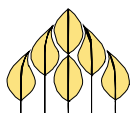


# Fusarium in Nederland: inventarisatie en identificatie

C. Waalwijk, T. Hesselink, Ph.M. de Vries, B.H. de Haas, P. Kastelein,  
E.C.P. Verstappen, T.A.J. van der Lee & G.H.J. Kema







# Fusarium in Nederland: inventarisatie en identificatie

C. Waalwijk, T. Hesselink, Ph.M. de Vries, B.H. de Haas, P. Kastelein,  
E.C.P. Verstappen, T.A.J. van der Lee & G.H.J. Kema

© 2000 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Plant Research International B.V.

## **Plant Research International B.V.**

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen  
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen  
Tel. : 0317-477000  
Fax : 0317-418094  
E-mail : [post@plant.wag-ur.nl](mailto:post@plant.wag-ur.nl)  
Internet : <http://www.plant.wageningen-ur.nl>

# Inhoudsopgave

	pagina
Inleiding	1
Materialen en methoden	2
Isolatie van de schimmels	2
Identificatie met PCR	2
Resultaten	3
Herkomst van de isolaten	3
Specificiteit van de PCR reactie	3
<i>Fusarium</i> soorten op tarwe	5
Conclusies en aanbevelingen	7
Literatuur	8



# Inleiding

De afgelopen jaren heeft *Fusarium* in de Verenigde Staten grote verliezen veroorzaakt in de graanteelt die tot een economische schade van 3 miljard US\$ is opgelopen. Deze schade is vooral veroorzaakt door *F. graminearum*. In de periode 1997-1999 traden ook alarmerende *Fusarium* epidemieën op in Noord-West Europa. Vanuit het oogpunt van voedselveiligheid en resistentieveredeling is het van groot belang te weten welke *Fusarium* soorten deze epidemieën veroorzaakten. Algemeen werd aangenomen dat *F. culmorum* de belangrijkste *Fusarium* soort op gramineeën in West-Europa is (De Nijs, 1998). In het meer mediterrane gebied domineert *F. graminearum* en in Noord-Europa komen vooral *F. sporotrichioides* en *F. poae* voor. In Nederland zijn de laatste surveys uitgevoerd door De Nijs (1998) en Sniijders (1996a, 1996b), waarbij de situatie in de jaren 1991 en 1993 en respectievelijk 1993-1995 is bekeken. Deze surveys betroffen m.n. een morfologische typering van de isolaten. Sindsdien zijn betrouwbare moleculaire detectiemethoden ontwikkeld en zijn er bovendien signalen dat er een langzame verschuiving in de *Fusarium* populatiesamenstelling optreedt, waarbij *F. culmorum* wordt verdrongen door *F. graminearum*. Deze ontwikkelingen vormden de aanleiding voor een nieuwe nationale *Fusarium* survey die in opdracht van het Productschap voor Granen, Zaden en Peulvruchten door Plant Research International werd uitgevoerd. De resultaten van deze survey zijn in deze nota weergegeven.

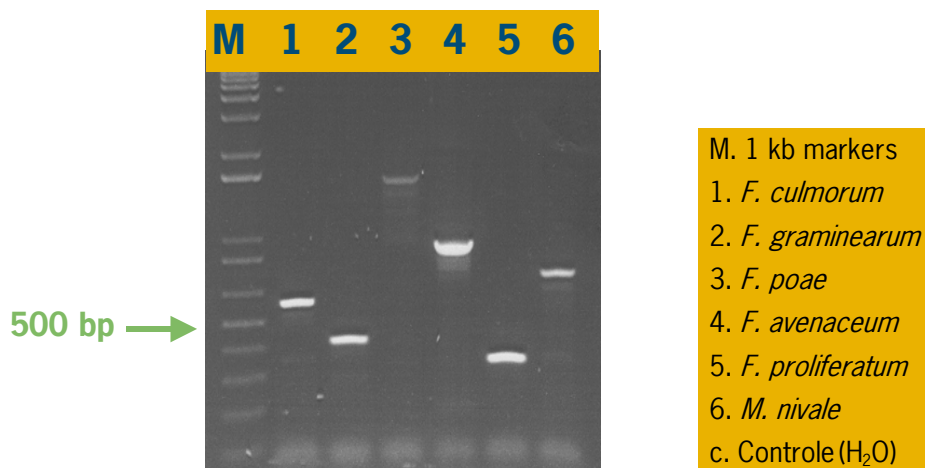
## Materialen en methoden

### Isolatie van de schimmels

Van 40 percelen uit het gehele land zijn aren verzameld die een zichtbare *Fusarium* aantasting vertoonden. Per monster zijn verschillende aren genomen waarvan 1-2 korrels per aar uitwendig werden ontsmet door dompeling in 70% alcohol en daarna 2 minuten in 2% chloor (natriumhypochloriet). Vervolgens werden de korrels individueel 3 maal gewassen in steriel water en uitgelegd op een PDA plaat met tetracycline (10 mg/l) en streptomycine (100 mg/l) die gedurende 5 dagen werd geïncubeerd bij 20 °C. Daarna werd van elke korrel met mycelium uitgroei een plukje overgezet op een nieuwe PDA plaat die onder dezelfde omstandigheden werd geïncubeerd.

### Identificatie met PCR

Type-isolaten van de te toetsen soorten *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. proliferatum* en *Microdochium nivale* (voorheen *Fusarium nivale*) werden uit bestaande collecties van Plant Research International verkregen. Uit deze soorten werd DNA geïsoleerd, dat werd gebruikt als check en voor het ontwikkelen van een methode waarbij specifieke primers voor elke soort werden getoetst op specificiteit en het ontbreken van kruisreacties met de andere soorten. Door de optimale combinatie van primers te kiezen wordt voor elke *Fusarium* soort een fragment met een eigen unieke grootte verkregen (Figuur 1). Hierdoor is eenduidige typering van de veldisolaten mogelijk. DNA uit de veldisolaten werd verkregen m.b.v. de Pure-Gene extractie kit.



*Figuur 1.* PCR van 14 PCR primers met controle DNAs van de *Fusarium* soorten *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. proliferatum* en *Microdochium nivale*. *F. culmorum* geeft een fragment van 570 bp, *F. graminearum* van 450 bp, *F. poae* één van 1600 bp, *F. avenaceum* een band van 920 bp, *F. proliferatum* een van 350 bp en *Microdochium nivale* een band van 750 bp.

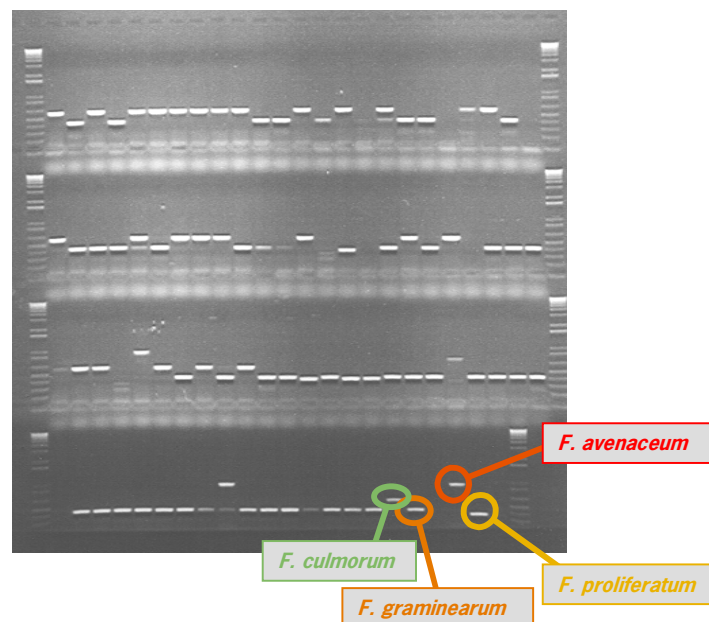


## Resultaten

### Herkomst van de isolaten

De bemonsterde percelen zijn te zien in Tabel 1. Hierbij is een regioindeling gemaakt volgens De Nijs (1998) om een goede vergelijking mogelijk te maken. De percelen zijn daarom ingedeeld in 5 groepen, te weten: A) Zeeland; B) Oost-Nederland, vooral Achterhoek; C) Polders (N.O.-Polder, Flevoland en de Wieringermeer; D) Noord-Oost Nederland en E) Zuid-Nederland, m.n. (Zuid)-Limburg.

Opwerking van schimmel uit de aren van deze percelen leidde tot 243 zuivere isolaten, waarbij iets meer isolaten afkomstig waren uit Zeeland, de polders en Oost-Groningen. Van alle isolaten is DNA verkregen van een goede kwaliteit, zodat de PCR reacties in het overgrote gedeelte (>90%) van de monsters een signaal gaf. Een voorbeeld van de resultaten met een willekeurige serie isolaten is te zien in Figuur 2.



*Figuur 2. Voorbeeld van PCR reacties op een willekeurige set van veldisolaten van Fusarium spp. Als referentie materiaal is steeds een serie meegenomen van de te toetsen soorten: F. avenaceum, F. culmorum, F. graminearum, F. poae, F. proliferatum en Microdochium nivale. Vier van deze soorten zijn aangegeven.*

### Specificiteit van de PCR reactie

Primers ontworpen voor elk van de te onderzoeken *Fusarium* soorten werden getest met DNA van de corresponderende soort en de specificiteit werd bepaald door te testen op DNA van alle andere soorten. Het verschil in grootte voor de verschillende soorten, maakt het mogelijk de toetsing van een onbekend isolaat eenduiding te interpreteren (Figuur 1).

Tabel 1. *Herkomst van de isolaten ingedeeld naar plaats, regio en tarveras.*

Regio <sup>1</sup>	Plaats	Regio	Ras
A	Schoondijke	Zeeuws-Vlaanderen	Vivant
A	Schoondijke	Zeeuws-Vlaanderen	Residence
A	Arnemuiden	N/Z-Beveland	Mengsel
A	Geersdijk	N/Z-Beveland	Residence
A	Nieuwerkerk	Schouwen-Duiveland	Ritmo
A	Hank	Hoeksewaard	Drifter
A	Mookhoek	Hoeksewaard	Residence
A	Mookhoek	Hoeksewaard	Residence
A	Dinteloord	Dintelmond	Residence
B	Brummen	Achterhoek	Vivant
B	Almen	Achterhoek	Ritmo
B	Laren	Achterhoek	Tower
B	Andelst	Betuwe	Ritmo
B	Andelst	Betuwe	Vivant
C	Zeewolde	Z-Flevo	Renan
C	Zeewolde	Z-Flevo	Renan
C	Zeewolde	Z-Flevo	Vivant
C	Zeewolde	CZ	Residence
C	Biddinghuizen	O-Flevo	Vivant
C	Biddinghuizen	O-Flevo	Residence
C	Swifterbant	O-Flevo	Drifter
C	Nagele	NOP	Vivant
C	Nagele	NOP	Vivant
C	Emmeloord	NOP	Residence
C	Middenmeer	Wieringermeer	Drifter
C	Middenmeer	Wieringermeer	Residence
C	Slotdorp	Wieringermeer	Vivant
D	Emmen	NON	Vivant
D	Valthermond	NON	Drifter
D	Valthermond	NON	Tower
D	Munnekezijl	W-Gr.	Ritmo
D	Hornhuizen	W-Gr.	Vivant
D	Wehe den Hoorn	W-Gr.	Residence
D	Holwierde	O-Gr.	Vivant
D	Woldendorp	O-Gr.	Residence
D	Nieuw Beerta	O-Gr.	Drifter
D	Bellingwolde	O-Gr.	Vivant
E	Voerendaal	Limburg	Vivant
E	Voerendaal	Limburg	Vivant
E	Schinnen	Limburg	Vivant

<sup>1</sup>Regio's zijn gekozen in overeenstemming met De Nijs et al. (1996).

## *Fusarium* soorten op tarwe

De verkregen isolaten (n=243) werden allen onderworpen aan een diagnostische PCR reactie. Zoals uit Tabel 2 blijkt komt *F. graminearum* verreweg het meest voor (n=146) met *F. culmorum* als tweede (n=45) en *M. nivale* als derde (n=31). De overige soorten komen slechts zeer sporadisch voor: 3x *F. avenaceum* en 3x *F. proliferatum* en geen enkele *F. poae*. Wanneer de frequentie van elk isolaat per regio wordt bekeken (Tabel 2 en Figuur 3), blijkt dat *F. graminearum* overal meer dan de helft van de isolaten uitmaakt, van 54% in zowel Zeeland als de polders tot 84 % in Zuid-Limburg. *F. culmorum* wordt meer gevonden in Zeeland (35%) dan in Limburg (10%) maar *M. nivale* komt daarentegen meer in de polders (20%) voor.

Een vergelijking per ras (Tabel 3) geeft het volgende beeld. Op de rassen Vivant, Residence, Drifter en Ritmo wordt *F. graminearum* als meest prominente soort aangetroffen (>50%) terwijl *F. culmorum* (9-22%) en *M. nivale* (10-16%) in ongeveer gelijke frequenties optreden. *F. avenaceum* en *F. proliferatum* worden slechts zelden op deze rassen aangetroffen. De verdeling van *Fusarium* soorten op de rassen Renan en Tower vertoont een afwijkend beeld dat mogelijk mede wordt veroorzaakt door de kleinere monstergrootte. Niettemin lijkt er een tendens te zijn dat *cv.* Renan met name door *M. nivale* (64%) en weinig door *F. graminearum* wordt aangetast. Het omgekeerde beeld werd waargenomen op *cv.* Tower. *M. nivale* werd in deze survey niet aangetroffen op *cv.* Ritmo en Tower. Tenslotte lijkt *cv.* Ritmo verhoudingsgewijs vaker gekoloniseerd te worden door *F. culmorum* en komt *F. graminearum* meer dan gemiddeld voor op *cv.* Tower.

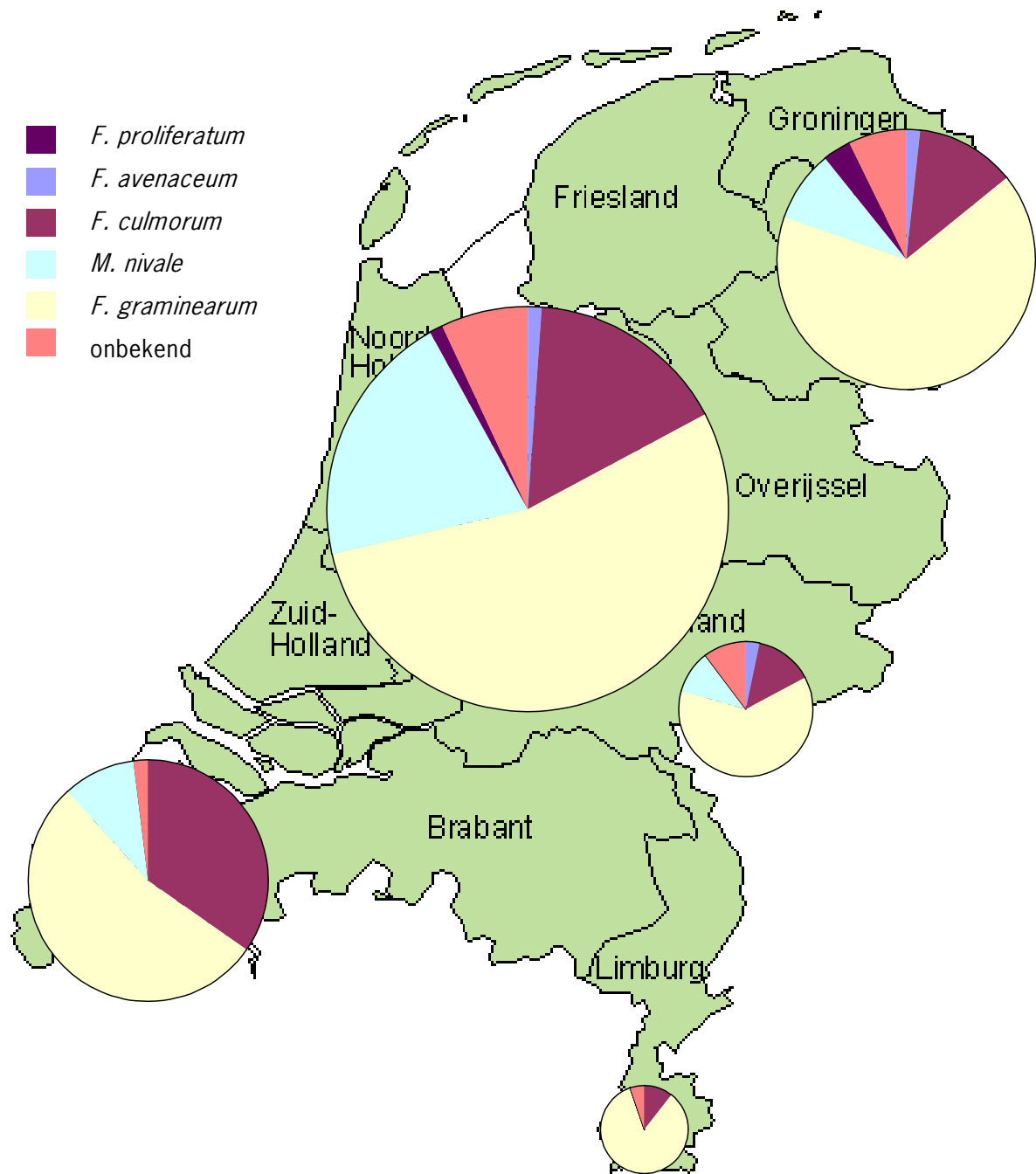
Tenslotte is bekeken of op één en dezelfde aar meerdere *Fusarium* soorten kunnen voorkomen. Van 61 aren uit het totaal van 182 bemonsterde aren werden twee isolaten geïdentificeerd. In 31 aren werd op beide korrels dezelfde *Fusarium* soort aangetroffen (meestal *F. graminearum*). In de overige aren werden verschillende *Fusarium* soorten aangetroffen.

Tabel 2. Voorkomen van *Fusarium* soorten in verschillende gebieden.

Regio	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>M. nivale</i>	<i>nivale</i>	<i>F. proliferatum</i>	Onbekend	
A	0	18	28	5		0	1	<b>52</b>
B	1	4	18	3		0	3	<b>29</b>
C	1	14	47	18		1	6	<b>87</b>
D	1	7	37	5		2	4	<b>56</b>
E	0	2	16	0		0	1	<b>19</b>
Totaal	<b>3</b>	<b>45</b>	<b>146</b>	<b>31</b>		<b>3</b>	<b>15</b>	<b>243</b>

Tabel 3. Voorkomen van *Fusarium* soorten op diverse graan-rassen.

Ras	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>M. nivale</i>	<i>nivale</i>	<i>F. proliferatum</i>	Onbekend	
Vivant	2	13	59	9		1	6	<b>90</b>
Residence	0	9	43	8		0	3	<b>63</b>
Drifter	0	8	21	6		1	1	<b>37</b>
Ritmo	1	9	13	0		1	2	<b>26</b>
Renan	0	1	2	7		0	1	<b>11</b>
Tower	0	1	7	0		0	2	<b>10</b>
Mengsel	0	4	1	1		0	0	<b>6</b>
Totaal	<b>3</b>	<b>45</b>	<b>146</b>	<b>31</b>		<b>3</b>	<b>15</b>	<b>243</b>



Figuur 3. Frequenties van Fusarium soorten in de verschillende regio's van Nederland in het jaar 2000.

## Conclusies en aanbevelingen

Uit de onderhavige survey van 40 percelen verspreid over geheel Nederland, blijkt dat *F. graminearum* een veel prominenter rol speelt dan voorheen is aangenomen (De Nijs *et al.*, 1996; De Nijs, 1998; Snijders, 1996a, 1996b). Deze nota geeft een eenmalige blik op de situatie in het jaar 2000 en uit voornoemde studies is gebleken dat verschillen van jaar tot jaar groot kunnen zijn. Of er sprake is van een verschuiving in de *Fusarium* populatie van *F. culmorum* naar *F. graminearum* kan niet worden vastgesteld. Het is zeker van belang dit na te gaan in vervolgonderzoek. Hierin zal ook aandacht moeten worden besteed aan het effect van competitie tussen *Fusarium* soorten binnen een aar op het voorkomen en de niveaus van mycotoxines, m.n. DON. De resultaten van deze survey geven derhalve niet meer aan dan een trend. Om tot gedegen uitspraken te komen dient een groter aantal percelen te worden bemonsterd en is het wenselijk teeltaspecten, zoals voorvrucht en fungiciden-gebruik, in de analyses mee te nemen. Inzicht in de ontwikkeling van én verschuivingen in populaties gedurende het seizoen kunnen bijdragen aan een verantwoorde teelt van granen in het algemeen en tarwe in het bijzonder.

## Literatuur

De Nijs., M., P. Soentoro, E.D.V. Asch, H. Kamphuis, F.M. Rombouts & S.H.W. Notermans, 1996.  
Fungal infection and presence of deoxynivalenol and zearalenone in cereals grown in the Netherlands. *J. Food Protection* 59: 772-777.

De Nijs., M., 1998.  
Public health aspects of Fusarium mycotoxins in food in The Netherlands: A risk assessment.  
Ph.D. Thesis, 140 pp.

Snijders, C.H.A., R.A. Samson, E.S. Hoekstra, T. Ouellet, J.D. Miller, P.C.E.M. de Rooij van der Goes, A.J.M. Baar, A.E.J. Dubois & H.F. Kauffman, 1996a.  
Analysis of Fusarium causing dermal toxicosis in marram grass planters. *Mycopathologia* 135: 119-128.

Snijders, C.H.A. & G.D. Winkelhorst, 1996b.  
An artificial inoculation method to screen for resistance to Fusarium-rot in grasses. *IOBC-WPRS Bulletin* 19: 265-271.