rustsporen zijn nog nooit gevonden. De schimmel overleeft als schimmeldraden, soms als kluwen, in afgevallen plantmateriaal, bladeren of takjes.

Microscopische afbeeldingen van *C. buxicola*.



Afbeelding 6. Sporen en sporendragers van *Cylindrocladium buxicola*. Bron: Henricot, 2002.

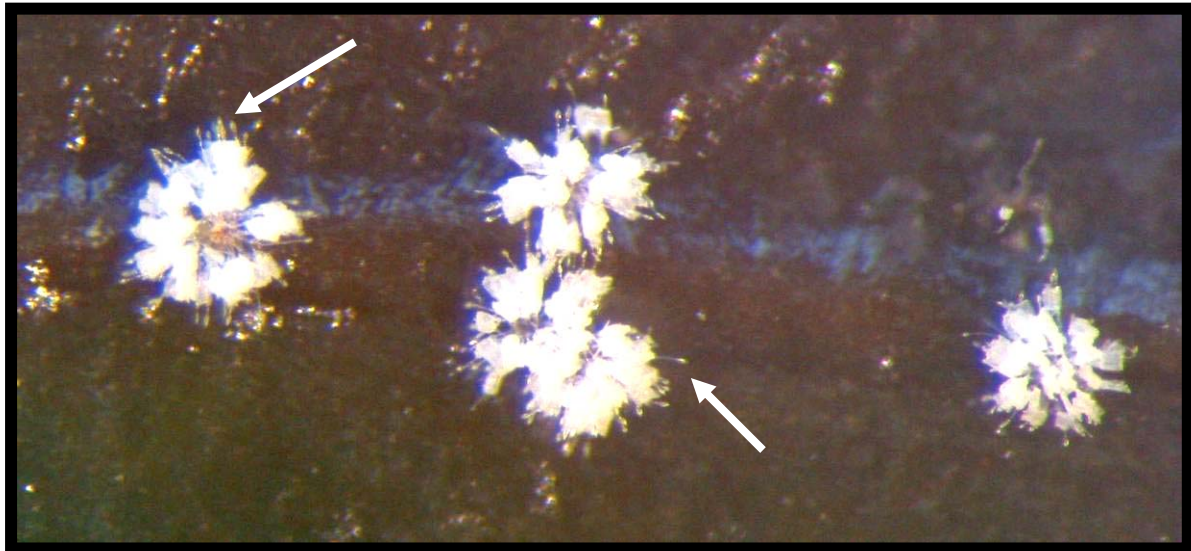
Afbeelding 7. *C. buxicola* in de lichtmicroscop. Bron: Brand, 2008.

De sporen van *C. buxicola* zijn typisch cilindervormig. Kenmerkend zijn de begeleidende cellen met een spitsvormig blaasje aan het uiteinde.

Met een loep of binoculair zijn die typische begeleidende cellen ook te zien, zie afbeeldingen 8 en 9.



Afbeelding 8. Uitgroei van schimmelweefsel (*C. buxicola*) in Buxusblad.



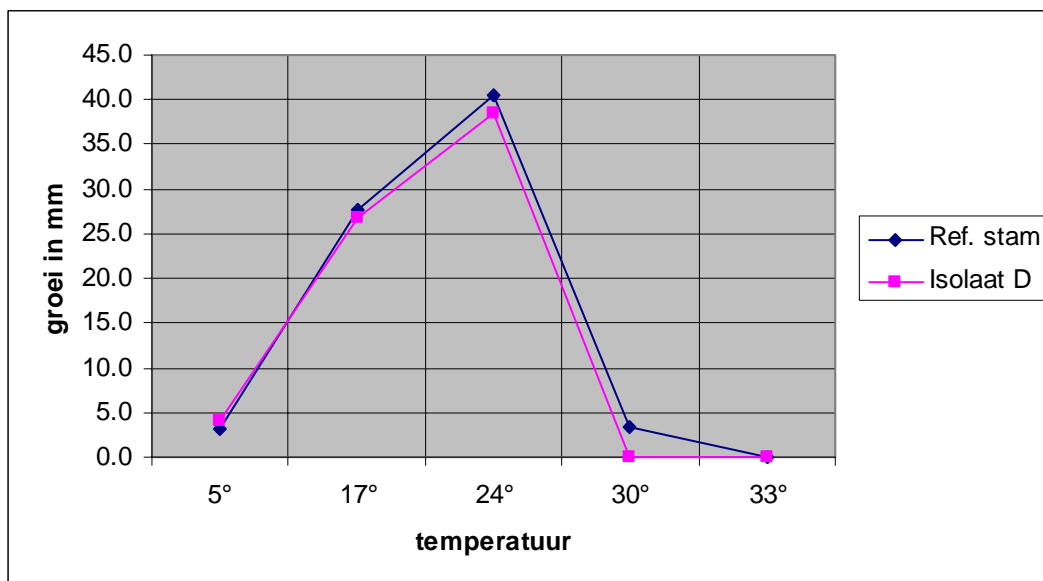
Afbeelding 9. Met behulp van een binoculair zijn de typische sporenhoopjes te zien. Duidelijk te zien zijn de uitstekende cellen met blaasjes aan de top, zie witte pijltjes.

#### 4.1.3 Proef temperatuurgevoeligheid van 2 isolaten van *Cylindrocladium buxicola*

In de literatuur wordt een temperatuurproef op agar beschreven. Het optimum ligt bij 25°C (2.8 mm/dag), 27.5°C geeft een groeiremming van ongeveer 50%. Bij 30°C stopt de groei en vanaf 33°C is dodelijk voor de schimmel. N.B. Bij deze proefnemingen worden de temperaturen langdurig op die temperaturen gehouden. In de praktijk kan het op sommige dagen best warmer dan 33°C worden, maar dat is voor een korte periode. De schimmel overleeft die korte perioden wel.

Om te zien of de bij PPO aanwezige isolaten van *C. buxicola* hetzelfde reageren, is een groeiproef gedaan. Voedingsbodems met in het centrum een ponsje van de schimmel werden bij verschillende temperaturen weggezet. Na een week werd de radiale uitgroei van de schimmel vanuit het centrum gemeten. De resultaten zijn weergegeven in figuur 1.

Figuur 1. Radiale groei van 2 isolaten van *Cylindrocladium buxicola* op voedingsbodem.



Figuur 1 laat zien dat de groei in relatie tot de temperatuur van een isolaat van *C. buxicola* verkregen uit een zieke Buxusplant nagenoeg gelijk is aan de groeicurve van het standaardisolaat van *C. buxicola*. De resultaten zijn in overeenstemming met met die uit de literatuur.

In de literatuur wordt verder beschreven dat er heel weinig genetische variatie is tussen verschillende isolaten die zijn gevonden in Groot Brittannië en Nieuw Zeeland. Om een indruk te krijgen van de genetische variatie van isolaten van *C. buxicola* verkregen uit verschillende locaties in Nederland zijn 6 isolaten opgestuurd naar Pedro Crous van CBS-KNAW, universiteit Utrecht. Na bestudering van de isolaten werd geconstateerd dat er geen genetische variatie is gevonden: "*Based on histone and beta-tubulin, all isolates sent are identical to the type strains of buxicola and neonaviculatum. The correct name, however, should be neonaviculatum (but this is academic). No teleomorph was found, and the matings have proven unsuccessful thus far.*"

Het is dus aannemelijk dat er oorspronkelijk één aantastingsbron was. De verspreiding van de schimmel is gebeurd vanuit een locatie. Aangenomen mag worden dat de verspreiding vooral is gebeurd via de intensieve Buxushandel en transport tussen Buxuskwekerijen. Eenmaal aangekomen op een Buxuskwekerij kan de schimmel zich lokaal via lucht, water en teelthandelingen verder verspreiden over het bedrijf.

#### 4.1.4 Waardplanten van *Cylindrocladium buxicola*

*C. buxicola* tast alleen Buxus aan. De meeste soorten en cultivars zijn gevoelig. Cultivars van *Buxus sempervirens* blijken meestal gevoeliger dan *Buxus microphylla*. Echter, ook in *B. microphylla* 'Faulkner' worden problemen aangetroffen. Zie verder ook 4.5

## 4.2 Middelenonderzoek

### 4.2.1 Screening middelen tegen taksterfte in Buxus, 2006

In dit screeningsonderzoek zijn “nieuwe” middelen en fungiciden die tegen andere schimmels worden ingezet, getest. Er zijn proeven in de praktijk en onder geconditioneerde omstandigheden in klimaatkasten uitgevoerd. Dit is het verslag van de proef in klimaatkasten. In deze proef is de preventieve werking van de middelen getest

#### Uitvoering

De proef is uitgevoerd bij PPO in Lisse. Voor de proef werd *Buxus sempervirens* 'Suffruticosa' gebruikt in ronde P9-pot. De proef is in 4 herhalingen uitgevoerd. Planten zijn kunstmatig besmet met een sporensuspensie van *Cilindrocladium buxicola*. Elke plant werd bespoten met 3 ml van een suspensie met  $5 \times 10^4$  sporen per ml. De behandelingen/ bespuitingen met middelen werden uitgevoerd op 20-9-2006 op het containerveld. Daarna werden de planten in de kas weggezet. Na 1 dag op 21-9-2006 werden de planten besmet, daarna werden de planten in een klimaatkast gezet, afbeelding 10.

De temperatuur was ingesteld op 25°C en over de planten was een plastic tent gezet die dagelijks werd natgespoten. Planten werden ook dagelijks natgespoten om te streven naar 100% relatieve luchtvochtigheid. De proef duurde 2 weken. Op 6-10-2006 werden de planten beoordeeld op de ziektegraad per plant volgens een index van 0 tot en met 5: 0 = geen symptomen; 1 = twijfelachtig, zeer lichte aantasting; 2 = lichte aantasting; 3 = duidelijke taksterfte; 4 = uitgebreide taksterfte; 5 = gehele plant is aangetast. (afbeelding 11)



Afbeelding 10. Planten in klimaatkast.

Afbeelding 11. Beoordelingsschaal met planten uit de proef. Ziekte-index, van 0 t/m 4



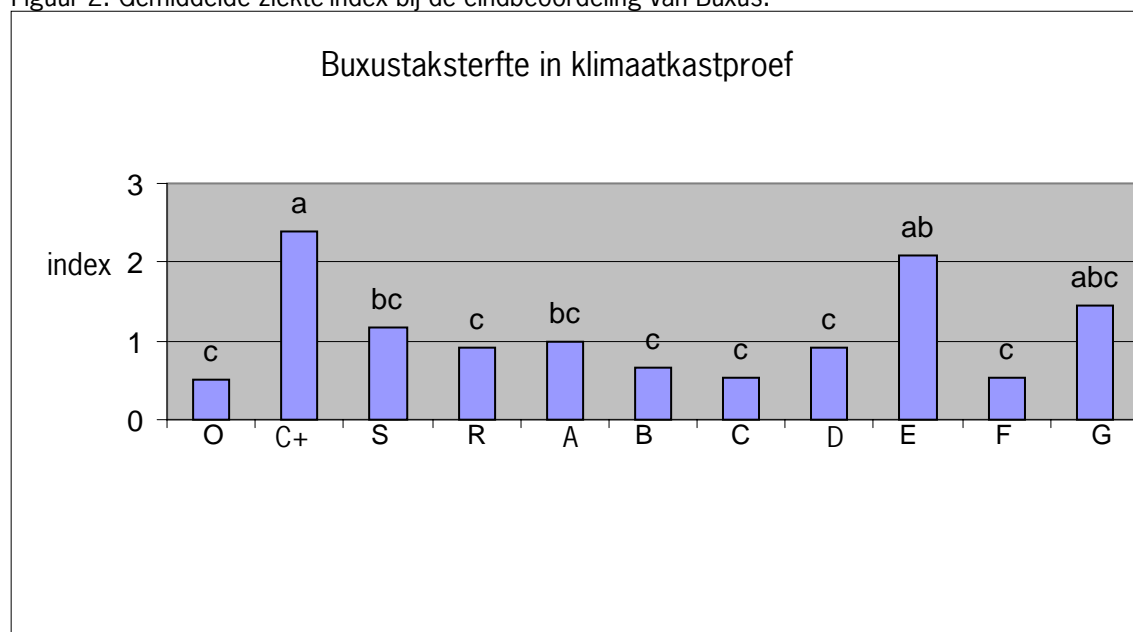
Tabel 1. Behandelingschema screeningsproef klimaatkast, 2006

Behnr.	code	omschrijving	actieve stof	Dosering
1	O	Onbesmette controle	-	-
2	C+	Besmette controle	-	-
3	S	TopsinM+Daconil	thiofanaat-methyl+chloorthalonil	0.14%+0.3%
4	R	Maneb-brabant	maneb	0.3%
5	A	Switch	cyprodinil+fludioxonil	0.1%
6	B	Mirage-plus	folpet+prochloraz	0,18%
7	C	Code 1	-	0.15%
8	D	Code 2	-	0.19%
9	E	Ortiva	azoxystrobin	0.1%
10	F	Flint	trifloxystrobin	0.0125%
11	G	Code 3	-	0.1%

### Resultaten en discussie

Op 6 oktober zijn de planten beoordeeld op aantasting. Ondanks de gunstige omstandigheden die gecreëerd zijn voor de schimmel is het niet tot een zeer zware aantasting in de besmette onbehandelde planten gekomen. Mogelijk dat de het inoculum van  $5 \times 10^4$  sporen/ml te laag was. Toch zijn er wel verschillen tussen de behandelingen opgetreden en kunnen conclusies worden getrokken, zie figuur 2.

Figuur 2. Gemiddelde ziekte-index bij de eindbeoordeling van Buxus.



Het middel Ortiva en G lieten weinig werking zien tegen *Cylindrocladium buxicola*. Behandeling S vertoonde wel een redelijke werking op de taksterfte. Het middel A was qua werking vergelijkbaar met de standaard. De andere middelen maneb, Mirage Plus, C, D en Flint hadden een iets betere werking tegen taksterfte dan de standaard. Deze verschillen zijn echter niet betrouwbaar.

Dit zijn de resultaten van een eenmalige proef. Om goed gefundeerde uitspraken te doen moet de proef worden herhaald. Bovendien is de preventieve werking van de middelen getest (eerst gespoten en dan besmet). Verder onderzoek is noodzakelijk om tot een goede bestrijdingstrategie te komen. Vragen die nog moeten worden beantwoord zijn o.a. wat zijn de optimale spuittijdsintervallen, wanneer beginnen met de bespuitingen en moeten middelen gemengd of afwisselend worden toegepast. Verder worden in vervolgprouwen middelen getest op hun curatieve werking tegen taksterfte in Buxus.

## Conclusies uit de kasproef

- De middelen maneb, Mirage Plus, C, D en Flint hadden in deze proef een goede preventieve werking tegen taksterfte.
- De combinatiebehandeling Topsin M+Daconil en het middel A hadden een iets mindere werking.
- Ortiva en middel G hadden in deze proef geen goede preventieve werking tegen taksterfte in Buxus.

## 4.2.2 Veldproeven middelen tegen taksterfte in Buxus, 2006

In 2006 zijn 4 effectiviteitsproeven bij 3 Buxuskwekers uitgevoerd. Lucel heeft de proeven aangelegd, bespuitingen uitgevoerd en waarnemingen gedaan. Alle proeven zijn uitgevoerd volgens deugdelijkheidsprotocollen van PPO.

### Gegevens Bedrijf 1.

De proef is uitgevoerd door Lucel in een vollegrondteelt van *Buxus sempervirens*.

Locatie	: Biezenmortel
Gewas	: Buxus sempervirens 2 jarig ( van stek)
Aantal planten	: 5 rijen per bed ( 25 x 20 cm)
Behandelingen	: 9, zie schema
Herhalingen	: 4 ( blokkenproef)
Oppervlakte proefveld	: 900 m <sup>2</sup>
Planten per m <sup>2</sup>	: 25 stuks
Grondsoort	: zand
Aantal bespuitingen	: 6
Data bespuitingen	: 29 juni, 20 juli, 8 augustus, 23 augustus, 6 september en 2 oktober
Beoordeling	: iedere keer voor bespuiting, vanaf 6 september zichtbaar
Eindbeoordeling	: 18 oktober 2006
Ziektegraad	: per veldje volgens beoordelingsschaal: 0 – 5
Uitvoering behandelingen	: Rugspuit met spuitboom van 75 cm ( doppen 25 cm van elkaar)
	Spuitboomhoogte : 30 cm
	Spuitdruk : 3 bar
	Doppen : Tee Jet 80-02
	Veldlengte : 4 mtr
	Veldbreedte : 4 mtr
	Spuitopp/veldje : 16 m <sup>2</sup>
	Spuihoeveelheid : 800 l/ha

Tabel 2. Behandelingsschema veldproeven

Beh	code	behandeling	actieve stof	Dosering
1	O	Onbehandeld	-	-
2	S	TopsinM+Daconil	Thiofanaat-methyl + chloorthalonil	0,14% + 0,3%
3	R	Maneb	Maneb	0.3%
4	A	Switch	cyprodinil+fludioxonil	0.1%
5	B	Mirage-plus	Folpet+prochloraz	0,18% *
6	C	Code 1	-	0,15%
7	D	Code 2	-	0,19%
8	E	Ortiva	azoxystrobin	0,1%
9	F	Flint	trifloxystrobin	0,0125%

\*Mirage Plus maximaal 400 l/ha bij 0,35%.



### Resultaten en discussie

Planten zijn iedere keer voor een bespuiting beoordeeld op taksterfte. De maanden juni en juli 2006 waren warm en droog. De weeromstandigheden waren voor de schimmel *C. buxicola* niet gunstig. De maand augustus was erg nat. In deze maand waren de omstandigheden erg gunstig voor de schimmel. Vanaf 6 september waren er zichtbare aantastingen door *Cylindrocladium buxicola*. Er waren toen al vier bespuitingen uitgevoerd. De gemiddelde aantasting was nog erg laag (onder index 1). Op 2 oktober, 4 weken na de toen laatste bespuiting, was de gemiddelde aantasting nauwelijks toegenomen. Uitzondering was behandeling D waar de gemiddelde aantasting iets boven de 2 uitkwam. Behandeling D werd dus beoordeeld als licht aangetast. Ook bij de eindbeoordeling op 18 oktober was de aantasting niet of nauwelijks toegenomen. Bij de onbehandelde planten (behandeling O) was gemiddeld sprake van zeer lichte aantasting.

Ondanks de natte augustusmaand was in deze praktijkproef geen sprake van grote uitbreiding van de schimmel *C. buxicola*, de veroorzaker van taksterfte in Buxus. De aantasting kwam vanaf 6 september pleksgewijs voor. In het proefveld werd slecht bij enkele veldjes duidelijke, tot ernstige taksterfte waargenomen. Door deze grote variatie zijn geen aantoonbare (statistische) verschillen tussen de behandelingen aangetoond.

Nadere bestudering van individuele veldjes liet zien dat in één of twee veldjes van sommige behandelingen de uitbreiding van de ziekte niet kon worden voorkomen. De volgende behandelingen leken onvoldoende te hebben gewerkt: TopsinM+Daconil, Mirage-plus, middel 3 en Flint. Code 1 en code 2 leken een werking tegen taksterfte te hebben gehad. Bij de behandelingen maneb en Ortiva was er gedurende de proefperiode zo weinig aantasting dat over de werking niets gezegd kan worden.

### Conclusie bedrijf 1

Wegens te geringe aantasting in het proefveld kunnen geen betrouwbare uitspraken worden gedaan over de werking van de getoetste middelen tegen taksterfte in Buxus.

### **Gegevens bedrijf 2**

De proef is uitgevoerd door Lucel in een volle grondteelt van <i>Buxus sempervirens</i> .	
Locatie	: Den Hout
Gewas	: Buxus sempervirens 2 jarig ( van stek)
Aantal planten	: 4 rijen per bed ( 16 x 33 cm)
Behandelingen	: 9, zie schema
Herhalingen	: 4 ( blokkenproef)
Oppervlakte proefveld	: 900 m <sup>2</sup>
Planten per m <sup>2</sup>	: 25 stuks
Grondsoort	: zand
Aantal bespuitingen	: 7
Data bespuitingen	: 1 juli, 19 juli, 7 augustus, 23 augustus, 7 september, 21 september en 3 oktober
Beoordeling	: iedere keer voor bespuiting, vanaf 21 september zichtbaar
Eindbeoordeling	: 16 oktober 2006
Ziektegraad	: per veldje volgens beoordelingsschaal: 0 (geen symptomen) - 5 (gehele veldje is ernstig aangetast)
Uitvoering behandelingen	: Rugspuit met spuitboom van 75 cm ( doppen 25 cm van elkaar)
	Spuitboomhoogte : 30 cm
	Spuitdruk : 3 bar
	Doppen : Tee Jet 80-02
	Veldlengte : 4 mtr
	Veldbreedte : 4 mtr
	Spuitopp/veldje : 16 m <sup>2</sup>
	Spuithoeveelheid : 800 l/ha
Behandelingsschema, zelfde als bij bedrijf 1, zie tabel 2.	

### Resultaten en discussie

De veldjes zijn iedere keer voor de bespuitingen beoordeeld. Ondanks de natte augustusmaand was in deze praktijkproef geen sprake van uitbreiding van *Cylindrocladium*. Vanaf 21 september was er pleksgewijs aantasting door de schimmel *Volutella buxi*. Gedurende de proef werden geen symptomen van *C. buxicola* aangetroffen. Op 16 oktober heeft de eindbeoordeling plaatsgevonden.

Bij de eindbeoordeling, op 16 oktober was de aantasting door *V. buxi* verder licht toegenomen. Bij de onbehandelde planten (behandeling 0) was gemiddeld sprake van een lichte aantasting door *V. buxi*. Nadere bestudering van individuele veldjes liet zien dat sommige behandelingen in één of twee veldjes uitbreiding van *V. buxi* kon voorkomen. Dat waren de behandelingen TopsinM+Daconil, maneb, Switch, Code 2 en Ortiva. Bij behandelingen Mirage-plus, Code 1 en Flint was er wel uitbreiding van de aantasting door *V. buxi*.

In het proefveld werd slecht bij enkele veldjes duidelijke taksterfte waargenomen. Door deze grote variatie in aantasting kunnen geen aantoonbare verschillen tussen de behandelingen worden geconcludeerd.

### Conclusie bedrijf 2

Wegens het ontbreken van aantasting in het proefveld kunnen geen betrouwbare uitspraken worden gedaan over de werking van de getoetste middelen tegen taksterfte in *Buxus*.

### **Gegevens Bedrijf 3, proef 1**

De proef is uitgevoerd door Lucel in een volle grondteelt van <i>Buxus sempervirens</i> .	
Locatie	: Hazerswoude
Gewas	: <i>Buxus sempervirens</i> 2 jarig ( van P 9)
Aantal planten	: 20 x 20 cm
Behandelingen	: 9, zie schema
Herhalingen	: 4 ( blokkenproef)
Oppervlakte proefveld	: 600 m <sup>2</sup>
Planten per m <sup>2</sup>	: 36 stuks
Grondsoort	: veengrond
Aantal bespuitingen	: 6
Data bespuitingen	: 6 juli, 22 juli, 17 augustus, 1 september, 11 september en 21 september
Beoordeling	: iedere keer voor bespuiting, vanaf 17 augustus zichtbaar
Eindbeoordeling	: 9 oktober 2006
ziektegraad per veldje	: volgens beoordelingsschaal: 0 (geen symptomen) – 5 (alle planten aangetast)
Uitvoering behandelingen	: Rugspuit met spuitboom van 75 cm ( doppen 25 cm van elkaar)
	Spuitboomhoogte : 30 cm
	Spuitdruk : 3 bar
	Doppen : Tee Jet 80-02
	Veldlengte : 4 mtr
	Veldbreedte : 4 mtr
	Spuitopp/veldje : 16 m <sup>2</sup>
	Spuithoeveelheid : 800 l/ha

Behandelingsschema, zelfde als bij bedrijf 1, zie tabel 2.

### Resultaten en discussie

De veldjes zijn iedere keer vlak voor de bespuitingen beoordeeld. Op 17 augustus, na twee bespuitingen was taksterfte nog maar in enkele veldjes aanwezig. De mate van aantasting was nog erg laag (onder index 1). Ruim een maand later, op 21 september, kwam nog steeds weinig aantasting voor in de veldjes. De mate van aantasting was wel iets toegenomen. Bij de eindbeoordeling, op 18 oktober kwam bij meer dan de helft van het aantal veldjes aantasting voor. Toch was de aantasting niet goed verdeeld over het proefveld. Bij onbehandeld kwam bv. geen aantasting voor.

Ondanks de natte augustusmaand was in deze praktijkproef geen sprake van grote uitbreiding van de schimmel *C. buxicola*. De aantasting kwam vanaf 17 augustus pleksgewijs voor. In het proefveld werd slecht bij enkele veldjes lichte tot duidelijke taksterfte waargenomen. Door deze variatie kunnen geen aantoonbare verschillen tussen de behandelingen worden aangetoond.

Nadere bestudering van individuele veldjes liet zien dat in één of twee veldjes van sommige behandelingen er uitbreiding was van de ziekte. Behandelingen TopsinM+Daconil en Switch leken een werking te hebben tegen taksterfte. De werking van code 1, code 2 en Flint leken onvoldoende. Bij de behandelingen maneb, Mirage-plus en Ortiva was er gedurende de proefperiode zo weinig aantasting dat hier niets over gezegd kan worden.

Op 9 oktober heeft de eindbeoordeling plaats gevonden.

Bij onbehandeld werd geen aantasting gevonden. Het is onduidelijk waarom er geen aantasting in de onbehandelde planten is opgetreden. De behandelingen kunnen dus niet goed worden beoordeeld op hun werking. Verder waren de variaties in aantasting tussen de veldjes binnen de herhalingen erg groot.

### Conclusie bedrijf 3, proef 1

Wegens te geringe aantasting en de grote variatie in aantasting in het proefveld kunnen geen betrouwbare uitspraken worden gedaan over de effectiviteit van de getoetste middelen tegen taksterfte.

### **Gegevens bedrijf 3, proef 2**

De proef is door PPO uitgevoerd in een volle grondteelt van *Buxus sempervirens*.

Locatie	: Hazerswoude
Gewas	: Buxus sempervirens 'Hollandia' 2 jarig ( van P 9)
Aantal planten	: 20 x 20 cm
Behandelingen	: 9, zie schema
Herhalingen	: 4 ( blokkenproef)
Oppervlakte proefveld	: 600 m <sup>2</sup>
Planten per m <sup>2</sup>	: 36 stuks
Grondsoort	: veengrond
Aantal bespuitingen	: 2
Data bespuitingen	: 11 september en 21 september
Beoordeling	: 11 september, 21 september en 9 oktober
Eindbeoordeling	: 9 oktober 2006
Ziektegraad per veldje	: volgens beoordelingsschaal: 0– 5 (alle plant zijn aangetast)
Uitvoering behandelingen	: Rugspuit met spuitboom van 75 cm ( doppen 25 cm van elkaar)
	Spuitboomhoogte : 30 cm
	Spuitdruk : 3 bar
	Doppen : Tee Jet 80-02
	Veldlengte : 4 mtr
	Veldbreedte : 4 mtr
	Spuitopp/veldje : 16 m <sup>2</sup>
	Spuithoeveelheid : 800 l/ha

Behandelingsschema, zelfde als bij bedrijf 1, zie tabel 2.

### Resultaten en discussie

Deze proef is nog vrij laat ingezet. In het proefveld zat al een behoorlijke aantasting met *Cylindrocladium buxicola*. De proef is ingezet op 11 september 2006, dit is tevens de nul situatie. Voor de eerste bespuiting op 11 september kwam al taksterfte voor in enkele veldjes van het proefveld. Deze planten hebben kort voor 11 september een behandeling gehad met een kopermeststof en Mirage Plus. Op 9 oktober heeft de eindbeoordeling plaats gevonden. Vanaf de nulsituatie tot 9 oktober hadden in deze proef 3 middelen de beste werking nl. Switch, Mirage Plus en code 1. De behandelingen met maneb en Ortiva hadden in deze proef weinig werking. De middelen TopsinM+Daconil, code 2 en Flint hadden in deze proef geen werking. Opgemerkt moet worden dat de proef kort duurde, er waren maar 2 bespuitingen.

De proefopzet was meer geschikt voor het testen van curatieve middelen dan voor preventieve middelen.

#### Conclusie bedrijf 3, proef 2

Volgens deze proef hadden Switch, Mirage Plus en code 1 een redelijke curatieve werking tegen taksterfte. Maneb en Ortiva hadden nauwelijks een curatieve werking tegen taksterfte. TopsinM+Daconil, Code 2 en Flint hadden geen curatieve werking.

#### 4.2.2.1 Algemene conclusies middelen 2006

In de Buxuspercelen van de deelnemende boomkwekerijen kwam in 2006 helaas weinig taksterfte voor. Daardoor kunnen geen harde conclusies worden getrokken over de werking van de getoetste middelen.

Voor de proeven van 2007 zijn strengere voorwaarden gesteld aan proefvelden om het risico op een niet succesvolle proef zoveel mogelijk te verkleinen. Deelnemende Buxuskwekers moeten in het voorgaande jaar veel last hebben gehad van *C. buxicola*. Aangenomen mag worden dat de infectiedruk dan voldoende hoog is voor een goede proef.

#### 4.2.3 Middelenonderzoek tegen *Cylindrocladium buxicola*, in 2007.

Doel van de proeven is het vaststellen van de werking van diverse gewasbeschermingsmiddelen tegen de schimmel *Cylindrocladium buxicola* in Buxus.

De proeven zijn uitgevoerd in een kasproef bij PPO Lisse en twee veldproeven, 1 in Boskoop (PPO-locatie) en 1 in Tienray (praktijkperceel).

#### Lisse kasproef

De bespuiting zijn uitgevoerd met een Veeze proefveldspuit, spuitdruk 3 bar, met Lechler doppen AD110 03vs. De spuithoeveelheid was omgerekend 800 l/ha. Een veldje bestond uit 16 planten. Een dag na de bespuitingen werden de planten kunstmatige besmet met een sporensuspensie van *C. buxicola*.  $1 \times 10^5$  sporen per ml en 3 ml per plant. Daarna zijn ze in plastic kooien geplaatst om de omstandigheden voor infectie zo gunstig mogelijk te krijgen. Gedurende vier dagen na besmetting zijn de planten elke dag met een plantenspuit besproeid, zodat ze goed vochtig bleven.

De ziektegraad is per plant bepaald m.b.v. een ziekte-index:

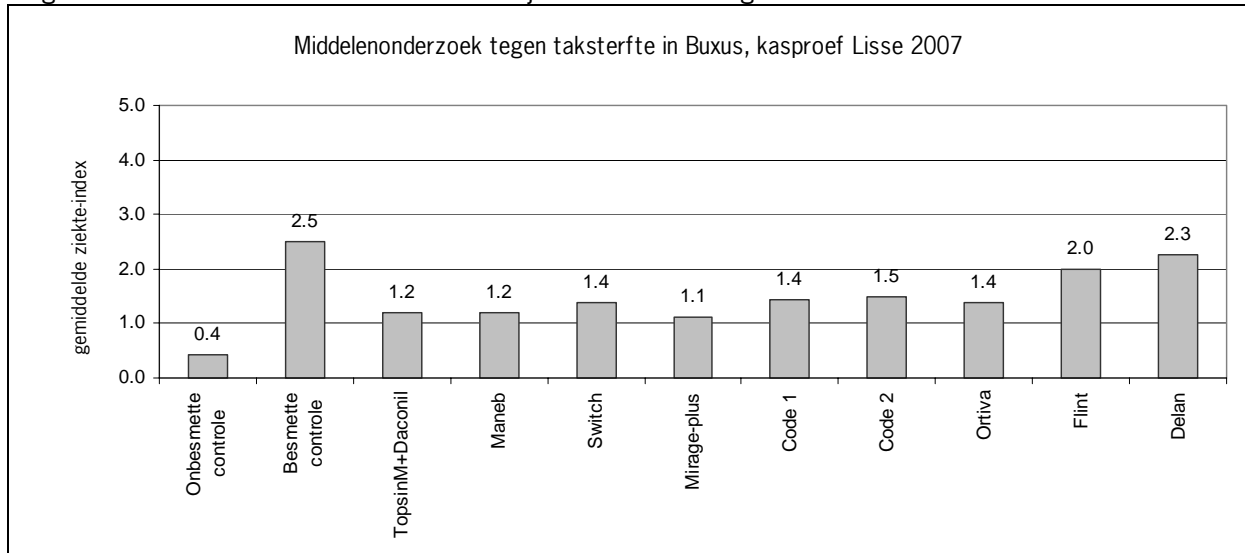
- 0 = geen symptomen
- 1 = twijfelachtig, lichte aantasting
- 2 = duidelijke taksterfte
- 3 = uitgebreide taksterfte (lokaal)
- 4 = taksterfte door de gehele plant
- 5 = ernstige taksterfte door de gehele plant, bladval

Tabel 3. Behandelingschema kasproef 2007.

Beh	code	behandeling	actieve stof	Dosering
1	O	Onbesmette controle	-	-
2	+VC	Besmette controle	-	-
3	S	TopsinM+Daconil	thiofanaat-methyl+chloorthalonil	0.14% + 0.3%
4	R	Maneb-brabant	maneb	0.3%
5	A	Switch	cyprodinil+fludioxonil	0.1%
6	B	Mirage-plus	folpet+prochloraz	0.18% *
7	C	Code 1	-	0.15%
8	D	Code 2	-	0.19%
9	E	Ortiva	azoxystrobin	0.1%
10	F	Flint	trifloxystrobin	0.0125%
11	G	Code 3	-	0.1%

## Resultaten en discussie

Figuur 3. Gemiddelde ziekte-index in Buxus bij de eindbeoordeling.



De middelen zijn getest op hun preventieve werking. De planten waren een dag eerder bespoten, voorafgaand aan de kunstmatige besmetting. Figuur 3 laat zien dat de ziekte niet goed is aangeslagen, ondanks het creëren van voor de schimmel gunstige omstandigheden. Het lijkt dat de klimaatomstandigheden van een kas ongunstig zijn voor een uitbreiding van taksterfte in Buxus. Toch waren er wel aantoonbare verschillen.

Opvallend was dat bij een eenmalige bespuiting geen van de middelen de ziekte kon voorkomen. Middelen die een redelijk goed werking gaven waren: TopsinM+Daconil, maneb, Switch, Mirage Plus, code 1, code 2 en Ortiva.

De middelen Flint en code 3 hadden in deze proef nauwelijks een werking tegen taksterfte.

### Conclusie kasproef 2007

- De middelen TopsinM+Daconil, maneb, Switch, Mirage Plus en Ortiva hadden een redelijke preventieve werking tegen *C. buxicola*.
- Twee experimentele middelen hadden ook een redelijke preventieve werking tegen *C. buxicola*.
- Uitbreiding van taksterfte in Buxus in de kas blijkt moeilijk te realiseren. Waarschijnlijk is het klimaat te droog. Het uitvoeren van een middelenproef kan beter onder veldomstandigheden worden uitgevoerd.

### Veldproef Proeftuin Boskoop, uitgevoerd door PPO

In Boskoop was de proef opgezet als blokkenproef, bestaande uit 4 blokken en 10 behandelingen. De behandelingen zijn binnen de blokken verloot. Er is gebruik gemaakt van plantgoed (ca. 20 cm hoog) van *Buxus sempervirens*. De planten zijn half april geplant op het proefveld. Per veldje zijn 40 planten geplant in 4 rijen van 10 planten. Dit bruto veldje was 1 bij 2 meter groot. Tussen de veldjes was er 50 cm ruimte. Alleen de middelste 12 planten werden steeds beoordeeld. Iedere 2 weken zijn de planten beoordeeld op aantasting volgens onderstaande index:

- 0 = geen symptomen
- 1 = twijfelachtig, zeer lichte aantasting (enkele bladplek per plant)
- 2 = lichte aantasting (meerdere bladplekken per plant)
- 3 = duidelijke taksterfte (meerdere bladplekken per plant; lichte bladval)
- 4 = uitgebreide taksterfte (veel bladplekken per plant; zware bladval)
- 5 = gehele plant is aangetast (plant is bijna kaal van bladval)

In totaal zijn 9 bespuitingen uitgevoerd; eerst 2-wekelijks; vanaf 31-7 wekelijks. Er is gespoten met omgerekend 1000 liter/ha.

De werking van de te testen middelen werd vergeleken met de werking van twee gangbare combinaties, namelijk TopsinM+Daconil (S) en mancozeb+Ortiva(R) en met een onbehandelde controle (O). De behandelingen met de te testen middelen en hun doseringen zijn aangegeven met de lettercodes A tot en met G in tabel 4.

Tabel 4. Behandelingschema veldproef in Boskoop, 2007

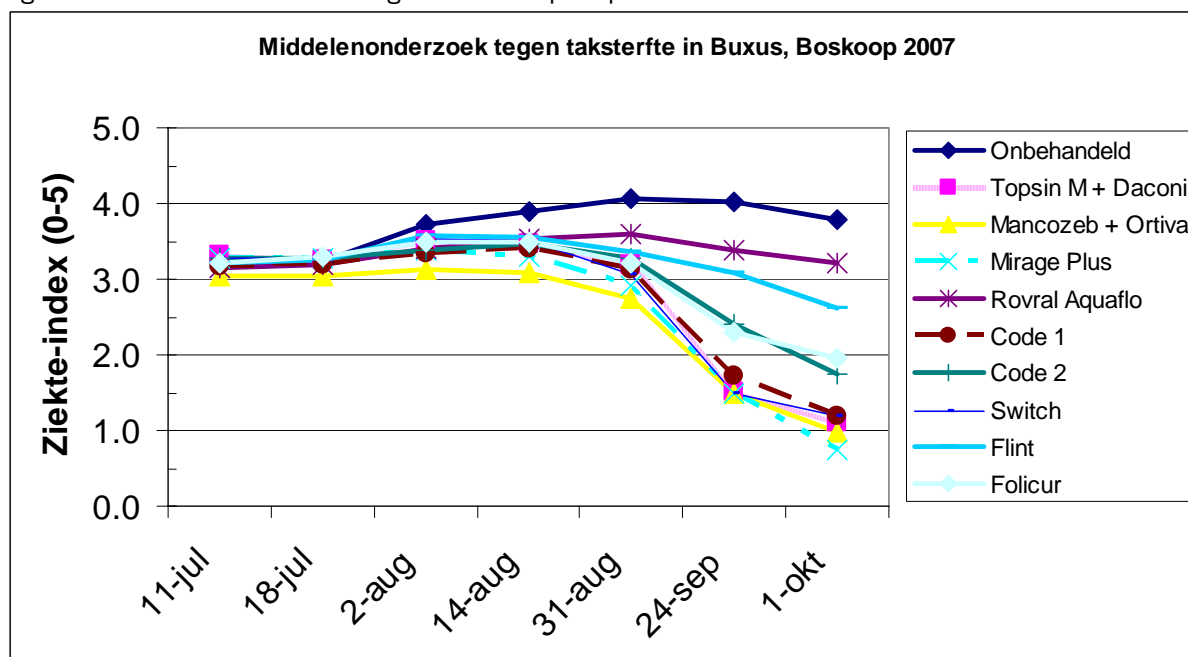
Beh	code	behandeling	actieve stof	Dosering
1	O	Onbehandelde Controle	water	-
2	S	TopsinM+Daconil	thiofanaat-methyl+chloorthalonil	0.14%+0.3%
3	R	Mancozeb+Ortiva	mancozeb+azoxystrobine	0.48 %+0.1%
4	A	Mirage-plus	folpet+prochloraz	0.18 %*
5	B	Rovral aqua flo	iprodon	0.2%
6	C	Code 1	-	0.15%
7	D	Code 2	-	1.5 kg/ha
8	E	Switch	cyprodinil en fludioxonil	0.1%
9	F	Flint	trifloxystrobin	0.0125%
10	G	Folicur	tebuconazool	0.1%

#### Ziektedruk

Om de kans op een succesvolle proef te vergroten is gezorgd voor een verhoogde ziektedruk. In het geplante plantgoed is in 2006 bij de kweker van herkomst een aantasting door *Cylindrocladium buxicola* geconstateerd. Daarnaast zijn op 13 juni 2007 in het proefveld met *Cylindrocladium buxicola* aangetaste bladeren verspreid tussen de planten in alle veldjes. Deze bladeren zijn verzameld op een praktijkperceel, waarin zware aantastingen voorkwamen. Per veldje is 0,6 liter aangetast materiaal aangebracht.

#### Resultaten en discussie

Figuur 4. Gemiddelde ziekte-index gedurende de proefperiode in Buxus.



Vanaf de eerste waarneming op 11 juli was de gemiddelde ziektedruk al behoorlijk hoog. De middelen zijn dus getest onder 'zware omstandigheden'. Pas eind augustus waren er verschillen tussen de behandelingen te zien. Er waren toen al 7 bespuitingen geweest.

Bij sommige behandelingen bleven de nieuw gevormde bladeren vrij van bladvlekken. Bij de eindbeoordeling kon een groep middelen worden onderscheiden die een goede werking hadden: Mirage Plus, Mancozeb+Ortiva, TopsinM+Daconil en code 1 (een niet toegelaten middel). De middelen Folicur en code 2 (een niet toegelaten middel) hadden een redelijke werking. De middelen Rovral en Flint hadden nauwelijks werking tegen *C. buxicola*.

#### Conclusies veldproef Boskoop 2007

- De proef is uitgevoerd bij een hoge ziektedruk. De middelen Mirage Plus, Mancozeb+Ortiva, TopsinM+Daconil en code 1 (een niet toegelaten middel) lieten een goede werking zien.
- De middelen Folicur en code 2 (een niet toegelaten middel) hadden een redelijke werking.
- De middelen Rovral en Flint hadden nauwelijks werking tegen *C. buxicola*.

#### Veldproef Praktijk Buxusperceel Tienray, uitgevoerd door Lucel

In Tienray was de proef opgezet als blokkenproef, bestaande uit 4 blokken en 9 behandelingen. De behandelingen zijn binnen de blokken verloot.

De proef is uitgezet op een praktijkperceel met bollen van *Buxus sempervirens*. De planten stonden voor het tweede jaar op het proefveld. Elk veldje bestond uit 36 planten, in 3 rijen van 12 planten. Alleen de middelste rij van 10 planten werden steeds beoordeeld.

In totaal zijn 8 bespuitingen uitgevoerd. Er is gespoten met omgerekend 800 liter/ha.

Tussen 28-8 en 11-9 bleek dat de planten in Tienray anders beoordeeld werden dan in Boskoop. Een vergelijkbare aantasting kreeg een lager indexcijfer. Daarop is de index aangepast en specifiek gemaakt:

0 = geen symptomen

1 = 1 - 5 bladeren met bladvlekken per plant

2 = 6 - 15 bladeren met bladvlekken per plant

3 = 16- 50 bladeren met bladvlekken per plant; 1e bladval/stukjes kale tak

4 = > 50 bladeren met bladvlekken per plant; duidelijke bladval

5 = Plant heeft veel bladvlekken; > 25 % van de plant is kaal

De werking van de te testen middelen werd vergeleken met de werking van twee referentiemiddelencombinaties, namelijk TopsinM+Daconil (S) en mancozeb+Ortiva (R) en met een onbehandelde controle (O). De behandelingen met de te testen middelen en hun doseringen zijn aangegeven met de lettercodes A tot en met F in tabel 5.

Tabel 5. Behandelingsschema veldproef in Tienray, 2007

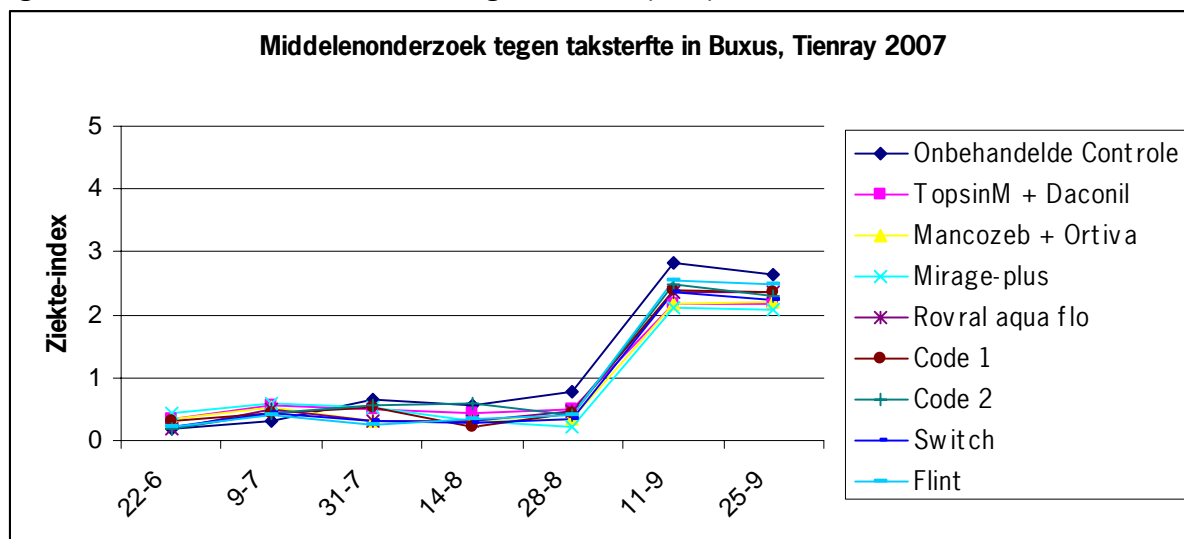
Beh	code	behandeling	actieve stof	Dosering
1	O	Onbehandelde Controle	-	-
2	S	TopsinM+Daconil	Thiofanaat-methyl+chloorthalonil	0.14%+0.3%
3	R	Mancozeb+Ortiva	Mancozeb+azoxystrobine	0.48 %+0.1%
4	A	Mirage-plus	Folpet+prochloraz	0.18%*
5	B	Rovral aqua flo	iprodion	0.2%
6	C	Code 1	-	0.15%
7	D	Code 2	-	1.5 kg/ha
8	E	Switch	cyprodinil en fludioxonil	0.1%
9	F	Flint	trifloxystrobin	0.0125%

#### Ziektedruk

In het perceel is in 2006 een aantasting door *Cylindrocladium buxicola* geweest. Er is uitgegaan van voldoende ziektedruk in het perceel omdat het een doorgaande teelt is.

## Resultaten en discussie

Figuur 5. Gemiddelde ziekte-index in Buxus gedurende de proefperiode.



De ziekte-ontwikkeling kwam in deze proef pas vanaf eind augustus op gang. Op 11 september, toen er al 6 bespuitingen waren geweest, was de gemiddelde ziekte-index gestegen tot index 3. De gemiddelde aantasting was bij de onbehandelde controle weliswaar steeds iets hoger, maar dat waren geen aantoonbare verschillen. Geen enkele behandeling kon de aantasting op een laag niveau houden. Niet duidelijk is waarom geen enkel middel een werking liet zien. Misschien dat de middelen niet voldoende doordrongen in de Buxusbollen. Het spuitvolume was in deze proef 800 l/ha. Het spuitvolume in de veldproef in Boskoop was 1000 l/ha. Verder was het plantmateriaal in Boskoop kleiner. Waarschijnlijk was in Tienray de bedekking van de Buxusplanten met spuitvloeistof en dus middel onvoldoende om een werking te laten zien.

### Conclusies praktijkproef Tienray, 2007

- Geen enkel middel kon de Buxusbollen vrij houden van *C. buxicola*.
- Misschien dat het spuitvolume van 800 l/ha voor Buxusbollen te gering was en daardoor de middelen niet goed konden worden getest.

#### 4.2.4 Middelenonderzoek tegen *Cylindrocladium buxicola*, in 2008.

In 2008 is het middelenonderzoek tegen taksterfte in *Buxus sempervirens* voortgezet. Op de proeflocatie Boskoop is een veldproef uitgevoerd. De proef werd relatief laat uitgevoerd, van september tot november 2008 omdat er tot medio augustus nauwelijks aantasting was in het Buxusperceel. Er zijn om de 10 dagen 6 bespuitingen uitgevoerd. Spuitvolume was 1000 l/ha. De proef is uitgevoerd in 4 herhalingen. De ziektegraad per plant is uitgevoerd volgens een ziekte-index:

- 0 = geen symptomen
- 1 = twijfelachtig, zeer lichte aantasting
- 2 = lichte aantasting
- 3 = duidelijke taksterfte
- 4 = uitgebreide taksterfte
- 5 = gehele plant is aangetast



Tabel 6. Behandelingschema veldproef in Boskoop.

Beh. nr.	code	behandeling	actieve stof	dosering
1	O	Onbehandelde Controle	-	-
2	S1	TopsinM+Daconil	thiofanaat-methyl+ chloorthalonil	0.14%+0.3%
3	S2	Mirage plus	folpet/prochloraz	0.35%
4	S3	Mirage plus+Bond	folpet/prochloraz	0.35%+0.1%
5	A	Daconil+Ortiva	chloorthalonil+azoxystrobin	0.3%+ 0.1%
6	B	Switch	cyprodinil/ fludioxonil	0.1%
7	C	Zwavel	zwavel 80%	0.4%
8	D	Enzicur+Addit	lactoperoxidase+kaliumjodide en kaliumthiocyanaat	0.15%+0.25%
9	E	Code 1	-	0.05 %
10	F	Code 2	-	0.1%

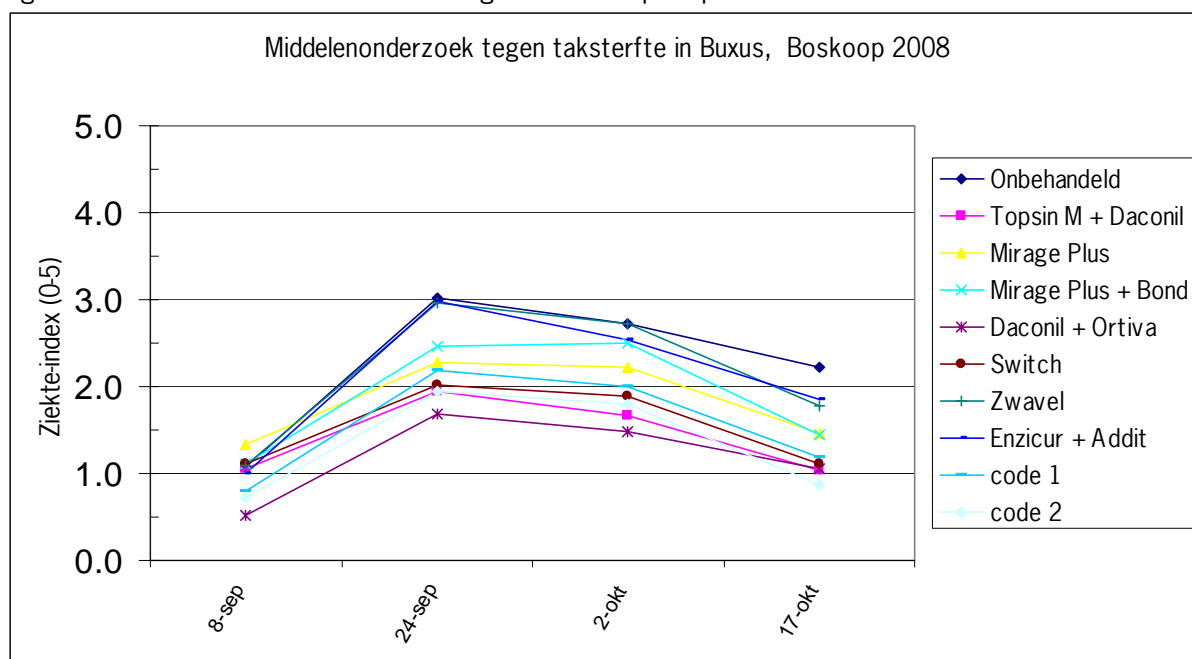
### Resultaten en discussie

De resultaten zijn weergegeven in tabel 7 en figuur 6.

Tabel 7. Gemiddelde ziekte-index gedurende de proef, Boskoop 2008.

	8-sep	24-sep	2-okt	17-okt
Onbehandeld	1.1	3.0	2.7	2.2
Topsin M + Daconil	1.1	1.9	1.7	1.0
Mirage Plus	1.3	2.3	2.2	1.5
Mirage Plus + Bond	1.1	2.5	2.5	1.4
Daconil + Ortiva	0.5	1.7	1.5	1.1
Switch	1.1	2.0	1.9	1.1
Zwavel	1.1	3.0	2.7	1.8
Enzicur + Addit	1.0	3.0	2.5	1.9
code 1	0.8	2.2	2.0	1.2
code 2	0.7	1.9	1.8	0.9

Figuur 6 Gemiddelde ziekte-index in Buxus gedurende de proefperiode.



Begin september was de aantasting nog gering, bladvlekken waren verspreid over het perceel aanwezig. Op 24 september waren de verschillen tussen de behandelingen het grootst. Geen van de behandelingen kon uitbreiding van *C. buxicola* voorkomen. Later nam bij alle behandelingen de gemiddelde ziekte-index iets af, maar dat was ook het geval bij de onbehandelde controle. Op 17 oktober waren er geen aantoonbare verschillen meer tussen de behandelingen. Gebaseerd op de waarnemingen van 24 september bleek Daconil+Ortiva een redelijk goede werking te hebben. De middelen TopsinM+Daconil, code 2 (niet toegelaten middel), Switch, code 1 (niet toegelaten middel), Mirage Plus en Mirage Plus+Bond hadden een redelijke tot matige werking. De toevoeging van de hulpstof Bond als hechter had in deze proef geen effect op de werking van Mirage Plus tegen taksterfte in Buxus. Zwavel en Enzicur+Addit bleken geen werking te hebben tegen *C. buxicola*.

#### Conclusie veldproef Boskoop, 2008

- Aantasting was erg laat in 2008
- De mix van Daconil+Ortiva had een redelijk goede werking tegen *C. buxicola*.
- De mix TopsinM+Daconil, code 2 (niet toegelaten middel), Switch, code 1 (niet toegelaten middel), Mirage Plus en Mirage Plus+Bond hadden een redelijke tot matige werking.
- Zwavel en Enzicur+Addit bleken geen werking te hebben tegen *C. buxicola*.
- Een effect van de hulpstof Bond is niet gevonden.

#### 4.2.5 Middelenonderzoek tegen *Cylindrocladium buxicola*, in 2009.

Bij een aantasting van *Cylindrocladium* blijkt veelvuldig spuiten met chemische middelen noodzakelijk om het probleem te beheersen. In de praktijk zijn er verschillende bestrijdingstrategieën in gebruik. Er kan gekozen worden voor een puur preventieve of een aanpak waarop eerst gewacht wordt tot de eerste bladvlekken zichtbaar zijn. Mirage Plus wordt in de praktijk veelvuldig gebruikt bij de eerste zichtbare verschijnselen van *C. buxicola*. Volgens het etiket mag het middel maximaal 4 maal per groeiseizoen worden gespoten. Ook uit het oogpunt van resistentiemanagement is het verstandig om niet te vaak eenzelfde middel te gebruiken.

Doel van deze middelenproef is te bepalen welke bestrijdingstrategieën taksterfte in Buxus afdoende kunnen bestrijden.

In 2009 van april tot en met oktober is een veldproef uitgevoerd op de proeflocatie Boskoop. Zes bestrijdingsstrategieën zijn getoetst op hun werking tegen taksterfte. Elke strategie is in 4 herhalingsveldjes uitgevoerd. Er waren ook onbehandelde controleveldjes. In totaal bestond de proef uit 28 veldjes.

#### Proefgegevens veldproef, Boskoop 2009

Hoewel in de praktijk veelal met een spuitboom wordt gewerkt is er in deze proef gebruik gemaakt van een spuitstok (3 bar) met werveldop. De reden voor deze keuze is dat het gewas beter aan de onder- en zijkant geraakt wordt met de spuitvloeistof. Er is gespoten met een spuitvolume van 1000 l/ha. De bespuitingen zijn begin mei 2009 gestart, afhankelijk van de behandeling. Afhankelijk van de strategie zijn 3 - 10 bespuitingen uitgevoerd. De proefvelden zijn wekelijks bekeken. Daarbij lag de focus vooral op het vinden van een aantasting door *Cylindrocladium*. De proef is uitgevoerd in 2 jarige bosjes *Buxus sempervirens*, ongeveer 10 stuks/m<sup>2</sup>. De Buxusplanten zijn volgens praktijkomstandigheden gekweekt.

Bij het uitvoeren van de eindwaarnemingen, half oktober, zijn er 10 Buxusstruiken beoordeeld. De struiken stonden in het midden van een proefveld.

Tabel 8 Behandelingschema veldproef Boskoop 2009.

A	'Preventief stroburelinen + contactmiddellen' (strategie A)
B	'Preventief contactmiddellen' (strategie B)
C	'Preventief contactmiddellen + hechter' (strategie C)
D	'Preventief / curatief' (strategie D)
E	'Strategie Buxusteler (strategie E)
F	'Curatief' (strategie F)

### Strategie A

Starten met een strobilurine met vooral een preventieve werking. Afwisselen met contactmiddelen. Maximaal 4 x strobilurine vanwege resistentie. Ongeacht aantasting, om de week spuiten (spuitinterval 2 weken), 10 bespuitingen: Ortiva; Ortiva; maneb; maneb; Daconil; Daconil; Ortiva; Ortiva; maneb; maneb.

### Strategie B

Spuiten met alleen contactmiddelen. Ongeacht aantasting, om de week spuiten (spuitinterval 2 weken), 10 bespuitingen: *captan, captan, maneb, maneb, captan, captan, maneb, maneb, captan, captan*.

### Strategie C

Als strategie B, spuiten met alleen contactmiddelen, maar met toevoeging van een hechter (Prolong).

### Strategie D

Inzetten van preventief contactmiddel. Bij lichte aantasting direct curatief middel inzetten met een korte interval. Ter afwisseling Daconil gebruiken.

Bespuiting 1: Flint; Bespuiting 2: Flint (na 2 weken); Bij aantasting: Bespuiting 3: Switch; Bespuiting 4: Switch (na 1 week); Bespuiting 5: Flint (na 2 weken); Bij aantasting: Bespuiting 6: Switch; Bespuiting 7: Switch (na 1 week); Bespuiting 9: Daconil (na 2 weken).

### Strategie E

Bespuitingen volgens strategie van Buxusteler (lid van de begeleidingscommissie). In deze strategie zijn uiteindelijk alleen maneb en captan afwisselend toegepast. Eenmaal is ingegrepen met Mirage Plus. Aan de bespuitingen is de hulpstof Codacide toegevoegd.

### Strategie F

Bij lichte aantasting direct curatief middel inzetten met een korte interval. Ter afwisseling het contactmiddel maneb gebruiken. Start bespuitingen: bij waarneming lichte aantasting.

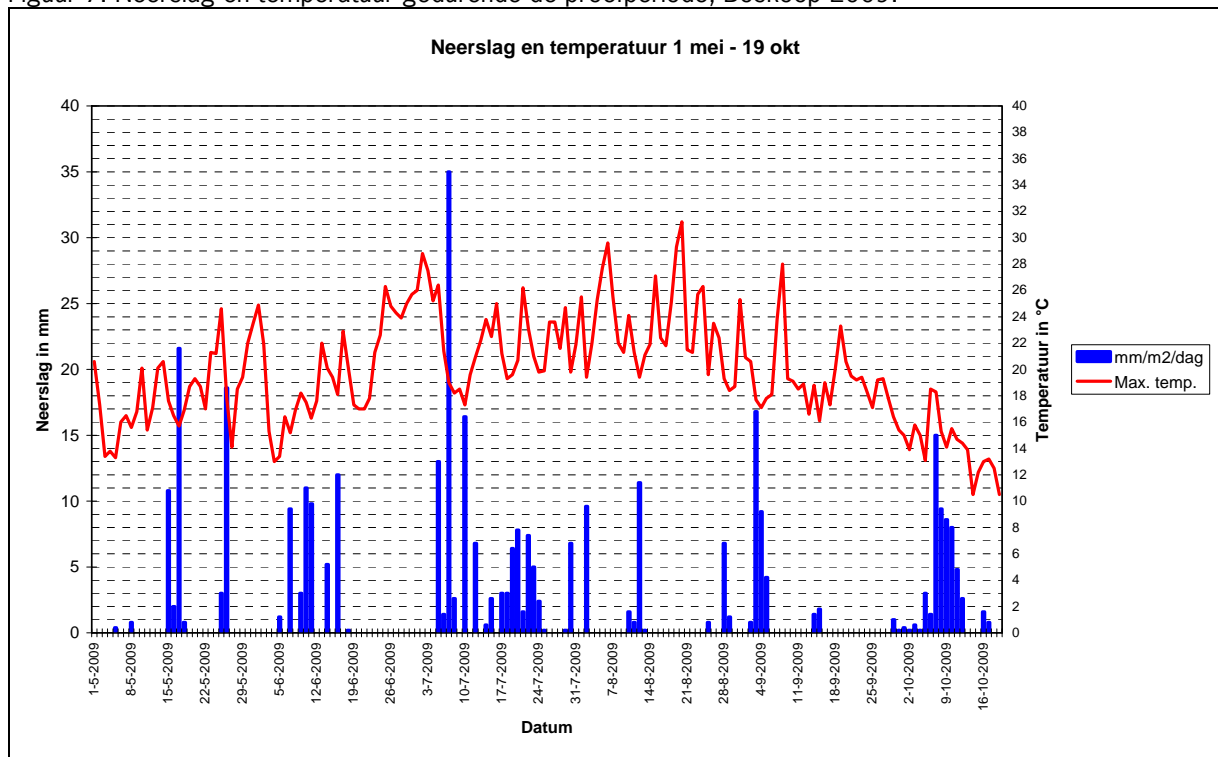
Bespuiting 1: Mirage Plus; Bespuiting 2: Mirage Plus (na 1 week); Bespuiting 3: maneb (na 1 week); Herhalen van dit schema als aantasting zich uitbreidt, maximaal 4 x Mirage Plus; Bespuiting 4: Mirage Plus; Bespuiting 5: Mirage Plus (na 1 week); Bespuiting 6: maneb (na 1 week); als aantasting zich uitbreidt; Bespuiting 4: Ortiva+Daconil; Bespuiting 5: Ortiva+Daconil (na 1 week); Bespuiting 6: maneb (na 1 week).

### Resultaten en discussie

De aanwezigheid van *Cylindrocladium* is vastgesteld en de infectiedruk is bepaald door het aantal geïnfecteerde bladen per plant te tellen. In het oorspronkelijke proefplan stond dat er geen actieve besmetting uitgevoerd zou worden. De verwachting was dat dit op natuurlijke wijze zou plaatsvinden. Door geen actieve besmetting uit te voeren zou er een goede parallel zijn met de omstandigheden die in de praktijk heersen. Echter, een spontane aantasting in het veld bleef uit. De lokale weersomstandigheden waren waarschijnlijk ongunstig voor een sterke toename van de ziekte. Ook op kwekerijen in Boskoop werd weinig taksterfte aangetroffen. Er is in overleg met de begeleidingscommissie van het onderzoek besloten toch actief te gaan besmetten. Ongeveer een maand voor de laatst geplande bespuiting is er besmet materiaal (In de vorm van afgevallen droog blad) evenredig over alle proefvelden verspreid. De velden zijn in die periode ook intensief beregend.

Uitbreiding van *C. buxicola* in *Buxus* is sterk afhankelijk van weersomstandigheden. In figuur 7 is de natuurlijke neerslag en maximaal gerealiseerde dagtemperatuur weergegeven. De weersomstandigheden waren op zich gunstig voor een aantasting door *C. buxicola*. Toch bleef aantasting in het proefveld uit.

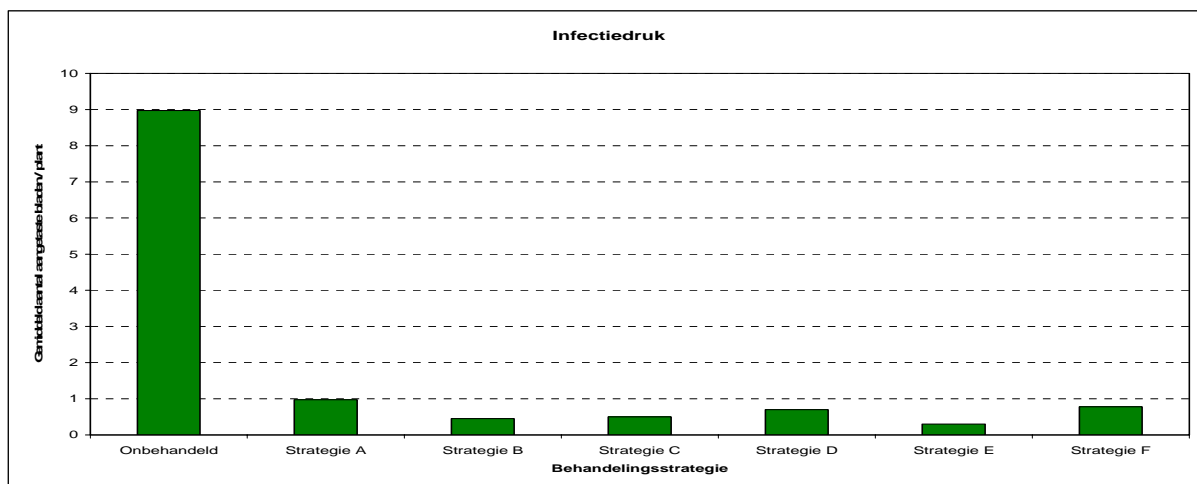
Figuur 7. Neerslag en temperatuur gedurende de proefperiode, Boskoop 2009.



Ook het toevoegen van ziek bladmateriaal en het intensief beregenen vanaf 26 augustus 2009 van het proefveld zorgde niet voor een sterke uitbreiding van de ziekte. Bij de eindbeoordeling bleek bijvoorbeeld dat niet alle onbehandelde planten waren aangetast, maar slechts 82% van alle planten. Het percentage aangetaste planten bij de andere behandelingen A, B, C, D, E en F waren wel veel lager, respectievelijk 32, 20, 15, 15, 15 en 25 procent. Niet duidelijk is waarom de aantasting zich niet explosief uitbreidde ondanks de gunstige omstandigheden voor de schimmel, in ieder geval bij onbehandeld.

Uit de proef kunnen wel conclusies worden getrokken. Het verschil in aantasting tussen onbehandeld en de andere behandelingen was wel aantoonbaar. Niet alleen het gemiddelde percentage aangetaste planten per veldje was verschillend, maar ook het gemiddeld aantal aangetaste bladeren per plant was verschillend. Bij onbehandeld waren er meer bladeren per aangetaste plant aangetast dan bij de andere behandelingen, zie figuur 8.

Figuur 8. Weergegeven is het gemiddeld aantal aangetaste bladeren per plant voor de verschillende strategieën.



Figuur 8 laat zien dat bij de eindbeoordeling de aantasting bij alle strategieën laag was. Alle strategieën verschilden aantoonbaar met onbehandeld. Tussen de strategieën onderling waren geen aantoonbare verschillen.

De planten werden wekelijkse beoordeeld op aanwezigheid van bladplekken om te bepalen wanneer er tot actie overgegaan moest worden bij de curatieve behandelingen (strategie 'D' en 'F'). Op 4 juni werden in 2 veldjes van strategie D een paar bladplekken aangetroffen. Lichte aantasting, 5 aangetaste bladen in veld 4D en zeer lichte aantasting, 1 aangetast blad in veld D1.



Afbeelding 12: Aantasting vastgesteld in veld 4D op 4 juni 2009.



Afbeelding 13: Aantasting vastgesteld in veld 1D op 4 juni 2009.

Op 22 juli werd in veld 4D een lichte aantasting gevonden, 6 bladeren met bladplekken en een zeer lichte aantasting in veld D1, 1 bladplek. De aantasting werd bij strategie D dus goed onder controle gehouden.

Op 22 juni werd in 2 veldjes van strategie F een zeer lichte aantasting gevonden, 1 aangetast blad in het veldje. Op 14 september was er in alle 4 veldjes van strategie F een zeer licht tot lichte aantasting.

Er zijn geen fytoxische reacties waargenomen. Behandeling B zorgde voor residu op het blad. Over het effect van de hulpstof Prolong kan in deze proef geen uitspraak worden gedaan, daarvoor was de aantasting in behandeling B en C te laag. Prolong zorgde er wel voor dat er geen spuitresidu achterbleef op de Buxusbladeren.

Uitsluitend op basis van de resultaten van de eindbeoordeling is er geen verschil tussen de verschillende strategieën.

De ervaring is wel dat een infectie moeilijk is te onderdrukken met middelen. Het voorkomen van infectie door gebruik te maken van preventieve middelen is aan te raden. De resultaten van de combinatie preventief, elke 2 wekenspuiten met afwisselend captan en maneb (strategieën B, C en E) waren goed.

#### Conclusies veldproef 2009

- Alle gehanteerde strategieën konden voorkomen dat er een ernstige aantasting door *Cylindrocladium* in Buxus optrad.
- Een infectie bleek moeilijk te bestrijden met 2 bespuitingen met Switch kort achter elkaar.
- 2 bespuitingen kort achter elkaar met Mirage Plus bleek *Cylindrocladium* goed te bestrijden.

#### 4.2.6 Algemene conclusies middelenonderzoek

Afgelopen jaren is in zowel Nederland als in het buitenland onderzoek gedaan naar de werking van gewasbeschermingsmiddelen tegen *Cylindrocladium buxicola*. De middelen blijken vooral preventief te werken, dus voordat er een duidelijk aantasting in het Buxusgewas zichtbaar is. Als tijdig wordt ingegrepen is bestrijding van deze ziekte goed mogelijk.

De volgende middelen hebben een goede tot redelijke werking tegen de schimmel laten zien:

- Mirage Plus (folpet/prochloraz)
- TopsinM vloeibaar (thiofanaat-methyl) (toelating tot 14 juni 2009) + Daconil (chloorthalonil)
- Switch (cyprodinil/ fludioxonil)
- Ortiva (azoxystrobine)
- Kenbyo (kresoxim-methyl)
- Flint (trifloxystrobin)
- Folicur (tebuconazool)
- Maneb
- Captan
- Code 2 (dit middel zit in de toelatingsprocedure en wordt waarschijnlijk in 2012 toegelaten voor de boomkwekerij)

De weersomstandigheden vóór, tijdens en na een bespuiting hebben grote invloed op het uiteindelijke effect van die bespuiting.

##### Spuitmoment

De middelen tegen *Cylindrocladium* kunnen worden ingedeeld in contact middelen, systemische middelen en een specifieke groep: de strobilurinen.

Contactherbiciden hebben over het algemeen een breed werkingspectrum. De middelen hechten zich aan de buitenkant van het blad en voorkomen kieming en/of het naar binnen groeien van schimmelsporen. Voor een goede werking is snelle hechting van belang. Contactmiddelen moeten daarom worden gespoten op droog blad en bij drogend weer. Een goede bedekking van het blad is ook van belang. Niet geraakte delen en nieuw aangegroeide delen van de plant zijn onbeschermd. Voorbeelden van contactmiddelen zijn: captan, maneb, Daconil.

Systemische middelen worden opgenomen door de plant en kunnen zich verplaatsen in de plant. Schimmeldraden die binnen dringen in de plant worden gedood door het middel. Systemische middelen kunnen het beste bij groeizaam weer worden gespoten bij niet al te hoge temperaturen en niet bij zogenaamd scherp weer. Voorbeelden van systemische middelen zijn: TopsinM, Mirage Plus, en Switch.

Strobilurinen worden vastgelegd in de waslaag van het blad. Deze middelen hebben een lange werking. Nadeel is dat de strobilurinen gevoelig zijn voor resistentie. Om die reden moeten deze middelen worden afgewisseld met middelen uit de andere groepen. Voorbeelden van strobilurinen zijn: Kenbyo, Ortiva en Flint.

De spuittechniek is een aandachtspunt bij deze schimmelziekte. In een dicht gewas als Buxus valt de indringing van het middel vaak tegen. Daarom is het verstandig om met veel water te spuiten en het liefst van twee kanten door bijvoorbeeld heen en terug te rijden.

##### Bestrijdingstrategie

Gebaseerd op de ervaringen die in dit project zijn opgedaan in de middelenproeven kunnen, anno eind 2009, de volgende adviezen worden gegeven:

Controleer het Buxusgewas wekelijks op aantasting

Blijf alert zolang het gewas groeit

Bij geen aantasting en droog weer, elke 2 à 3 weken preventief spuiten

Bij geen aantasting en nat weer, elke 10 dagen

Bij aantasting wekelijks en bij lange bladnatperioden om de 5 dagen

Bij de eerste bladvlekjes werken de volgende middelen goed: Mirage Plus en Switch. N.B. beide middelen kunnen op jong schot iets remmend werken.

Preventief, dus voordat taksterfte in het gewas zichtbaar is, kunnen de volgende middelen worden ingezet: maneb, Daconil in combinatie met Ortiva.

Goede resultaten tegen taksterfte zijn ook behaald met toevoegingen aan de spuitvloeistof met maneb, bitterzout of koperbladvoeding.

Wanneer het gewas goed groeit dan hebben Mirage Plus, Switch en Folicur een goede tot redelijke werking. De strobulines Flint of Ortiva hebben een goede werking wanneer het gewas niet al te hard groeit en wanneer het weer niet gunstig is voor contactmiddelen.

Het is verstandig om met veel water te spuiten 1000 l/ha.

Uit het onderzoek zijn voldoende middelen naar voren gekomen die gebruikt kunnen worden tegen taksterfte in Buxus. Daarbij komen ook nieuwe middelen op de markt, bv. Spirit (folpet/ tebuconazool) met potentie tegen deze ziekte. In het vervolgonderzoek zal meer aandacht worden gegeven aan bestrijdingstrategieën. Het huidige kalenderspuiten kan dan vervangen worden door weersafhankelijk te spuiten. Dat vermindert de kosten voor Buxustelers en het voorkomt onnodige milieuschade met behoud van teeltzekerheid. In Nederland wordt een waarschuwingsmodel voor *Cylindrocladium* gebruikt dat is gemaakt door bedrijfsadviseurs. Vanuit dit Buxusproject is contact opgenomen met de eigenaars van het model om het te testen in het onderzoek. De eigenaars vonden het niet wenselijk dat het waarschuwingsmodel in het onderzoek zou worden meegenomen.

In Nederland wordt een waarschuwingsmodel voor *Cylindrocladium* gebruikt dat is gemaakt door bedrijfsadviseurs. Vanuit dit Buxusproject is contact opgenomen met de eigenaars van het model om het te testen in het onderzoek. De eigenaars vonden het niet wenselijk dat het waarschuwingsmodel in het onderzoek zou worden meegenomen.

In België, ILVO in samenwerking met PCS is een onderzoek gestart naar taksterfte in Buxus. In dit onderzoek wordt o.a. gekeken of er een betrouwbaar waarschuwingsmodel voor *Cylindrocladium* kan worden ontwikkeld. De onderzoeksinstituten IVO, PCS en PPO hebben regelmatig overleg over de vorderingen in het Buxusonderzoek en het waarschuwingsmodel wordt daarin meegenomen.



## 4.3 Ontsmetting van Buxusstek

Een gezonde start van een Buxusteelt, vrij van *C. buxicola*, kan later in de teelt veel problemen voorkomen. In deze proef zijn stekjes behandeld met ontsmettingsmiddel en met warmwater.

### Doel

Het ontsmetten van stek van Buxus d.m.v. warmwaterbehandeling en ontsmettingsmiddel.

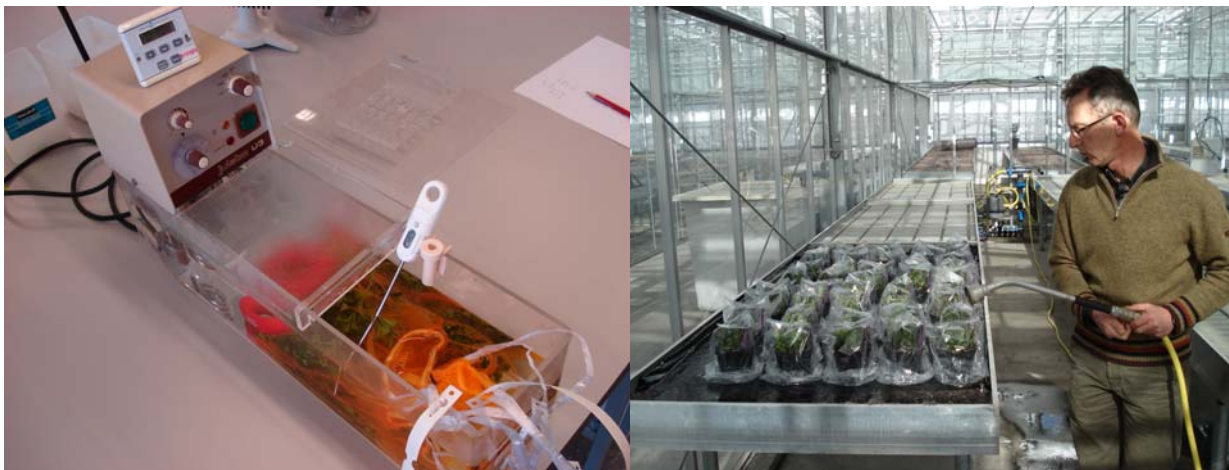
### Uitvoering

Uitgangsmateriaal: stekken van Buxus afkomstig proefveld volle grond DLV Boskoop 2008  
Stekjes werden geknipt op 23 maart 2009. Per behandeling 10 stekken, 4 herhalingen, totaal 400 stekken. Op 24 maart werden de stekjes (uitgezonderd de onbesmette controlebehandeling) kunstmatig besmet met een sporensuspensie  $10^5$  sporen per ml. Stekjes werden op filtreerpapier breed uitgespreid en bespoten met de sporensuspensie van *Cylindrocladium buxicola*, afkomstig van 2 isolaten. De stekjes werden afgedekt met plastic en 1 dag bij kamertemperatuur bewaard om de schimmelsporen de kans te geven om goed te hechten aan de stekjes. Stekjes van behandeling 3 werden eerst afgespoeld met water en daarna met plastic afgedekt.

Tabel 9. Behandelingschema ontsmettingsproef.

nr.	Behandeling
1	controle niet besmet
2	controle besmet
3	controle besmet + naspoelen met kraanwater
4	besmet + 1/2 uur 43° C
5	besmet + 1/2 uur 45° C
6	besmet + 1/2 uur 49° C
7	besmet + 0.25% Jet 5 15 min. + 2 min. naspoelen met kraanwater
8	besmet + 0.5% Jet 5 15 min. + 2 min. naspoelen met kraanwater
9	besmet + 1% Jet 5 15 min. + 2 min. naspoelen met kraanwater
10	besmet + Menno clean 3%, 5 min. + 2 min. naspoelen met kraanwater

10 stekjes van een behandeling werden weggestoken in een 1 liter pot met stekgrond. Daarna werd de pot omhuld met een plastic zakje, voor een hoge luchtvochtigheid. Potten zijn bij 18°C in de kas weggezet.



Abbeelding 14. Temperatuurbehandeling van Buxusstek. Abbeelding 15. Buxusstek weggestoken in containers en omhuld met plastic.

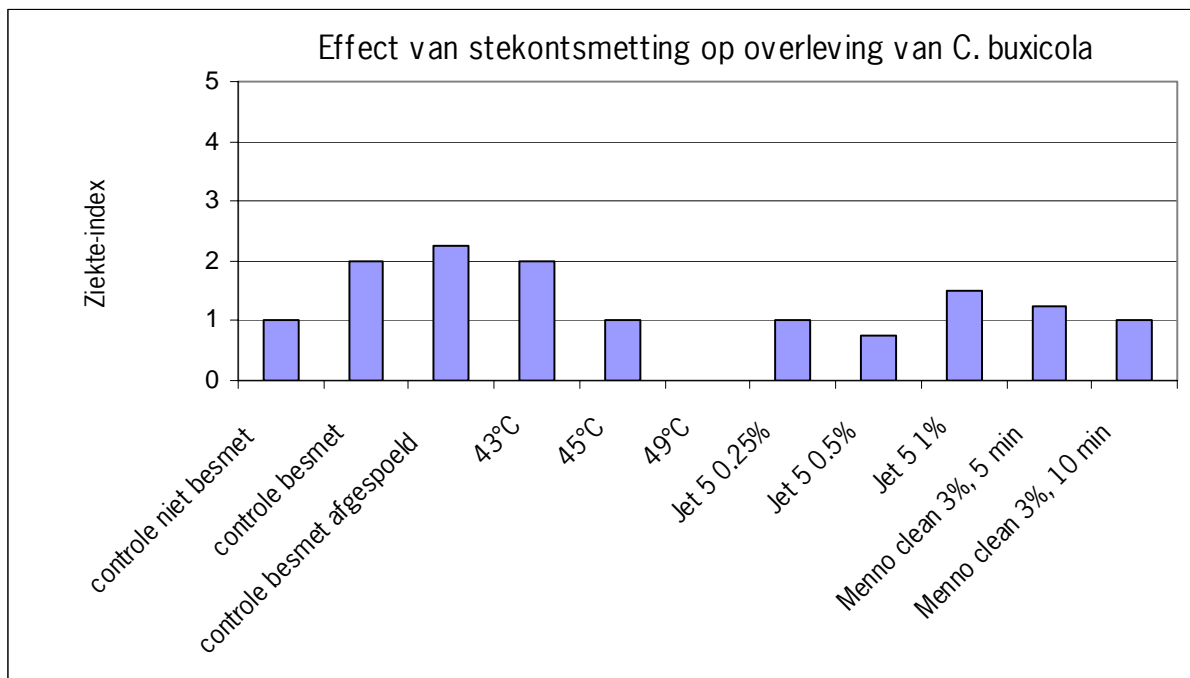
De stekjes werden wekelijks beoordeeld op aantasting en op plantschade ten gevolge van de behandeling. Na 4 weken was de eindbeoordeling.

## Resultaten en discussie

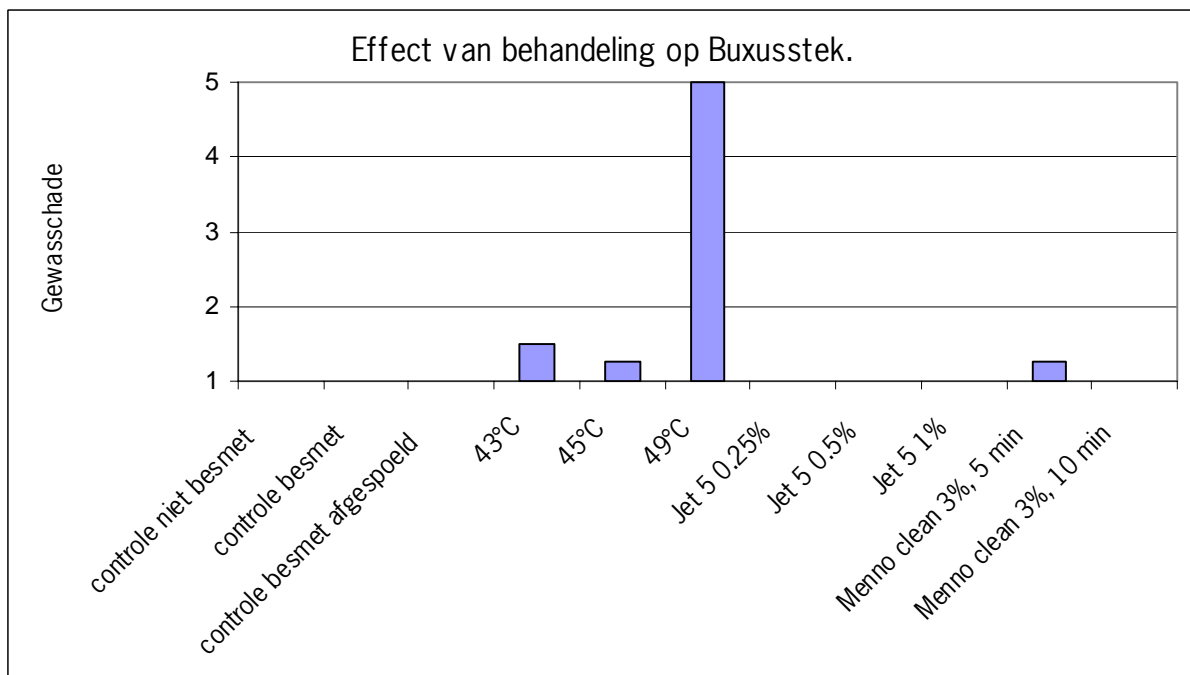
Op 31 maart zagen de stekjes van behandeling 6 (49°C) er slecht uit.

De aantasting van de besmette controlebehandeling verliep niet zoals verwacht. De stekjes raakten niet ernstig aangetast door *C. buxicola*, zie figuur 9. Uiteindelijk werd de ziekte-index niet hoger dan 2. De afgespoelde besmette controlebehandeling werd net zo ziek als de niet afgespoelde controlebehandeling. De gedachte was dat de *Cylindrocladium*sporen van de bladeren zouden kunnen worden weggespoeld. Een effect van afspoen op de aantasting door *C. buxicola* werd niet gevonden. Er was een tendens zichtbaar van afnemende ziekte-index bij toenemende temperatuur. Een half uur de stekjes onderdompelen bij 45°C gaf minder aantasting. 49°C overleefden de Buxusstekjes niet, zie figuur 10. Jet 5 in alle concentraties en Menno clean zorgden voor een lagere ziekte-index en gaven geen of nauwelijks schade.

Figuur 9. Warmwater- en ontsmettingsmiddelbehandeling tegen *C. buxicola* in Buxusstek.



Figuur 10. Gewasschade na warmwater- en ontsmettingsmiddelbehandeling van Buxusstek.



Om de vitaliteit van de stekjes te beoordelen is ook gekeken naar de vorming van nieuwe scheuten. Bij behandeling 6 waren geen nieuwe scheuten gevormd. Bij behandelingen 1, 2 en 5 waren nauwelijks nieuwe scheuten te zien. Bij de andere behandelingen waren veel nieuwe scheuten te zien.

#### Conclusies

- Een warmwaterbehandeling rond de 45°C gedurende een half uur gaf een vermindering van aantasting in Buxusstek. De resultaten geven aan dat vervolgonderzoek met variaties in behandeltijd bij en rond de 45°C zinvol is om een optimale behandeling te vinden.
- Het ontsmetten van Buxusstek dmv een ontsmettingsmiddel biedt perspectieven. Vervolgonderzoek is wenselijk.

. Afbeelding 16a. Behandelingen 1 tot en met 6 op 7 mei 2009.



Afbeelding 16b. Behandelingen 7 tot en met 10 op 7 mei 2009.



#### 4.3.1 Bepaling van voor de schimmel dodelijke temperatuur, labproef.

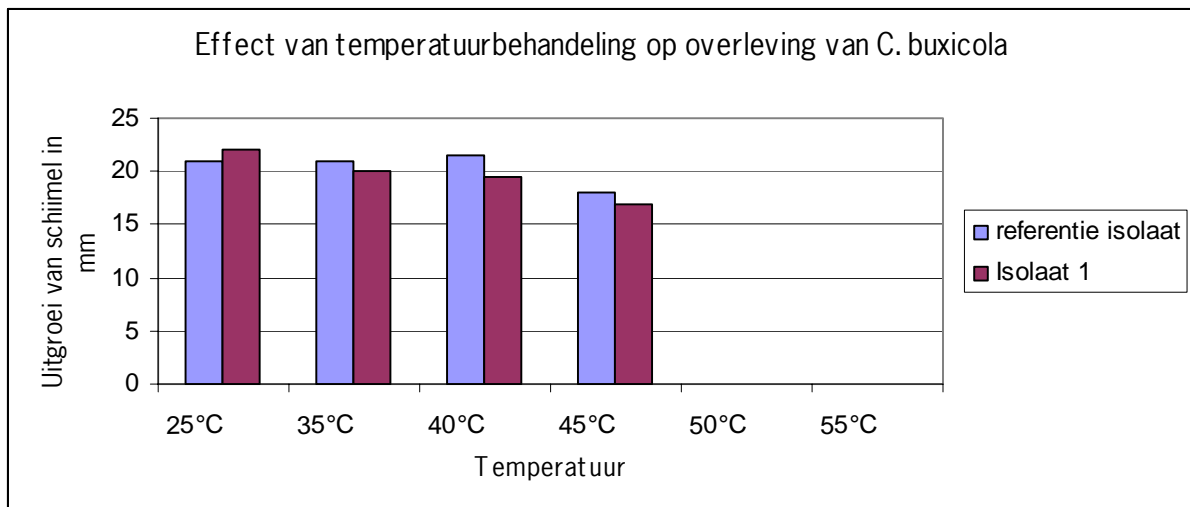
Geïnfecteerd Buxusblad dat nog symptomeloos is bevat geen sporen meer van *C. buxicola*, maar schimmeldraden (-weefsel). Sporen reageren anders op temperatuur dan schimmelweefsel. Om het effect van een warmwaterbehandeling op schimmelweefsel uit te testen is een proef uitgevoerd met schimmelweefsel. Deze proef is een simulatie van ontsmetting van geïnfecteerd Buxusblad.

##### Uitvoering

Er zijn 2 isolaten van *C. buxicola* getest. 1<sup>e</sup> isolaat was de referentiestam, die ook is gebruikt om de Buxusplanten te besmetten in de middenproeven. Het tweede isolaat is afkomstig van een Buxusplant uit een praktijkperceel. De schimmel werd eerst op maltagar overgezet. Na 2 weken groei werden uit de begroeide agarplaten plugjes schimmelweefsel met een diameter van 6 mm gedrukt. De plugjes werden in glasbuizen gedaan aangevuld met steriel water. Deze buizen kregen gedurende 30 minuten een temperatuurbehandeling in het waterbad. Daarna werden de buizen snel afgekoeld naar kamertemperatuur. Vervolgens werden de plugjes uit de buizen gehaald en overgezet op nieuwe malt-agarplaten. In het centrum van de nieuwe platen werd een plugje gelegd. De platen werden geplaatst in een broedstuf bij 25°C. De temperatuur reeks was: 25, 35, 40, 45, 50 en 55°C. Van beide isolaten werden 4 schalen per temperatuur gebruikt. Na een week werd de radiale groei van de schimmel op de platen gemeten, zie fig. 11a. De proef is herhaald bij een nauwere temperatuurreeks: 25, 43, 45, 47 en 49°C, zie figuur 11b.

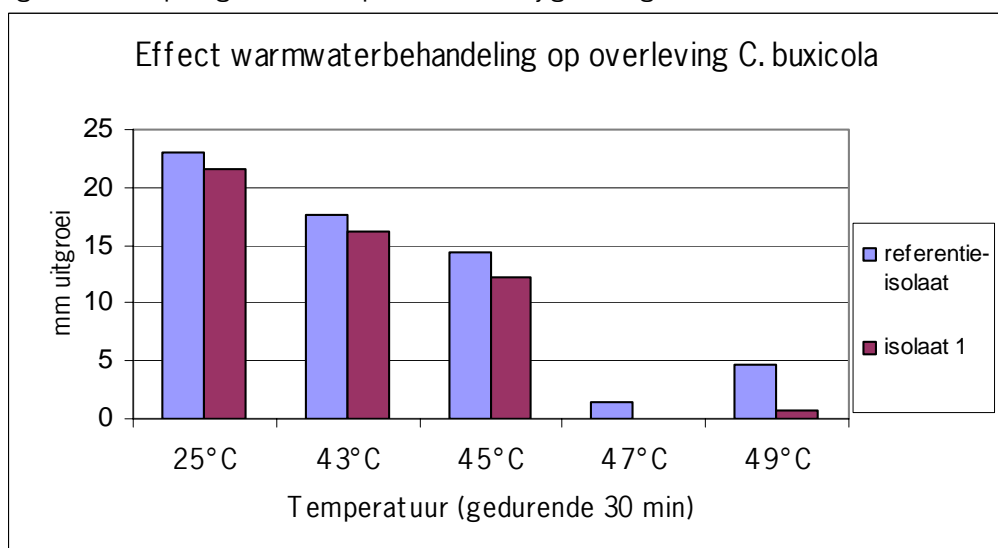
## Resultaten en discussie

Figuur 11a. Bepaling van de temperatuur waarbij geen uitgroei meer is van de schimmel *C. buxicola*.



Figuur 11a laat zien dat de schimmel gedurende 30 minuten een temperatuur van tot 40°C goed verdroeg. Ook bij 45°C was er nog uitgroei van het plugje. Vanaf 50°C werd geen uitgroei meer gezien.

Figuur 11b. Bepaling van de temperatuur waarbij geen uitgroei meer is van de schimmel *C. buxicola*.



Figuur 11b laat zien dat de temperatuurgrens van overleving van de schimmel in de buurt van 46°C ligt. Er was wel wat variatie tussen beide isolaten, het referentie isolaat gaf bij 49°C nog enige groei. In deze proef werden de platen waar geen groei te zien was na 2 weken nog een keer beoordeeld. Er werd geen nieuwe groei geconstateerd bij deze platen. Zetten we deze resultaten tegenover de resultaten van de Buxusstekjes dan lijken er weinig mogelijkheden te bestaan om door middel van warmwaterbehandeling geïnfecteerd Buxusstek te ontsmetten. Buxusstek overleeft 49°C niet en de schimmel kan dan nog overleven. Misschien dat een variatie in behandelingsduur, bv. 1 uur of 2 uur bij een temperatuurrange van 45 - 47°C nog mogelijkheden biedt.

## Conclusies

- De grens tussen het afdoden van *C. buxicola* en de schade voor Buxus liggen dicht bij elkaar. Misschien dat in een proef die grenzen kunnen worden bepaald. Echter, voor de praktijk is het een risicovolle methode.
- Uitwendige ontsmetting met ontsmettingsmiddelen heeft wel mogelijkheden.

## 4.4 Moleculaire Detectie

### 4.4.1 Moleculaire identificatie en detectie van *Cylindrocladium buxicola*.

#### Doel

Het doel van dit onderzoek is het ontwikkelen van een snelle en specifieke toets (PCR toets) om de veroorzaker van taksterfte in Buxus, *Cylindrocladium buxicola* te kunnen identificeren en detecteren. De nadruk ligt vooral op het detecteren van deze schimmel in symptomeloos plantmateriaal.

#### Uitvoering

Buxusbladeren met en zonder symptoom, afkomstig uit een infectieproef (Afbeelding 17 en 18). Afgevallen bladeren (Afbeelding 19) zijn ook meegenomen voor de DNA-toetsing. Het overzicht van bladmonsters staat in tabel 9. Als positieve controle voor de PCR-toets is *Cylindrocladium buxicola* (isolaat CBS 114417) gebruikt, dit isolaat is ook moleculair gekarakteriseerd via sequentie analyse.

Tabel 9. Bladmonsters voor PCR toetsing

Nr.	Plant code uit infectieproef	Symptoom	Opmerking
1	VC2.1	Pos	
2	VC2.1	Neg	
3	VC3.3	Pos	
4	VC3.3	Neg	
5	O2.2	Neg	
6	O2.2	Neg	
7	VC1.2	Onbekend	Afgevallen bladeren, droog
8	VC3.3	Onbekend	Afvallende bladeren, droog



Afbeelding 17. Bladeren van Buxus (VC2.1) met en zonder symptoom van *Cylindrocladium buxicola*



Afbeelding 18. Bladeren van Buxus (O2.2) zonder symptoom van *Cylindrocladium buxicola*.



Afbeelding 19. Afgevallen bladeren van Buxus (VC1.2)

#### DNA isolatie

Voor DNA isolatie werd gebruikt gemaakt van commerciële kit Puregene Genomic DNA Purification kit van Gentra Systems. PCR's zijn uitgevoerd volgens standaard protocol van Promega PCR-Mastermix. Nested PCR's worden toegepast als de concentraties van de schimmels laag zijn.

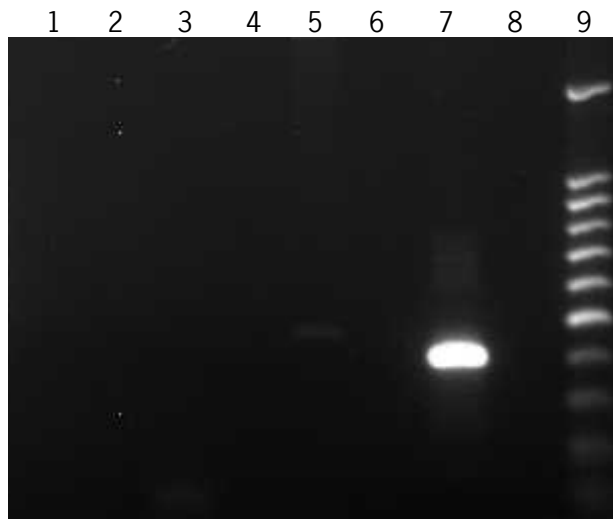
#### Primers ontwerpen

Primers zijn gemaakt gebaseerd op beschikbare ITS en beta Tubuline genesequenties van *Cylindrocladium buxicola* in de DNA databank.

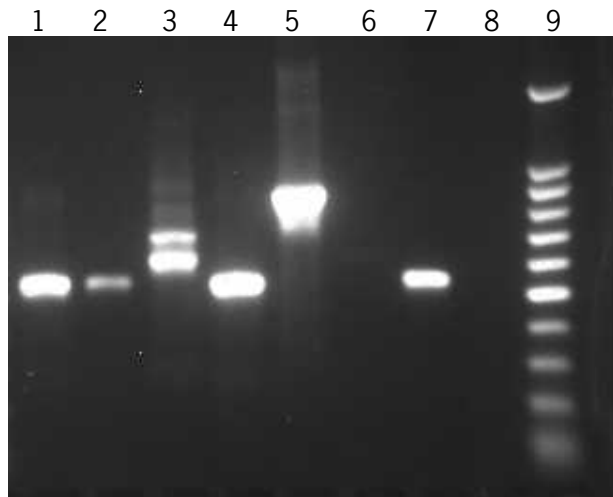
## Resultaten

### Testen op specificiteit

De specificiteit van de primers C.buxiFor/C.buxiRev (gebaseerd op ITS sequenties) werd getest op *C. buxicola* naast andere beschikbare schimmels (van PPO collectie), zie afbeelding 20. Als controle op de kwaliteit van DNA zijn ook PCR's uitgevoerd met primers ITS1/ITS4 (algemene schimmels primers), zie afbeelding 21.



Afbeelding 20. PCR producten (409bp) geamplificeerd met primers C.buxiFor/C.buxiRev voor *Cylindrocladium buxicola*. Laan 1: *Fusarium oxysporum*, 2: *Fusarium culmorum*, 3: *Rhizoctonia solani*, 4: *Botrytis cinerea*, 5: *Phytophthora ramorum*, 6: *Plasmopara halstedii*, 7: *Cylindrocladium buxicola* als positieve controle, 8: water als negatieve controle, 9: Marker 100bp ladder.



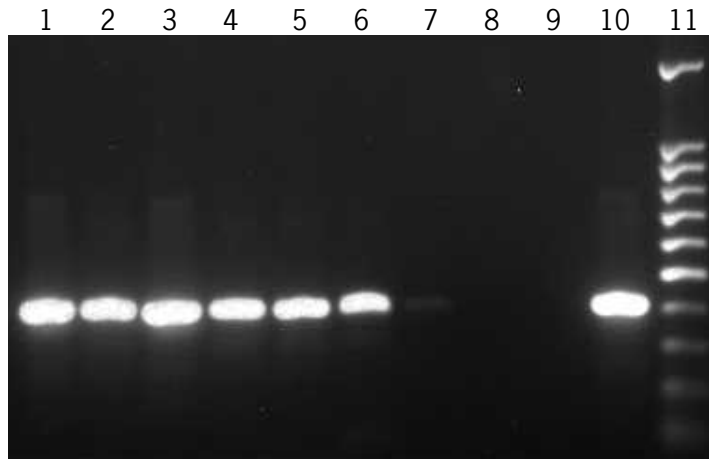
Afbeelding 21. PCR producten geamplificeerd met primers ITS1/ITS4 voor algemene schimmels. Laan 1: *Fusarium oxysporum*, 2: *Fusarium culmorum*, 3: *Rhizoctonia solani*, 4: *Botrytis cinerea*, 5: *Phytophthora ramorum*, 6: *Plasmopara halstedii*, 7: *Cylindrocladium buxicola* als positieve controle, 8: water als negatieve controle, 9: Marker100bp ladder.



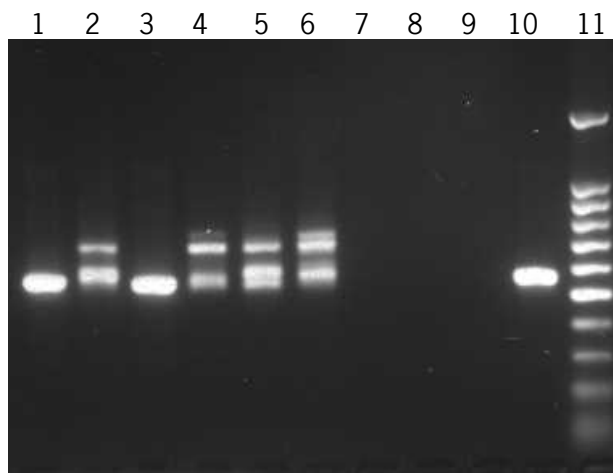
Primers C.buxiFor/C.buxiRev kunnen theoretisch enkele *Cylindrocladium* soorten (die niet in Buxus voorkomen) aantonen. Een andere set primers (gebaseerd op beta Tubuline gensequentie) is ook gemaakt en getest. Deze zijn theoretisch absoluut specifiek, maar de gevoeligheid is iets minder (enkel gen).

#### Testen op gevoeligheid

De gevoeligheid van de primers C.buxiFor/C.buxiRev (gebaseerd op ITS sequenties) werd getest op DNA geïsoleerd uit bladmonsters (Tabel1), zie afbeelding 22. Als controle op de kwaliteit van DNA zijn ook PCR's uitgevoerd met primers ITS1/ITS4 (algemene schimmels primers), zie afbeelding 23.

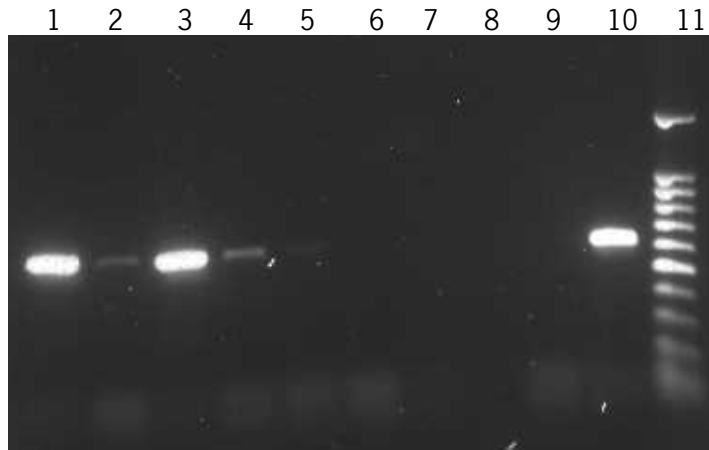


Afbeelding 22. PCR producten (409bp) geamplificeerd met primers C.buxiFor/C.buxiRev voor *Cylindrocladium buxicola*. Laan 1-8: Bladmonsters 1-8 uit Tabel 1, 9: water als negatieve controle, 10: DNA van *Cylindrocladium buxicola* als positieve controle, 11: Marker 100bp ladder.



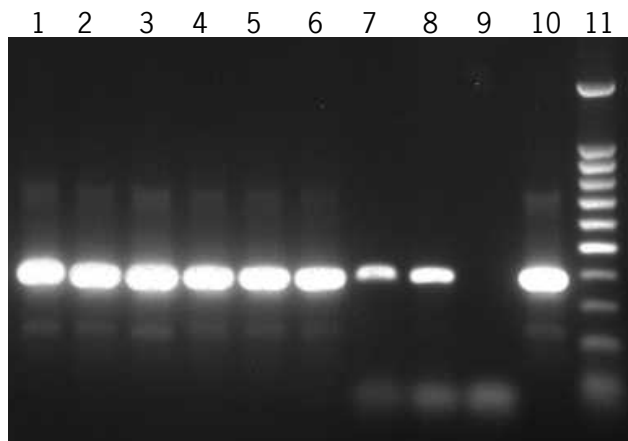
Afbeelding 23. PCR producten geamplificeerd met primers ITS1/ITS4 voor algemene schimmels. Laan 1-8: Bladmonsters 1-8 uit tabel 1, 9: water als negatieve controle, 10: DNA van *Cylindrocladium buxicola* als positieve controle, 11: Marker 100bp ladder.

Ook de gevoeligheid van de primers C.bTubFor/C.bTubRev (gebaseerd op beta Tubuline gensequenties) werd getest op DNA geïsoleerd uit bladmonsters (Tabel1), zie afbeelding 24.



Afbeelding 24. PCR producten (623bp) geamplificeerd met primers C.bTubFor/C.bTubRev voor *Cylindrocladium buxicola*. Laan 1-8: Bladmonsters 1-8 uit Tabel 1, 9: water als negatieve controle, 10: DNA van *Cylindrocladium buxicola* als positieve controle, 11: Marker 100bp ladder.

Voor het aantonen van schimmels met lage concentraties, wordt vaak nested-PCR toegepast, d.w.z. PCR producten die geamplificeerd zijn met ITS1/ITS4 primers (zichtbaar of niet zichtbaar op gel) zijn weer gebruikt (met of zonder verdunning) als template voor PCR met primers C.buxiFor/C.buxiRev. Deze analyse is ook gedaan, zie afbeelding 25.



Afbeelding 25. PCR producten (409bp) geamplificeerd met primers C.buxiFor/C.buxiRev voor *Cylindrocladium buxicola*. Laan 1-8: Verdunningen (1/40) van PCR producten (geamplificeerd met primers ITS1/ITS4 voor algemene schimmels) van bladmonsters 1-8 uit Tabel 1, 9: water als negatieve controle, 10: DNA van *Cylindrocladium buxicola* als positieve controle, 11: Marker 100bp ladder.

Overzicht van resultaten staan vermeld in tabel 10.

Tabel 10. Resultaten van PCR toetsingen op bladmonsters uit de infectieproef

Nr.	Plant code	Symptoom	C.buxiF/C.buxiR	C.bTubF/C.bTubR	Nested -PCR
1	VC2.1	Pos	++	++	++
2	VC2.1	Neg	++	+	++
3	VC3.3	Pos	++	++	++
4	VC3.3	Neg	++	+	++
5	O2.2	Neg	++	-	++
6	O2.2	Neg	++	-	++
7	VC1.2	Onbekend	+	-	+
8	VC3.3	Onbekend	-	-	+

#### Discussie en conclusies

Primers C.buxiFor/C.buxiRev (gebaseerd op ITS sequenties) zijn specifiek. De kans dat andere *Cylindrocladium* soorten aanwezig zijn in bovengrondse delen van Buxus is klein.

Primers C.bTubFor/C.bTubRev (gebaseerd op beta Tubuline gensequentie) kunnen beter gebruikt worden bij twijfelgevallen, de specificiteit is groter, maar de gevoeligheid is lager.

*Cylindrocladium buxicola* is aangetoond bij bladeren zonder symptoom (monsternummer 2, 4, 5, 6). De toets kan dus gebruikt worden voor het onderzoek naar de verspreiding van *Cylindrocladium*. Wat nog uitgezocht moeten worden is de plaats van de sporen. Zaten de sporen nog op het blad of was er sprake van infectie, dus schimmel in het blad. De gebruikte bladmonsters zijn verzameld aan het einde van de infectieproef, de sporen op het blad zijn waarschijnlijk al lang afgespoeld. Bovendien kan volgens de literatuur deze schimmel heel snel het blad indringen. Waarschijnlijk zat de schimmel al in het blad.

Door gebruik van nested PCR kunnen hele kleine hoeveelheden *Cylindrocladium buxicola* worden aangetoond (ook in monsternummer 7, 8). Met DNA technieken wordt geen onderscheid gemaakt tussen dood of levend materiaal. Volgens de literatuur kan deze schimmel meer dan 11 maanden op gecomposteerd bladmateriaal overleven.

Om de infectieroute te bepalen zou in vervolgonderzoek ook grondmonsters moeten worden geanalyseerd. In de praktijk is naast aanwezigheid van *Cylindrocladium buxicola* ook sprake van aantasting door *Volutella buxi*. Het ontwikkelen van een snelle DNA-detectie voor *V. buxi* kan helpen bij de keuze van het juiste gewasbeschermingsmiddel.

#### 4.4.2 Detectie van *Cylindrocladium buxicola* uit praktijkmonsters.

##### Doel

Snelle en specifieke PCR toetsen om de veroorzaker van taksterfte in Buxus, *Cylindrocladium buxicola* te kunnen identificeren en detecteren zijn in het vorig onderzoek ontwikkeld. In dit onderzoek worden deze toetsen met Buxusmonsters uit de praktijk gevalideerd.

##### Uitvoering

Door de monsters te nemen van een zieke plant en symptoomloze planten met afstand van 3, 6, 9, 12 meter van deze zieke plant wordt geprobeerd inzicht te krijgen in de infectieroute. Deze planten komen uit een proefveld uit Boskoop.

Voor de proef is ook een aantal Buxusmonsters genomen van gezonde planten.

DNA isolatie volgens protocol van firma Gentra. De stalen kogels werden gebruikt om bladmonsters fijn te malen voor DNA extractie. Per monsters werd 3 maal ½ blaadje genomen (voor beter verspreiding). De gebruikte PCR-methode staat beschreven in voorgaande paragraaf 5.4.1.

Tabel 11. Geanalyseerde monsters (1e keer)

Nr.	Monster Nr.	Beschrijving	Afstand vanaf plant 1
1	1s	Blaadjes met symptoom van plant 1 (zieke plant)	
2	1	Blaadjes zonder symptoom van plant 1 (zieke plant)	0 meter
3	2	Blaadjes zonder symptoom van plant 2	3 meter
4	3	Blaadjes zonder symptoom van plant 3	9 meter
5	4	Blaadjes zonder symptoom van plant 4	12 meter
6	5	Blaadjes zonder symptoom van plant 5	15 meter
7	6.1	Afgevallen blaadjes van plant 1 (zieke plant)	
8	6.2	Afgevallen blaadjes van plant 1 (zieke plant)	

Tabel 12: Geanalyseerde monsters van gezonde planten (2e keer)

Nr.	Monster nr.	Beschrijving
9	7	Blaadjes zonder symptoom van plant 1
10	8	Blaadjes zonder symptoom van plant 2
11	9	Blaadjes zonder symptoom van plant 3
12	10	Blaadjes zonder symptoom van plant 4

#### Resultaten en discussie

1. PCR met primers C.buxiFor/C.buxiRev (primers gebaseerd op ITS sequentie):



Afbeelding 26. PCR producten (409bp) geamplificeerd met primers C.buxiFor/C.buxiRev voor *Cylindrocladium buxicola*. Laan 1-8: Bladmonsters 1-8 uit Tabel 1, 9: DNA van *Cylindrocladium buxicola* als positieve controle, 10: *Vollutela buxi* als negatieve controle, 11: water als negatieve controle, 12: Marker 100bp ladder.

De gevoeligheid van deze toets is zo hoog dat alle monsters positieve reacties gaven. Alle bladeren hadden dus sporen van *C. buxicola*. Niet duidelijk is hoeveel schimmelweefsel (sporen) aanwezig waren. De toets maakt hier geen onderscheid in. PCR's met deze primers zijn opnieuw uitgevoerd, deze keer met minder aantal cycli (36 i.p.v 40) zodat er misschien wel verschillen in beginhoeveelheden schimmelweefsel kan worden aangetoond, zie afbeelding 28.

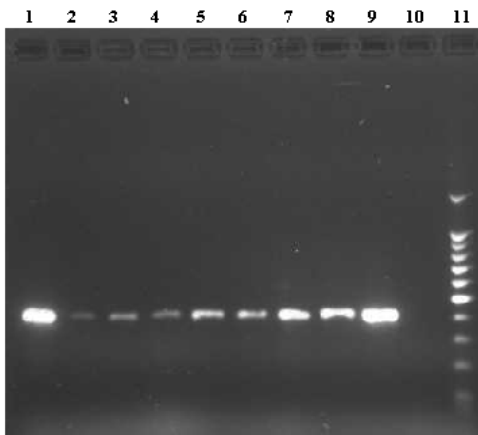
2. PCR met primers C.bTubFor/C.bTubRev (primers gebaseerd op beta tubuline sequentie):



Afbeelding 27. PCR producten (623bp) geamplificeerd met primers C.bTubFor/C.bTubRev voor *Cyindrocladium buxicola*. Laan 1-8: Bladmonsters 1-8 uit Tabel 1, 9: DNA van *Cyindrocladium buxicola* als positieve controle, 10: water als negatieve controle, 11: Marker 100bp ladder.

De gevoeligheid van de toets met primers C.bTubFor/C.bTubRev (beta tubuline is enkel gen copy) is lager dan met primers C.buxiFor/C.buxiRev, daardoor zijn er minder positieve reacties.

3. PCR met primers C.buxiFor/C.buxiRev (primers gebaseerd op ITS sequentie), 36 cycli:

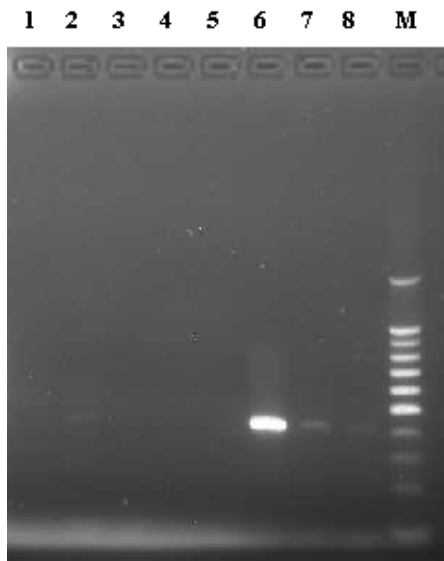


Afbeelding 28. PCR producten (409bp) geamplificeerd met primers C.buxiFor/C.buxiRev voor *Cyindrocladium buxicola*. Laan 1-8: Bladmonsters 1-8 uit Tabel 11, 9: DNA van *Cyindrocladium buxicola* als positieve controle, 10: water als negatieve controle, 11: Marker 100bp ladder.

Er zijn verschillen te zien in intensiteit van de bandjes, maar de verwachte correlatie tussen intensiteit en afstand vanaf zieke plant is niet zichtbaar. Vervolgonderzoek zou gebruik moeten maken van een echte kwantitatieve PCR-techniek.

Opvallend is dat alle monsters positieve reacties gaven. Daarom is een aantal monsters genomen van gezonde Buxusbladeren om de toets te valideren. (tabel 12).

4. PCR met primers C.buxiFor/C.buxiRev, (36 cycli) voor mosters uit tabel 12 :



Afbeelding 29. PCR producten (409bp) geamplificeerd met primers C.buxiFor/C.buxiRev voor *Cylindrocladium buxicola*. Laan 1-4: Bladmonsters 9-12 uit Tabel 12, 5: water als negatieve controle, 6-8: monsters 1-3 uit Tabel 11 als positieve controles, M: Marker 100bp ladder.

De Buxusmonsters van de gezonde planten waren negatief. Dit is in overeenstemming met de verwachting.

#### Conclusies

- De toets met primers gebaseerd op ITS sequenties is gevoelig en betrouwbaar. Gezonde planten gaven geen reacties. In de monsters van symptomloze bladeren is *Cylindrocladium buxicola* aangetoond.
- Door gebruik van de toets met primers gebaseerd op beta tubuline gen zijn er minder planten met sporen van *C. buxicola* aangetoond.
- *C. buxicola* kan minder makkelijk worden aangetoond op dode blaadjes

#### Aanbevelingen

Nader onderzoek op de overleving van *C. buxicola* op afgevallen en dode blaadjes. Het regelmatig nemen van monsters van op het oog gezonde Buxusbladeren in een Buxusperceel kan informatie geven over de aanwezigheid van *C. buxicola*. Aanbevolen wordt om een betrouwbare, representatieve bemonsteringswijze te ontwikkelen.

## 4.5 Gevoeligheid van Buxus-sortiment voor *Cylindrocladium buxicola*.

*C. buxicola* tast alleen Buxus aan. De schimmelziekte kan in het gehele Buxussortiment voorkomen. Wel zijn er verschillen in kwetsbaarheid tussen soorten en cultivars. De meest bekende soort *B. sempervirens* 'Suffructicosa' is zeer gevoelig. Het is niet bekend welke factoren een rol spelen in soortgevoeligheid. Om snel een screening uit te voeren bij een reeks van Buxuscultivars is een labproef gedaan waarin bladeren van Buxuscultivars kunstmatig werden besmet met de schimmel. De aanname is dat de snelheid van infectie en uitgroei van de schimmel in het blad een maat is voor de gevoeligheid van Buxus.

### Doel

Het ontwikkelen van een snelle toets om de gevoeligheid voor *Cylindrocladium buxicola* van Buxuscultivars te bepalen.

Vervolgens wordt in deze proef bepaald wat de relatieve gevoeligheid is van een aantal Buxuscultivars voor *Cylindrocladium buxicola*.

### Uitvoering

De toets is uitgevoerd door blaadjes in een vochtig petrischaaltje te besmetten met sporen van *C. buxicola*. Het aantal bladeren dat bruin verkleurd is een maat voor de gevoeligheid van die cultivar voor de schimmel.

Gezond uitziende blaadjes werden van gezonde containerplanten geplukt. De bladeren zijn voorzichtig met handzeep gewassen en daarna 4 maal gespoeld met steriel demi water. Met een tissue zijn de blaadjes vervolgens gedroogd. In een petrischaal (Ø 9 cm) zijn 10 blaadjes uitgelegd. Per cultivar 2 petrischalen. In de petrischaal lag vochtig filterpapier. De blaadjes zijn met de onderkant naar boven gericht op het filterpapier gelegd. 10µl van een sporensuspensie van isolaat PD 05/0253 3081 (ongeveer  $5 \times 10^5$  sporen/ml) is in het midden van de blaadjes gepipetteerd. De schaaltes werden weggezet in een 24°C stoof voor 6 dagen.

Op dag 6 werd het aantal gezond uitziende blaadjes en blaadjes met bruin verkleuring veroorzaakt door *C. buxicola* geteld (zie afbeelding 30).



Afbeelding 30. Micr. Herrenhausen



Sempervirens Handsworthiensis



Aureo Marginata

### Resultaten

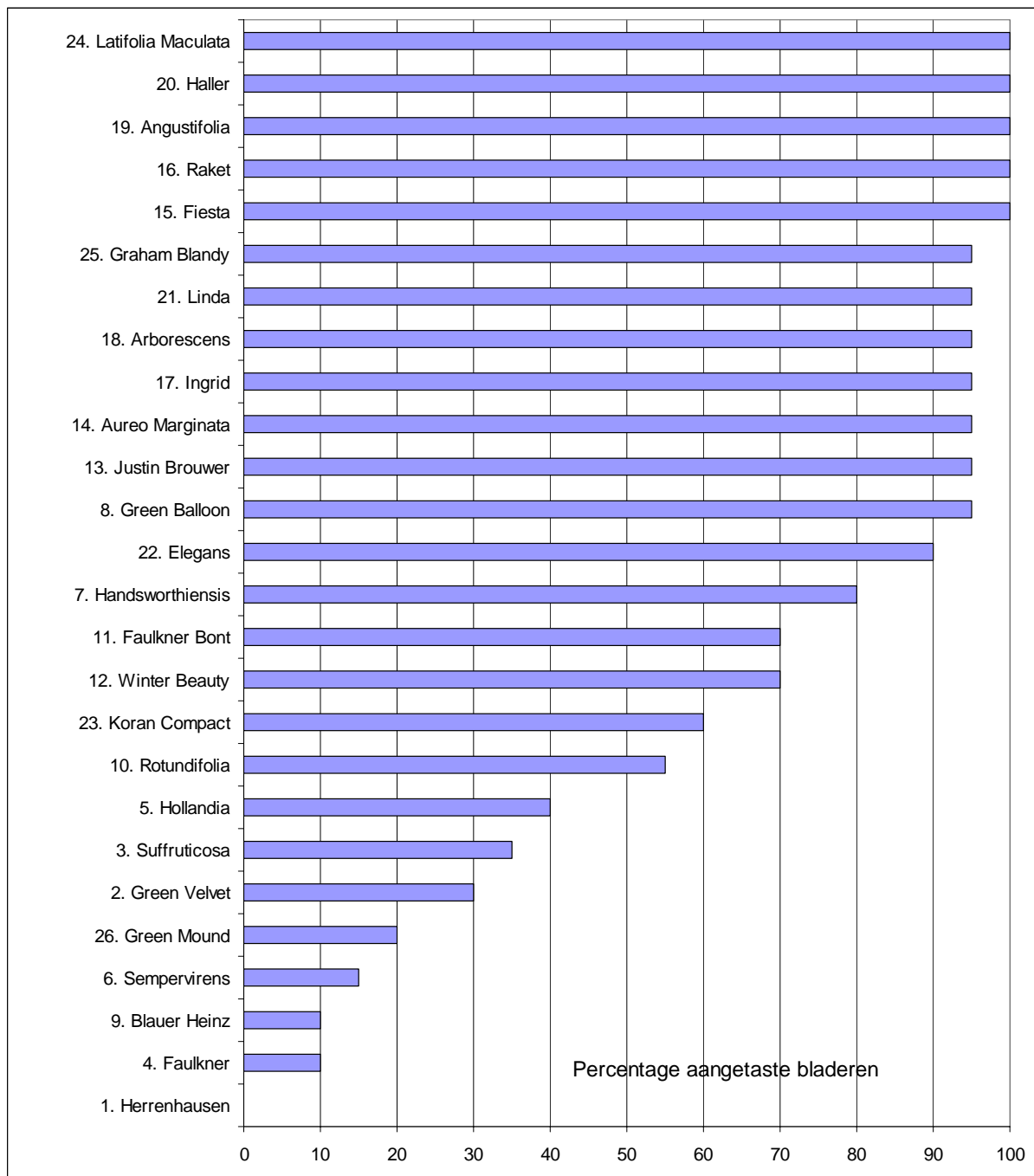
Het aantal gezond uitziende blaadjes en het percentage gezonde bladeren per cultivar staat weergegeven in tabel 13 en figuur 12.

Tabel 13. Gevoeligheid voor *Cylindrocladium buxicola*, weergegeven als het aantal en het percentage. Het totaal aantal blaadjes van 2 petrischalen is opgeteld. Van alle cultivars zijn 20 blaadjes getoetst.

nr	Cultivars	Aantal blaadjes			
		A	B	gezond	% gezond
1	micr. Herrenhausen	10	10	20	100
2	Green Velvet	7	7	14	70
3	Semp. Suffruticosa	7	6	13	65
4	Semp. Faulkner	9	9	18	90
5	Semp. Hollandia	7	5	12	60
6	Sempervirens	7	10	17	85
7	Sempervirens Handsworthiensis	3	1	4	20
8	Semp. Green Balloon	0	1	1	5
9	Semp. Blauer Heinz	8	10	18	90
10	Semp. Rotundifolia	3	6	9	45
11	Faulkner Bont	2	4	6	30
12	Winter Beauty	2	4	6	30
13	Justin Brouwer	1	0	1	5
14	Aureo Marginata	1	0	1	5
15	Fiesta	0	0	0	0
16	Raket	0	0	0	0
17	Ingrid	0	1	1	5
18	Arborescens	0	1	1	5
19	Augustifolia	0	0	0	0
20	Haller	0	0	0	0
21	Linda	0	1	1	5
22	Semperivens Elegans	2	0	2	10
23	Koran Compact	5	3	8	40
24	Latifolia Maculata	0	0	0	0
25	Graham Blandy	0	1	1	5
26	Green Mound	9	7	16	80

De gegevens van tabel 13 zijn omgezet in mate van gevoeligheid en weergegeven in figuur 12. Wanneer alle blaadjes waren aangetast dan is de gevoeligheid dus 100%. De bovenste cultivars zijn het gevoeligst. De lijst is in afnemende gevoeligheid weergegeven.





Figuur 12. Gevoeligheid van verschillende Buxus cultivars weergegeven als percentage aangetaste bladeren.

### Resultaten en discussie

In deze laboratoriumproef is de gevoeligheid van verschillende Buxuscultivars getoetst onder voor de schimmel zeer gunstige omstandigheden. De bladeren werden blootgesteld aan een hoge dichtheid van sporen, bij een constante optimale temperatuur en bij een zeer hoge relatieve luchtvochtigheid. Deze omstandigheden zijn in de praktijk zelden of slechts gedurende korte perioden aanwezig. De vertaling van de resultaten van deze labproef naar de praktijk moet daarom met de nodige voorzichtigheid gebeuren.

Uit de resultaten kunnen grofweg drie categorieën van gevoeligheid van Buxus voor *Cylindrocladium buxicola* worden onderscheiden:

Categorie 1: niet of weinig gevoelig (0 t/m 30% aangetast)

Categorie 2: matig tot redelijk gevoelig (30 – 70%) aangetast)

Categorie 3: gevoelig tot zeer gevoelig (70-100% aangetast)

In deze proef vielen de meeste onderzochte Buxus cultivars in categorie 3: gevoelig tot zeer gevoelig. Eén cultivar Herrenhausen bleek niet gevoelig voor de schimmel. Blauer Heinz en Suffruticosa scoorden in deze laboratoriumproef relatief goed, maar worden in de praktijk juist als gevoelig ervaren. Andersom bleek Fiesta in deze proef erg gevoelig te zijn voor de schimmel, terwijl die in de praktijk als matig gevoelig wordt ervaren. De verschillen in gevoeligheid van sommige cultivars tussen de proef en de praktijk kunnen niet goed worden verklaard. De laboratoriumproef zou herhaald moeten worden om te zien of de resultaten consistent zijn. Op de lange termijn is het vinden van minder gevoelige Buxuscultivars erg belangrijk. Weliswaar kan met een intensief spuitschema de Buxusteelt vrij worden gehouden van *C. buxicola*, maar wanneer de planten op hun eindbestemming zijn en geen bescherming meer krijgen dan kan de ziekte alsnog toeslaan.

In Duitsland bij het onderzoekinstituut LVG Bad Zwischenahn zijn in de vollegrond verschillende Buxuscultivars beoordeeld op hun gevoeligheid voor *C. buxicola* (Ehsen, 2010). Hieruit bleek o.a. dat *Buxus microphylla* 'Herrenhausen' weinig werd aangetast. *B. sempervirens* 'Suffruticosa' was het ernstigst aangetast. *B. sempervirens* 'Blauer Heinz' bleek ook gevoelig voor *C. buxicola*, terwijl in het laboratoriumonderzoek Blauer Heinz als weinig gevoelig werd beoordeeld. Uit ander onderzoek (Brand, 2008) bleek *B. sempervirens* 'Arborescens' weinig gevoelig, terwijl in het laboratoriumonderzoek 'Arborescens' als erg gevoelig werd beoordeeld. Voor een definitieve beoordeling van de gevoeligheid van een bepaalde Buxussoort of cultivar moeten dus meerdere beoordelingen in ogenschouw worden genomen.

#### Conclusies

- Binnen het Buxussortiment bestaat een grote variatie in gevoeligheid voor de schimmel *Cylindrocladium buxicola*, de veroorzaker van taksterfte in Buxus
- Uit deze proef bleek *Buxus microphylla* 'Herrenhausen' niet gevoelig voor de schimmel
- De meeste cultivars waren gevoelig tot zeer gevoelig voor de schimmel
- Gezien de verschillen in uitkomst tussen praktijkervaringen en de uitslag van de laboratoriumproef moeten de resultaten van deze proef met de nodige voorzichtigheid worden geïnterpreteerd.
- Meer onderzoek naar de gevoeligheid van het Buxussortiment is wenselijk.

## 4.6 Effect van bemesting op ziekteontwikkeling

In het voorjaar van 2008 is een proef gedaan naar een mogelijke preventieve werking van aangepaste basisbemesting tegen *C. buxicola*.

### Doel

Doel van de proef is om te bepalen of een extra Kali bemesting Buxus weerbaarder maakt tegen *Cylindrocladium buxicola*.

### Uitvoering

In de proef zijn twee doseringen Kali-meststof (gecoate korrels 0-0-42 5-6 mnd) extra toegevoegd aan de standaard basisbemesting (gecoate korrels 15-9-12 5-6 mnd). Er waren 3 behandelingen in 4 herhalingen.

behandeling 1	Standaard bemest 5 g/l Osmocote Exact 5-6 mnd
behandeling 2	Extra kali* : 5 g/l Osmocote Exact 5-6 mnd + 1,5 g/l Osmocote 0-0-42 5-6 mnd
behandeling 3	Extra kali* : 5 g/l Osmocote Exact 5-6 mnd + 3 g/l Osmocote 0-0-42 5-6 mnd

\*Door hoge kaligift kan eerder magnesiumgebrek ontstaan. Een zichtbaar gebrek kan worden gecorrigeerd met bitterzout of magnesiumnitraat.

De proef is uitgevoerd op het containerveld van de Proeftuin van Holland in Boskoop. Het uitgangsmateriaal was besmet plantgoed P9 *Buxus sempervirens*. De planten waren in het voorgaande teeltjaar aangetast door *Cylindrocladium buxicola*. De planten zijn overgepot van een P9 potje naar een C1,5 container. Potgrond: Slingerland; Heestermengsel. Aantal potten per behandeling was 200, verdeeld in 4 herhalingen. De proef bestond dus uit 600 planten. De proef is uitgevoerd van 2 mei tot en met 10 oktober 2008. De aantasting van *Cylindrocladium buxicola* per plant is ingedeeld in klassen, zie tabel 14.

Tabel 14. Beoordelingsklassen.

Klasse	Omschrijving
1	Geen aantasting
2	Licht aangetast (aantal bladplekken 0-5 per plant)
3	Matig aangetast (5-20 bladplekken per plant)
4	Zwaar aangetast (>20 bladplekken per plant)
5	Zeer zwaar aangetast (>40 bladplekken per plant) + bladval

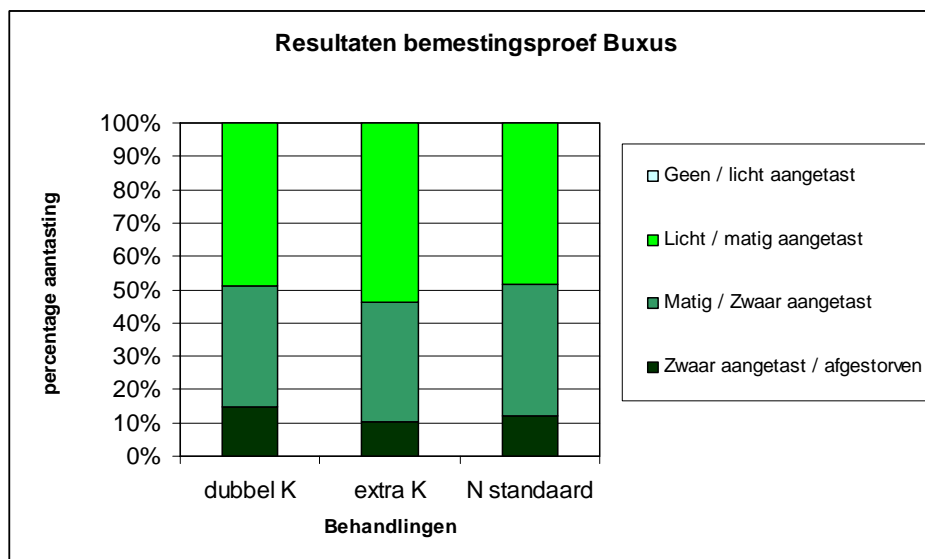
### Resultaten

Bij alle 3 behandelingen was de aantasting van de toetsplanten door *Cylindrocladium* ernstig. Bij de eindbeoordeling op 10 oktober 2008 waren alle planten in meer of mindere mate aangetast.



Afbeelding 31. Voorbeelden van zwaar aangetast (rechts) tot zeer zwaar aangetast, (links en midden met bladval).

Geen van de bemestingsstrategieën heeft geleid tot een verminderde aantasting van *Cylindrocladium*. De verschillen zijn verwaarloosbaar. Ondanks dat de schimmel in de praktijk niet bekend staat als een aantasting die de gehele plant velt, is er toch een aantal planten afgestorven. Onduidelijk is of dit het directe gevolg is van *Cylindrocladium*.



Figuur 13. Verdeling van de toetsplanten over de aantastingsklassen per behandeling. Overzichtsfoto's van de veldjes aan het eind van de proef staan in bijlage 2.

#### Conclusies en aanbevelingen

- In deze proef is niet gebleken dat een extra Kali –gift een remmende werking heeft op de ontwikkeling van *Cylindrocladium buxicola* in Buxus.
- De afgestorven planten kunnen het gevolg zijn van de extreme bladval in combinatie met andere factoren als klimaat en overige schimmels.

## 5 Samenvatting en aanbevelingen

De schimmel *Cylindrocladium buxicola* tast bladeren en stengels aan van Buxus. De ziektebeelden zijn duidelijk omschreven en goed te herkennen. Op jonge bladeren ontstaan oranje-bruine vlekken met een donkere rand. Op de oudere bladeren zijn donkerbruine vlekken zichtbaar en verkleurt het blad in zijn geheel. Typisch voor deze schimmelaantasting zijn de zwarte langgerekte plekken de takjes. Bij een ernstige aantasting vallen de bladeren sterven de takjes af.

*Cylindrocladium buxicola* moet niet verward worden met *Volutella buxi*, een andere veel voorkomende schimmel in Buxus. *Volutella* vormt bij hoge luchtvochtigheid aan de onderkant van het blad en aan de stambasis oranje/roze sporenhooptjes. De schors van geïnfecteerde takjes kan gemakkelijk worden losgemaakt van het onderliggende hout. De sapstroom wordt verhinderd zodat verwelking optreedt. Uiteindelijk sterven geïnfecteerde takken af. Er wordt aangenomen dat *Cylindrocladium buxicola* optreedt als primaire pathogeen, terwijl *Volutella buxi* optreedt als wond- of secundaire parasiet.

De eerste aantastingen door *C. buxicola* in een Buxusteelt worden vaak gevonden aan de randen (pad, haag of sloot) van percelen. Dat zijn vaak verstoorde bodemstructuurplekken, plekken waar het gewas vaak langer vochtig blijft of minder gespoten plekken. Regelmatige controle van het Buxusperceel op eventuele aantasting door *C. buxicola* is belangrijk om een uitbraak te voorkomen. Belangrijk te weten is dat de schimmelsporen zich gemakkelijk kunnen verspreiden via teelthandelingen, dus via mensen, via kleding, snoeiapparatuur, stekmes etc. Daarnaast kan verspreiding ook plaatsvinden via wind en water via versleping van grond en planten, dieren, insecten etc. Ook afgevallen blad is een bron van infectie. Bedrijfshygiëne is dus van het grootste belang om een Buxusteelt gezond te houden. In de praktijk kunnen verschillende maatregelen worden genomen om problemen met *Cylindrocladium* of verspreiding van de schimmel te voorkomen:

- Gebruik gezond uitgangsmateriaal dat vrij is van *Cylindrocladium*.
- Controleer stekplanten en spuit deze mee
- Rij of loop niet door een nat gewas
- Voorkom dat door werkzaamheden schimmelsporen van een aangetaste hoek worden meegenomen naar een gezonde hoek
- Verwijder zieke planten en afgevallen blad
- Geef in de containerteelt 's ochtends water zodat het gewas sneller opdroogt
- Pas teeltwisseling toe. Hierdoor vermindert de infectiedruk
- Zorg voor een goede bodemstructuur

Bij een aantasting door *Cylindrocladium* kunnen verschillende gewasbeschermingsmiddelen worden ingezet. In diverse effectiviteitsproeven zijn verschillende middelen getest op hun werking tegen *Cylindrocladium* in Buxus. De proeven zijn uitgevoerd zowel in de kas met kunstmatige besmetting als op praktijkbedrijven. Uitbreiding van taksterfte in Buxus in de kas blijkt moeilijk te realiseren. Waarschijnlijk is het klimaat te droog. Het uitvoeren van een middelenproef kan daarom beter onder veldomstandigheden worden uitgevoerd. Helaas bleken de veldproeven bij kwekers ook onvoldoende resultaten op te leveren. Een aantasting bleef vaak uit. De reden dat er geen uitbraak van *Cylindrocladium* optrad in de praktijkproeven is niet duidelijk geworden. Uiteindelijk bleken de veldproeven op de onderzoeklocatie in Boskoop wel resultaten te geven. In deze veldproeven werden zieke bladeren tussen de Buxusplanten gestrooid waardoor de infectiedruk sterk was verhoogd. Uit deze proeven bleek dat de bestrijding van *Cylindrocladium* mogelijk is als er op tijd wordt ingegrepen met de volgende middelen: Mirage Plus, TopsinM+Daconil (TopsinM is niet meer toegelaten sinds 14-6-2009), Switch, Folicur, Ortiva, Flint, Kenbyo, maneb, captan, code 1 (dit middel zit in de toelatingsprocedure en wordt waarschijnlijk in 2012 toegelaten voor de boomkwekerij). Het middel Spirit (folpet+tebuconazool) is niet meegenomen in dit onderzoeksproject, maar uit ander onderzoek blijkt Spirit ook te werken tegen *Cylindrocladium* in Buxus.

De middelen blijken vooral preventief te werken, dus voordat er een duidelijk aantasting in het Buxusgewas zichtbaar is. Als tijdig wordt ingegrepen is een bestrijding van deze ziekte goed mogelijk.

De spuittechniek is een aandachtspunt bij deze schimmelziekte. *Cylindrocladium* in de Buxusbollen en piramide teelt is lastig te bestrijden. Dat heeft te maken met vaak een slechte indringing van de spuitvloeistof in de compacte Buxusbol en -piramiden. Het advies is om met veel water te spuiten en bij voorkeur van twee kanten door bijvoorbeeld heen en terug te rijden.

Voor een goede werking is verder een juist spuitmoment belangrijk. De weersomstandigheden vóór, tijdens en na een bespuiting hebben grote invloed op het uiteindelijke effect van die bespuiting. De middelen tegen *Cylindrocladium* kunnen worden ingedeeld in contact middelen, systemische middelen en een specifieke groep: de strobilurinen.

Contactherbiciden hebben over het algemeen een breed werkingspectrum. Ze worden gespoten op droog blad en bij drogend weer. Een goede bedekking van het blad is van belang, niet geraakte delen en nieuw aangegroeide delen van de plant zijn onbeschermd. Voorbeelden van contactmiddelen zijn: captan, maneb, Daconil.

Systemische middelen worden opgenomen door de plant en kunnen zich verplaatsen in de plant. Systemische middelen kunnen het beste bij groeizaam weer worden gespoten bij niet al te hoge temperaturen en niet bij zogenaamd scherp weer. Voorbeelden van systemische middelen zijn: Mirage Plus, Switch, Folicur en Spirit.

De derde groep, de strobilurinen worden vastgelegd in de waslaag van het blad. Deze middelen hebben een lange werking. Nadeel is dat de strobilurinen gevoelig zijn voor resistentie. Om die reden moeten deze middelen worden afgewisseld met middelen uit de andere groepen. Voorbeelden van strobilurinen zijn: Kenbyo, Ortiva en Flint.

Uitgaande van de ervaringen die in dit Buxusproject zijn opgedaan in de middelenproeven moet een strak spuitschema worden nageleefd om *Cylindrocladium* uit het gewas te houden:

- Controleer het Buxusgewas wekelijks op aantasting
- Blijf alert zolang het gewas groeit
- Bij geen aantasting en droog weer, elke 2 à 3 weken preventief spuiten
- Bij geen aantasting en nat weer, elke 10 dagen
- Bij aantasting wekelijks en bij lange bladnatperioden om de 5 dagen
- Bij de eerste bladvlekjes werken de volgende middelen goed: Mirage Plus en Switch. N.B. beide middelen kunnen op jong schot iets remmend werken.
- Preventief, dus voordat taksterfte in het gewas zichtbaar is, kunnen de volgende middelen worden ingezet: maneb, captan, Daconil eventueel in combinatie met Ortiva. Goede resultaten tegen taksterfte zijn ook behaald met toevoegingen aan de spuitvloeistof met maneb, bitterzout of koperbladvoeding.
- Wanneer het gewas goed groeit dan hebben Mirage Plus en Switch een goede werking.
- De strobilurines Flint of Ortiva hebben een goede werking wanneer het gewas niet al te hard groeit en wanneer het weer niet gunstig is voor contactmiddelen.
- Het is verstandig om met veel water te spuiten, 1000 l/ha.

In het laatste jaar van dit onderzoeksproject is aandacht gegeven aan het toetsen van verschillende bestrijdingstrategieën: wachten op de eerste aantasting of preventief en intensief spuiten. Als er curatief gespoten kan worden, dus bij het zien van de eerste aantasting dan kan het huidige kalenderspuiten worden vervangen door weersafhankelijk spuiten in combinatie met frequente gewascontroles. Dat vermindert de middelenkosten voor Buxustelers en het voorkomt onnodige milieuschade. Een belangrijke voorwaarde is natuurlijk wel dat het curatief spuiten, na een melding van aanwezigheid van *Cylindrocladium* in het gewas, effectief is en dat er geen verhoogd risico is op uitbraak van de schimmel. De huidige beheersing van deze schimmelziekte bestaat voornamelijk uit een regelmatige chemische bestrijding door middel van kalenderbespuitingen. Gezien de uitbreiding en ernst van de ziekte is er vanuit de boomkwekerijsector dus een dringende vraag naar meer kennis op het gebied van een effectieve bestrijdingstrategie. In het vervolgproject: 'Taksterfte in Buxus II' dat in 2010 van start is gegaan, is onderzoek naar een effectieve bestrijdingstrategie tegen *Cylindrocladium* een belangrijk aspect.

Een belangrijk hulpmiddel voor de Buxustelers zou een waarschuwingssysteem kunnen zijn. Een waarschuwingssysteem zou door onafhankelijk onderzoek moeten worden ontwikkeld en gevalideerd. Tussen de Belgische onderzoeksinstituten ILVO en PCS en PPO zijn afspraken gemaakt om op dit gebied samen te werken. Als door onderzoek kan worden aangetoond dat een waarschuwingssysteem inderdaad het moment van een *Cylindrocladium* uitbraak kan voorspellen, dan zou een tijdige preventieve bespuiting de daadwerkelijke uitbraak kunnen voorkomen. Onnodige bespuitingen worden dan zoveel mogelijk voorkomen.

Een gezonde start van een Buxusteelt, vrij van *C. buxicola*, kan later in de teelt veel problemen voorkomen. In dit project is onderzocht of dompeling van het stek in ontsmettingsmiddel of in warmwater de schimmelproblemen bij aanvang van de Buxusteelt kan voorkomen..

Een warmwaterbehandeling rond de 45°C gedurende een half uur gaf een vermindering van aantasting in Buxusstek. De temperatuurgrens tussen het afdoden van *C. buxicola* en de schade voor Buxus liggen dicht bij elkaar. Misschien dat in een proef die grenzen kunnen worden bepaald. Echter, voor de praktijk is het een risicovolle methode. Het ontsmetten van Buxusstek door middel van een ontsmettingsmiddel was perspectiefvol en dit wordt meegenomen in het vervolproject.

DNA-detectie van de schimmel in planten helpt om snel de juiste diagnose te stellen. De DNA-techniek is waardevol voor het onderzoek naar de verspreiding van de schimmel. Daarom is in dit onderzoeksproject een snelle en specifieke DNA-toets of PCR toets ontwikkeld om de veroorzaker van taksterfte in Buxus, *Cylindrocladium buxicola* te kunnen identificeren en detecteren. De nadruk lag vooral op het detecteren van deze schimmel in symptoomloos plantmateriaal. De in dit project ontwikkelde DNA-toets blijkt gevoelig en betrouwbaar. Gezonde planten gaven geen reacties. In monsters van symptoomloze bladeren kon *Cylindrocladium buxicola* worden aangetoond. Met deze DNA-detectiemethode kan in geval van twijfel nu dus snel een juiste diagnose worden gesteld.

Om de infectieroute te bepalen zou in vervolgonderzoek ook grondmonsters moeten worden geanalyseerd. Dit wordt verder onderzocht in het vervolgonderzoekproject.

In de praktijk is naast aanwezigheid van *Cylindrocladium buxicola* ook sprake van aantasting door *Volutella buxi*. Het ontwikkelen van een snelle DNA-detectie voor *V. buxi* kan helpen bij de keuze van het juiste gewasbeschermingsmiddel. Voor *Volutella buxi* is nog geen DNA-detectietest ontwikkeld.

*Cylindrocladium buxicola* tast alleen Buxus aan. De schimmelziekte kan in het gehele Buxussortiment voorkomen. Wel zijn er verschillen in kwetsbaarheid tussen soorten en cultivars. De meest bekende soort *Buxus sempervirens* 'Suffruticosa' is zeer gevoelig. Het is niet bekend welke factoren een rol spelen in soortgevoeligheid. In dit onderzoeksproject is een begin gemaakt met het ontwikkelen van een snelle laboratoriumtest om te kunnen bepalen wat de gevoeligheid is van een bepaalde Buxussoort of -cultivar voor *C. buxicola*. Buxuscultivars werden kunstmatig besmet met de schimmel. De snelheid van symptoomontwikkeling in een Buxusblad is een maat voor de gevoeligheid van Buxus. In deze proef bleken de meeste onderzochte Buxus cultivars gevoelig tot zeer gevoelig te zijn voor *C. buxicola*. Eén cultivar Herrenhausen bleek niet gevoelig voor de schimmel. Dat wordt ook door praktijkervaringen ondersteund. 'Blauer Heinz' en 'Suffruticosa' scoorden in de laboratoriumproef relatief goed, maar worden in de praktijk juist als gevoelig ervaren. De verschillen in gevoeligheid van sommige cultivars tussen de proef en de praktijk kunnen niet goed worden verklaard. De vertaling van de resultaten van de labproef naar de praktijk moet daarom met de nodige voorzichtigheid gebeuren. De labproef zou herhaald moeten worden om te zien of de resultaten consistent zijn.

Op de lange termijn is het vinden van minder gevoelige Buxuscultivars erg belangrijk. Weliswaar kan met een intensief spuitschema de Buxusteelt (redelijk) vrij worden gehouden van *C. buxicola*, maar wanneer de planten op hun eindbestemming zijn en geen bescherming meer krijgen dan kan de ziekte alsnog toeslaan. Buxussoorten die door meerdere onderzoekers worden genoemd als redelijk ongevoelig voor taksterfte zijn *Buxus microphylla* 'Herrenhausen' en *Buxus sempervirens* 'Arborescens', terwijl in het laboratoriumonderzoek 'Arborescens' als erg gevoelig werd beoordeeld. Voor een definitieve beoordeling van de gevoeligheid van een bepaalde Buxussoort of cultivar moeten dus meerdere beoordelingen in ogenschouw worden genomen. Dit onderzoek wijst wel uit dat binnen het Buxussortiment grote verschillen bestaan in gevoeligheid voor *Cylindrocladium buxicola*. Meer onderzoek naar de gevoeligheid van het

Buxussortiment is zeer wenselijk. In het nieuwe Buxusproject wordt dit verder onderzocht.

Halverwege dit Buxusproject, na bijna 2 jaar onderzoek zijn de bevindingen voor het beheersen van *Cylindrocladium* in Buxus samengevat in een informatieposter over taksterfte in Buxus. De informatieposter is in augustus 2007 uitgebracht in een samenwerking van de NBvB, PPO Bomen, Anthos, Productschap Tuinbouw (PT), Naktuinbouw en diverse boomteeltadviseurs. De toen meest actuele informatie over het schadebeeld, bestrijding, preventie, ontwikkeling en verspreiding van de ziekte wordt op de poster weergegeven. Tevens werden eind 2007 de bevindingen gepresenteerd in 3 voorlichtingsbijeenkomsten, in Boskoop, Apeldoorn en Eindhoven over de toen nieuwe Buxusziekte. Een van de vragen die naar voren kwam was de rol van bemesting op de ziekteontwikkeling. Kan door het sturen met de bemesting de ziektedruk worden verminderd? In het voorjaar van 2008 is daarom een proef gedaan naar een mogelijke preventieve werking van aangepaste basisbemesting tegen *C. buxicola*. In deze proef is gekeken of een extra Kali bemesting Buxus weerbaarder maakt tegen *Cylindrocladium buxicola*. De proef liet zien dat een extra kalium –gift geen effect had op de ontwikkeling van *Cylindrocladium buxicola* in Buxus. Praktijkervaringen zijn wel dat het opjagen van Buxus met extra stikstof de planten gevoeliger maakt voor aantastingen, dus ook voor *Cylindrocladium*. Voor een gezonde teelt is een gezonde bodem (goede structuur, goede ontwatering en een evenwichtige voedingstatus) natuurlijk wel belangrijk, maar het is geen garantie dat planten geen last kunnen krijgen van *Cylindrocladium*.

In de literatuur wordt verder beschreven dat er heel weinig genetische variatie is tussen verschillende isolaten die zijn gevonden in Groot Brittannië en Nieuw Zeeland. Om een indruk te krijgen van de genetische variatie van isolaten van *C. buxicola* verkregen uit verschillende locaties in Nederland zijn 6 isolaten onderzocht op hun genetische variatie. Het bleek dat er geen variatie was en dat de schimmels identiek waren. Het lijkt er dus op dat de verspreiding door het land is gebeurd vanuit één aantastingsbron. Aangenomen mag worden dat de verspreiding vooral is gebeurd via de intensieve Buxushandel en transport tussen Buxuskwekerijen. Aangezien het één stam is, is het aannemelijk dat de schimmel op verschillen locaties in het land (nog) geen verschillen in gevoeligheid heeft kunnen ontwikkelen voor de gebruikte gewasbeschermingsmiddelen.

De kennis die in dit project is verkregen heeft van de in 2006 nog onbekende schimmel *C. buxicola* een bekende schimmel gemaakt. De meeste Buxustelers kennen de schimmel inmiddels. Het belang van bedrijfshygiëne is duidelijk en er kan gebruik worden gemaakt van een aantal gewasbeschermingsmiddelen. Toch blijven vragen bestaan over de juiste bestrijdingstrategie. Ook vragen over de overleving en verspreiding van de schimmel zijn nog niet volledig beantwoord. Tevens heeft het onderzoek laten zien dat er mogelijkheden zijn om minder bevreesd te zijn voor *C. buxicola* door aandacht te geven aan het ontwikkelen van weinig vatbare of zelfs resistente cultivars. Het geheel van bedrijfshygiëne, chemische en teelttechnische maatregelen en gebruik van waardplantresistentie moet uiteindelijk leiden tot een goede controle van de ziekte en het veilig stellen van de Nederlandse Buxusteelt.



## 6 Conclusies

- Taksterfte veroorzaakt door *Cylindrocladium buxicola* is duidelijk te herkennen en kan gemakkelijk worden onderscheiden van taksterfte veroorzaakt door *Volutella buxi*.
- *C. buxicola* ontwikkelt zich het snelst bij vochtige omstandigheden en bij een temperatuur rond de 25°C. Infectie kan ook op gezond blad plaatsvinden. Ook bij lagere temperaturen, vanaf 5°C kan de schimmel zich ontwikkelen. Schimmelsporen verspreiden zich vooral via teelthandelingen. Op afgevallen blad kan de schimmel vrij lang overleven. Hierdoor kan in het voorjaar weer een nieuwe aantasting ontstaan.
- Alle tot dusver gevonden isolaten van *C. buxicola* zijn genetisch identiek.
- Uit de praktijkervaringen werd duidelijk dat de ziekte zich zeer snel kan ontwikkelen. Vooral onder langdurige natte weersomstandigheden in de nazomer.
- Uit het onderzoek zijn enkele effectieve gewasbeschermingsmiddelen naar voren gekomen: Mirage Plus (folpet/prochloraz), Switch (cyprodinil/ fludioxonil), Ortiva (azoxystrobine), Kenbyo (kresoxim-methyl), Flint (trifloxystrobin), Folicur (tebuconazool), Maneb, Captan en een nog niet toegelaten middel (dit middel zit in de toelatingsprocedure en wordt waarschijnlijk in 2012 toegelaten voor de boomkwekerij). Sommige middelen kunnen beter preventief worden ingezet en sommige hebben een meer curatieve werking.
- Als tijdig wordt ingegrepen is bestrijding van deze ziekte goed mogelijk.
- In een dicht gewas als Buxus valt de indringing van het middel vaak tegen. Daarom is het verstandig om met veel water te spuiten en het liefst van twee kanten door bijvoorbeeld heen en terug te rijden.
- Gebaseerd op de ervaringen die in dit project zijn opgedaan in de middelenproeven kunnende volgende adviezen worden gegeven: 1) Controleer het Buxusgewas minstens wekelijks op aantasting, 2) Blijf alert zolang het gewas groeit, 3) Bij geen aantasting en droog weer, elke 2 à 3 weken preventief spuiten, 4) Bij geen aantasting en nat weer, elke 10 dagen spuiten, 5) Bij aantasting wekelijks en bij lange bladnatperioden om de 5 dagen spuiten.
- Een juist afwisselingschema van de beschikbare gewasbeschermingsmiddelen is belangrijk voor een effectieve bestrijding van de ziekte.
- Een gezonde start van een Buxusteelt, vrij van *C. buxicola*, kan later in de teelt veel problemen voorkomen.. Uit dit onderzoek ter voorkoming van aantasting in Buxusstek met warm waterbehandelingen blijkt dat variaties in behandeltijd in de buurt van 45°C misschien mogelijkheden biedt voor het ontsmetten van Buxusstek.
- Het ontsmetten van Buxusstek het dompelen in een ontsmettingsmiddel biedt perspectieven, maar moet verder worden onderzocht.
- Een snelle, gevoelige PCR-toets voor het aantonen van *Cylindrocladium buxicola* is ontwikkeld en uitgetest. De PCR-toets is bruikbaar voor diagnostiek en verder onderzoek naar o.a. de verspreiding van de schimmel.
- De PCR-toets moet in het volgende Buxus-onderzoek verder worden gevalideerd.
- Binnen het Buxussortiment bestaat een grote variatie in gevoeligheid voor de schimmel *Cylindrocladium buxicola*. *Buxus microphylla* 'Herrenhausen' lijkt niet gevoelig voor de schimmel.
- De meeste getoetste cultivars waren gevoelig tot zeer gevoelig voor de schimmel. Meer onderzoek naar de gevoeligheid van het Buxussortiment is nodig.
- De laboratoriumproef om snel de gevoeligheid te toetsen van een Buxuscultivar moet verder worden ontwikkeld om de resultaten betrouwbaar naar de praktijk te kunnen vertalen.
- Een extra kalium-gift heeft geen remmende werking op de ontwikkeling van *Cylindrocladium buxicola* in Buxus.



## 7 Literatuur

- Brand, T. 2006. *Cylindrocladium* an Buxus – was tun? Deutsche Baumschule 58(3), 36.
- Brand, T. 2007. Buchsbaumsterben durch *Cylindrocladium buxicola*. Pflanzenschutzamt, Oldenburg. Landwirtschaftskammer Niedersachsen, Juli 2007.
- Brand, T. en H. Beltz. 2007. *Cylindrocladium buxicola* Chemisch in den Griff zu bekommen? Pflanzenschutz, Baumschule, (2) 47-49.
- Brand, T. 2008. Buxus-Blattfall durch *Cylindrocladium buxicola*. Pflanzenschutz (2) 48-50.
- Ehsen, B. en H. Beltz. 2010. Gibt es Alternativen zu 'Suffruticosa'? Pflanzenschutz(2) 6-8.
- Hamelin, R. C., Berube, P., Gignac, M., Bourassa, M. 1996. Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR. Appl Environ Microbiol. Nov; 62(11): 4026-31.
- Henricot, B., Perez-Sierra, A. and Prior, C., 2000. A new blight disease on Buxus in the UK caused by the fungus *Cylindrocladium*, Plant Pathology, 49(6), 805
- Henricot, B. and Culham, A., 2002. *Cylindrocladium buxicola*, a new species affecting Buxus spp., and its phylogenetic status, Mycologia, 94(6), 980-997
- Henricot, B. 2006. Box blight rampages onwards. The Plantsman, September, 153-157.
- Pflanzenschutzdienst NRW, 9 september 2005. *Cylindrocladium buxicola* – Ein neuer Schaderreger an Buxus. <http://www.landwirtschaftskammer.de/presse/archiv/aa-2005-45-02.htm>



## Bijlage 1. Afbeeldingen van Taksterfte in Buxus

Twee soorten schimmels kunnen blad- en taksterfte in Buxus veroorzaken. Beide kunnen voor veel uitval zorgen.

### *Volutella buxi*

In eerste instantie verkleuren de bladeren oranjebruin en verschrompelen. De afgestorven bladeren hebben een strokleurig uiterlijk. Ze vormen opvallende plekken van geelverkleurende afstervende bladeren. Het begint meestal met één zijtak en de verkleuring begint bij de oudste bladeren. In dit stadium kunnen al oranje/roze sporenhoopjes worden aangetroffen op de twijgen en onderkant van het blad, zie afbeelding 32. Er is een insnoeringsplaats te vinden op de twijgen, waarboven het takgedeelte verkleurt en afsterft, zie afbeelding 33. De schors van geïnfecteerde takjes is dood en kan gemakkelijk worden losgemaakt van het onderliggende hout. Dit onderliggende hout is grijs tot zwart verkleurd. De sapstroom wordt verhinderd zodat verwelking optreedt. Uiteindelijk sterven geïnfecteerde takken af. Wanneer de planten niet behandeld worden, verspreid de schimmel zich en kan de volledige plant afsterven.

Daarnaast komt aantasting van *Buxus* door de schimmel *Cylindrocladium buxicola* voor. Deze begint als kleine bladplekjes en groeit later door op de stam waar hij langgerekte zwarte plekken veroorzaakt, resulterend in taksterfte. Zie afbeeldingen



Afbeelding 32. Oranje/roze sporenhoopjes van *Volutella buxi*.



Afbeelding 33. Insnoeringsplek zie pijl.



Afbeelding 34. Ernstige aantasting van Buxus door *C. buxicola*.



Afbeelding 35. *Cylindrocladium* zwarte strepen op de stengel



Afbeelding 36. Ernstige bladval in Buxus door *C. buxicola*.

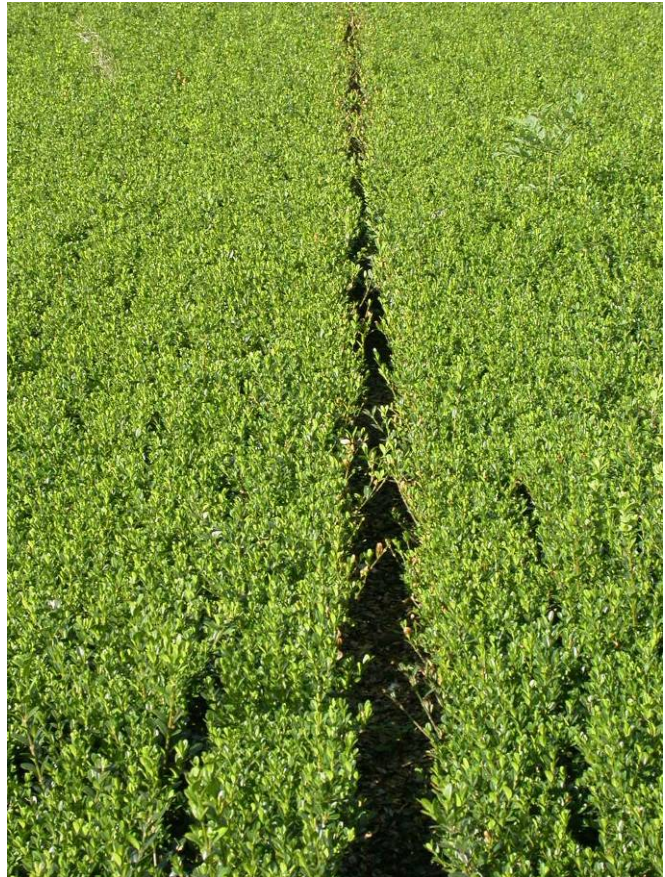


Afbeelding 37. Bladvlekken in het jonge schot.



Afbeelding 38. Bladval en zwarte strepen op de stengels.

Looppad in een Buxusperceel. De buitenste takjes zijn aangetast. Waarschijnlijk door versleping van schimmelsporen via de broek van personeel. Op deze plekken verschijnt vaak de eerste aantasting in het gewas.



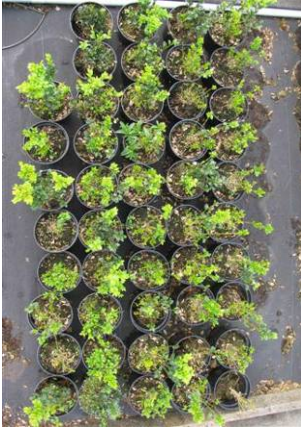
Afbeelding 39. Een beginnende aantasting in het looppad is zichtbaar als een vage lichtbruine verkleuring wanneer over het gewas heen wordt gekeken.





## Bijlage 2. Overzichtfoto's van bemestingsproef 2008

### Standaard bemest 5 g/l Osmocote Exact 5-6 mnd



herhaling 1



herhaling 2



herhaling 3



herhaling 4

### Extra kali : 5 g/l Osmocote Exact 5-6 mnd + 1,5 g/l Osmocote 0-0-42 5-6 mnd (is praktijkdosering)



herhaling 1



herhaling 2



herhaling 3



herhaling 4

### Extra kali : 5 g/l Osmocote Exact 5-6 mnd + 3 g/l Osmocote 0-0-42 5-6 mnd



herhaling 1



herhaling 2



herhaling 3



herhaling 4



## Bijlage 3 Data from CBS Fungi database: *Cylindrocladium buxicola*

Name	<i>Cylindrocladium buxicola</i> Henricot
Protolog	Henricot, B. & Culham, A. 2002, Mycologia 94(6): 993
TypeInfo	Holotype: leaves and shoots of <i>Buxus sempervirens</i> var. 'Suffruticosa', UK, Great Britain, herb: K (M) 68477
Conds for growth	OA, MEA
Latin diagnosis	<p><i>Cylindrocladium buxicola</i> B. Henricot, sp. nov. Figs. 7-13. Filum septatum (95-155 µm), hyalinum, in vesiculam late ellipsoideam apices papillato 6.5-11 µm diam terminans. Rami primarii 1-septati, (5-) 15-41 (-66) x 3-µm; rami secundarii non septati, (11-) 13-25 (-35) x 3-5 µm. Phialides reniformes, hyalinae, non septatae, (10-) 13-18 (-21) x 2.5-5 µm. Conidia cylindrica, hyalina, 1-septata, extremum rotundatis, 42-68 x 4-6 µm. Microconidiophora non observata. Perithecia non observata. Temperies ad crescendum necessaria. Minima temperies super 5 C, maxima temperies infra 35 C, optima temperies 25 C. HOLOTYPE UNITED KINGDOM. LINCOLNSHIRE: Boston. <i>Buxus sempervirens</i> var 'Suffruticosa'. Dec 1999, B. Henricot, Kew K(M) 68477, culture ex-type IMI 388262. Etymology. Named after its host.</p>
Reference to description	Henricot, B. & Culham, A. 2002, Mycologia 94(6): 993
Original description	<p><i>Cylindrocladium buxicola</i> B. Henricot, sp. nov. Figs. 7-13. Perithecia not found. Macroconidiophores comprised of a stipe, a sterile elongation and a penicillate arrangement of fertile branches. Stipe septate 95-155 µm long, hyaline, terminating in a broadly ellipsoidal vesicle with a pointed or papillate apex, 6.5-11 µm diam. In 97% (168/174) of the vesicles measured, the widest part is above the middle. Primary branches 1 septate or aseptate, (5-) 15-41 (-66) x 3-5 µm, secondary branches aseptate (11-) 13-25 (-35) x 3-5 µm, tertiary branches rare, each terminal branch producing 2-5 phialides; phialides reniform, hyaline, non-septate, (10-) 13-18 (-21) x 2.5-5 µm. Conidia cylindrical, rounded at both ends, straight, hyaline, 42-68 x 4-6 µm, 1 septate held in cylindrical clusters by colorless slime. Microconidiophores not observed. Chlamydo-spores dark, brown, thickened, formed in moderate numbers on carnation leaves, not on agar, aggregated to form microsclerotia. Cultural characteristics. Colony color (reverse) on MEA after 7 d at 25 C is fuscous black at the centre fading through sienna with a pale luteous halo (Rayner 1970). The growing mycelium at the margin is white. Cardinal temperatures. Minimum temperature above 5 C; maximum temperature below 30 C; optimum temperature 25 C. This is a low temperature species. <i>C. buxicola</i> is killed when left for 7 d at 33 C. Substrate. Living leaves and shoots of <i>Buxus</i> spp. Distribution. Western Europe, New Zealand</p>
Reference to description	Henricot, B. & Culham, A. 2002, Mycologia 94(6): 993
1 strain available:	
Strain nr	CBS 114417



## Bijlage 4. Buxusposter

# BLADVAL EN TAKSTERFTE IN BUXUS?

# AANPAKKEN!

**SCHADEBEELD**  
Het meest opvallende van de ziekte *Cylindrocladium buxicola* is dat aangetaste buxusplanten veel bladeren laten vallen. Vaak zijn dan al donkerbruine vlekken op de oudere bladeren aanwezig. De eerste symptomen zijn te zien als kleine donkere vlekjes op jonge uitgroeiende blaadjes, die later worden omgeven door een lichtbruine of gele ring. Een ander belangrijk schadebeeld is waar te nemen door de duidelijke zwarte langgestrekte vlekken op de stengels. Hiermee onderscheidt deze ziekte zich van de bekende taksterfte die wordt veroorzaakt door *Volutella buxi* (typische vorming van roze sporenhoopjes). De ziekte komt zowel op containerveelden als in de volle grond voor. Bij een hoge plantdichtheid zijn de eerste symptomen vaak niet direct te zien door het dichte gewas. Als de bladeren ineens van de takken vallen is de schade al aanzienlijk. Ditzelfde zien we ook bij bollen of andere grote buxusstruiken. Planten lijken zich na een aantasting te herstellen, vooral als accuraat wordt ingegrepen met een goede chemische bestrijding. Natuurlijk ontstaat wel een behoorlijke groeiachterstand of misvorming.



**VERSPREIDING**  
Nog niet alles van deze schimmel is bekend. In het belang van kwekers, afnemers van buxus-plantmateriaal en de geloofwaardigheid van de Nederlandse buxussekt is het van groot belang dat deze problematiek adequaat wordt aangepakt. De eerste meldingen van deze ziekte kwamen zo'n 10 jaar geleden uit Groot-Brittannië, later zijn ook meldingen vanuit Nieuw-Zeeland gekomen. Nu verspreidt de schimmel zich over het Europese continent. Aangenomen wordt dat de schimmel meekomt via de handel in buxusplanten. Over de precieze verspreiding van deze *Cylindrocladium*-schimmel is nog niet veel bekend. De schimmel kan al bij lage temperaturen voor aantasting zorgen. De schimmel ontwikkelt zich goed in het temperatuuraantal tussen 15-25°C, in combinatie met langdurige vochtige omstandigheden. De schimmel kan lange tijd overleven in afgevallen bladeren. Het lijkt erop dat de snelle verspreiding plaatsvindt via kortlevende sporen die worden gevormd in de bladvlekken en in de zwarte vlekken op de stengel. Verspreiding kan plaats vinden via de bodem, water (regenberegening), dieren, maar ook via kleding, snoeiapparatuur, stekmes en snoeischaar. Bedrijfshygiëne is daarom heel belangrijk. Zorg dat werkzaamheden in aangetaste percelen altijd gescheiden worden van werkzaamheden in schone percelen. Momenteel doet PPO nog onderzoek naar de werking van een reeks van gewasbeschermingsmiddelen tegen deze schimmel in Buxus. Dit onderzoek wordt gefinancierd door het Productschap Tuinbouw.

**KEURINGEN**  
Om planten te kunnen leveren is een Rapportage Keuringtoezicht (RKT) van Naktuinbouw vereist waarop specifiek staat vermeld 'Keuring Buxus, geen bijzonderheden'. De keurings-aanpak van Naktuinbouw is er op gericht dat de planten bij aflevering visueel vrij moeten zijn van aantasting. Alle buxusplanters worden deze zomer op zo kort mogelijke termijn bezocht. Indien de schimmel wordt aangetroffen zal de besmette gewasboek op het perceel enkele weken worden vastgelegd en worden aangehouden in de keuring om een adequaat bestrijdingsregime mogelijk te maken. Blijft gewenst resultaat uit, dan kan Naktuinbouw aanzeggen dat alle besmette planten met een buffer van 2 meter daaromheen moeten worden vernietigd. Op dit moment geldt een afleveringsverbod voor alle gewasboeken met symptomen van *Cylindrocladium buxicola*.

**BESTRIJDING**  
Ondanks hygiënisch werken kunnen toch besmettingen op percelen worden aangetroffen. Wees alert en grijp direct in!  
• Verwijder en vernietig de aangetaste bladeren en takken tot op het gezonde hout.  
• Verwijder bij een zware aantasting de gehele plant.  
• Doe de verwijderde takken en planten ter plekke in een plastic zak en verwijder deze van het bedrijf; zorg dat dit materiaal niet in het composteerproces terecht komt.  
• Chemische bestrijding van *Cylindrocladium buxicola* is mogelijk door gebruik van Topsin M afwisselend met Mirage Plus in blokken van twee tot drie bespuitingen. Helaas werken deze middelen niet altijd adequaat. Naast deze standaardmiddelen blijken ook Ortiva, Flint en Kenbyo een goede werking tegen *Cylindrocladium* te hebben. In verband met resistentiegevoeligheid kunnen deze middelen het beste worden gemengd met bijvoorbeeld Daconil of Maneb. Bij aantasting kunnen de bespuitingen worden uitgevoerd om de 10-14 dagen. Bij zware aantastingen is het aan te bevelen de tijd tussen bespuitingen te verkorten naar 7 dagen.  
• Zorg voor een goede spuittechniek zodat het middel goed in het gewas doordringt.  
• Belangrijk is om een goede bestrijdingstrategie te ontwikkelen.  
• Het is aan te bevelen om voor een succesvolle behandeling contact op te nemen met een bedrijfsadviseur.



*Bladvlekken en taksterfte in Buxus sempervirens veroorzaakt door Cylindrocladium buxicola.*  
Foto's: PPO

**PROBEER BESMETTINGEN TE VOORKOMEN**  
Natuurlijk verdient het allererst aanbeveling om aantasting door *Cylindrocladium* te voorkomen. Gebruik schoon uitgangsmateriaal. Probeer indien mogelijk er voor te zorgen dat planten op kunnen drogen, met name onder in het gewas. Neemt u zo veel mogelijk de hygiënerogels in acht. Gebruik ontsmet gereedschap en ontsmettingsmiddelen, en was regelmatig uw handen. Let er op dat u en uw medewerkers niet met kleding en schoenen van besmette naar schone percelen gaan. Verwijder aangetaste planten en afgevallen blad zo spoedig mogelijk in een plastic zak.

**MEER INFORMATIE**  
Voor de meest actuele informatie: Zie [www.nbv.nl](http://www.nbv.nl). Op de site van De Boomkwekerij is een fotoreportage van *Cylindrocladium* in Buxus te zien. U kunt voor meer informatie ook contact opnemen met de NBvB (030-6572633) of met Fons van Kuik of Pieter van Daltsen van PPO (0252-462121).



**AAN DEZE POSTER HEBBEN MEEGEWERKT:**  
NBvB Cultuurgroep voor Siergewassen in pot en vollegrond: Henk van der Smit, Bert Cats, Jan van Leeuwen, Anneke van Dijk en John Janssen  
PPO: Fons van Kuik en Pieter van Daltsen  
PT: Hester van Gent en Kim Zuidervliet  
Anthos: Matthijs Mesken en Hendrik Jan Kloosterboer  
Naktuinbouw: John van Ruiten en Gerard Bruijstens  
De bedrijfsadviseurs Wilco Dorrestein, René Jochems, René van Tol en Wilma Windhorst.  
Realisatie en ontwerp: All-Round Communications, Boskoop / Multicolours, Alphen aan den Rijn



DE VERSPREIDING VAN DEZE POSTER IS FINANCIËEL MOGELIJK GEMAAKT DOOR HET PRODUCTSCHAP TUINBOUW

Poster is te downloaden van:

[http://www.gezondeboomteelt.nl/achtergrondinformatie/A2\\_poster\\_NBvB\\_Buxus.pdf](http://www.gezondeboomteelt.nl/achtergrondinformatie/A2_poster_NBvB_Buxus.pdf)