PLANT RESEARCH INTERNATIONAL
WAGENINGEN UR

Fusarium in wintertarwe (2007 en 2008)

Inventarisatie, identificatie en kwantificering van nieuwe soorten

Cees Waalwijk, Jürgen Köhl, Ineke de Vries & Theo van der Lee



Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit

PRODUCTSCHAP AKKERBOUW

Rapport 272

PLANT RESEARCH INTERNATIONAL
WAGENINGEN UR

Fusarium in wintertarwe (2007 en 2008)

Inventarisatie, identificatie en kwantificering van nieuwe soorten

Cees Waalwijk, Jürgen Köhl, Ineke de Vries & Theo van der Lee

Plant Research International B.V., Wageningen
September 2009

Rapport 272

© 2009 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.

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld. Bij toezending wordt een factuur toegevoegd; de kosten (incl. verzend- en administratiekosten) bedragen € 50 per exemplaar.

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 – 48 60 01
Fax : 0317 – 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

Conclusies en Aanbevelingen 1

Achtergrond 3

Probleemstelling 5

Werkwijze 7

Projectdoelen 9

Resultaten 11

1. Identificatie van onbekenden isolaten uit de collecties 2000 en 2001 11
2. Ontwikkeling van een PCR methode voor de identificatie van het chemotype van *F. graminearum* en *F. culmorum* 13
3. Bepaling van het chemotype van isolaten uit de 2000 en 2001 collecties 14
4. Verzamelen van referentie-isolaten van *F. equiseti*, *F. langsethiae* en *F. sporotrichioides* van collega onderzoekers uit het buitenland 15
5. Opbouw van een collectie van Nederlandse isolaten in 2008 16
6. Opbouw van een collectie van Franse en Duitse isolaten 17
7. Ontwikkeling van een specifieke PCR voor T2 en HT2 producerende schimmels 18
8. Identificatie van isolaten uit Nederland, Frankrijk en Duitsland mbv soortspecifieke PCRs 20
9. Bepaling van het chemotype van *F. graminearum* en *F. culmorum* isolaten van de 2007/2008 collectie 22
10. Ontwikkeling van een TaqMan voor *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides en F. equiseti* 24

Literatuur 27

Bijlage I. Primers en probes die in dit onderzoek werden gebruikt 1 p.

Conclusies en Aanbevelingen

Conclusies en producten

- De T2 & HT2 producerende schimmel *F. langsethiae* werd in 2001 voor het eerst waargenomen in Nederland. In 2008 werd slechts één isolaat van *F. langsethiae* in Nederland gevonden. Daarnaast werd één *F. langsethiae* isolaat in Frankrijk aangetroffen. Deze lage aantallen (< 1%) suggereren dat *F. langsethiae* geen probleem vormt in de teelt van tarwe. Ook *F. sporotrichioides* werd zeer beperkt aangetroffen (1x NL, 2x F en 1x Dld).
- De samenstelling van de *Fusarium* soorten die FHB veroorzaken lijkt variabeler en complexer dan eerder aangenomen. Per perceel kunnen er grote verschillen zijn in het aandeel van bijvoorbeeld *F. graminearum* en/of *F. culmorum.* Daarnaast is er in de inventarisatie van 2008 weinig *F. avenaceum* aangetroffen.
- Ook de veronderstelde verschuiving van toxine productie lijkt veel ingewikkelder in elkaar te steken dan eerder aangenomen en verschilt per soort. Bij *F. graminearum* worden vooral 15-AcDON producenten aangetroffen, terwijl het overgrote merendeel van de *F. culmorum* isolaten 3-AcDON produceert. Tegen de verwachting in is het percentage *F. culmorum* isolaten dat NIV produceert in de screening van 2007-2008 lager dan in de screening van 2000-2001.
- Er zijn kwantitatieve TaqMan PCR's ontwikkeld voor *F. langsethiae* en *F. sporotrichioides*. Deze pathogenen produceren de toxines T2 en HT2 en kunnen met deze qPCR betrouwbaar gekwantificeerd worden in graanmonsters.
- Van *F. equiseti* is geen TaqMan ontwikkeld, omdat dit niet één soort, maar een complex van tenminste vijf (nader te beschrijven) soorten blijkt te zijn.

Aanbevelingen

- In alle in dit onderzoek onderzochte velden is *Fusarium* aangetroffen en dit in steeds wisselende soortsamenstellingen. Ook in de kwantitatieve analyses van monsters uit Frankrijk in 2007 bleken alle velden gecontamineerd met *Fusarium.* Gezien de hoge incidentie en het belang van de toxine problematiek raden we aan telers een beter inzicht te geven in de *Fusarium*-toxine problematiek en de interventie mogelijkheden. We raden aan om de brochure Fusarium in granen uit 2000 te actualiseren en uit te breiden. Dit kan door de bij PRI en PPO beschikbare kennis te bundelen in een boekje zoals gebeurd in het masterplan phytophthora en te verspreiden via reguliere uitgifte als boekje en via kennisakker.
- De moleculaire methodieken die de laatste jaren zijn ontwikkeld voor *Fusarium* en die tegen steeds lagere kostprijs kunnen worden uitgevoerd (zie ook dit rapport) zouden breder ingezet kunnen worden bijvoorbeeld bij onderzoek naar de effectiviteit van beheersmaatregelen.

Suggesties voor vervolg onderzoek

- De problematiek rond T2 en HT2 lijkt zich vooral toe te spitsen op gerst (en haver). Het verdient aanbeveling de hier beschreven inventarisatie van wintertarwe ook op brouwgerst uit te voeren.
- Gezien de afwijkende fysiologie van *F. langsethiae* is deze soort in het verleden mogelijk over het hoofd gezien. Meldingen uit het buitenland geven aanleiding ook in Nederland *F. langsethiae* te gaan kwantificeren.
- Samen met de twee in dit rapport beschreven TaqMans zijn er nu qPCRs voor acht verschillende Fusarium soorten beschikbaar. Integratie van deze individuele toetsen op een multiplex systeem betekent een grote efficiency slag. Het Biotrove systeem zou hiervoor wellicht een geschikt platform zijn. Met het Biotrove systeem kunnen de acht kwantitatieve TaqMans simultaan uitgevoerd worden op 3 x 96 monsters tegen relatief lage kosten.
- De complexe structuur en dynamiek van Fusarium soorten en de verschillende toxines die deze soorten produceren maakt een geregelde inventarisatie van deze soorten en de door de isolaten geproduceerde toxines noodzakelijk. Dit laatste kan het best gebeuren op Europees niveau.

Achtergrond

Fusarium aarziekte of kafjesrood is vanwege de opbrengstderving een probleem in granen en maïs. Feitelijk wordt Fusarium aarziekte veroorzaakt door een complex van schimmels dat in steeds andere samenstelling het gewas belaagt. Van recenter datum is de zorg over het vermogen van verschillende Fusarium soorten om mycotoxinen te produceren. Deze secundaire metabolieten vormen reeds in geringe hoeveelheden een bedreiging voor de gezondheid van mens en dier. De Europese Commissie heeft daarom actielimieten vastgesteld voor een aantal mycotoxinen, terwijl voor enkele andere deze regels aanstaande zijn (Verordening (EG) nr. 1881/2006; Verordening (EG) nr. 1126/2007). Vanwege de steeds strengere normen voor diverse mycotoxinen in voedsel en voer zijn bij ongunstige teeltcondities partijen niet vermarktbaar en kan een tekort aan het te verwerken graanproduct ontstaan.

Probleemstelling

In 2000 and 2001 heeft Plant Research International inventarisaties van Fusarium schimmels in tarwe uitgevoerd. Een van de belangrijkste conclusies uit deze inventarisaties is dat *Fusarium graminearum* een veel groter aandeel in het Fusarium complex heeft dan voorheen was vastgesteld. In de 90-er jaren werd vooral *F. culmorum* aangetroffen maar 10 jaar later bleek meer dan 50% van de geïsoleerde stammen *F. graminearum* te zijn (Waalwijk *et al.*, 2003). Recente gegevens tonen bovendien aan dat er niet alleen sprake is van verschuivingen tussen soorten, maar dat ook binnen één en dezelfde soort verschuivingen kunnen plaatsvinden, waarmee tegelijkertijd ook verschuivingen in de mycotoxinen optreden. Zo is in Noord Amerika onlangs vastgesteld dat *F. graminearum* isolaten, die 15-AcDON produceren vervangen lijken te worden door *F. graminearum* isolaten, die het meer toxische 3-AcDON (zie Tabel 1) produceren. Voorts lijkt een opmars van producenten van het nog toxischer NIV aanstaande (Ward *et al.*, 2007). De grootste aandacht voor Fusarium mycotoxinen gaat uit naar deoxynivalenol (DON). In enkele ons omringende landen is recent vastgesteld dat naast de in 2000 en 2001 aangetoonde Fusarium soorten ook andere soorten, met hun eigen karakteristieke mycotoxinen, in belang toenemen. Vooral de productie van T-2 en HT-2 toxinen vormt een verdere bedreiging, omdat deze toxinen een veel hogere toxiciteit bezitten (zie Tabel 1). Hoewel voor T-2 en HT-2 nog geen actielimieten zijn vastgesteld, is de verwachting dat, gezien de hogere toxiciteit van T- en HT-2, deze actielimieten lager zullen zijn dan voor DON. Doelstelling van het project was derhalve om antwoord te krijgen op de volgende vragen:

- Zet de eerder waargenomen verschuiving binnen het FHB complex door en is er ook sprake van een verschuiving tussen producenten van verschillende mycotoxinen?
- Komen er naast de bekende soorten ook *'nieuwe'* soorten voor en is dit vergelijkbaar met de situatie in Duitsland en Frankrijk?

Werkwijze

Het voorgestelde onderzoek heeft tot doel om na te gaan welke Fusarium soorten er in wintertarwe voorkomen in Nederland, Duitsland en Frankrijk. Het voorgestelde researchplan is in twee fasen opgedeeld. In 2007 zullen nieuwe technologieën worden ontwikkeld voor de karakterisatie van *Fusarium* isolaten en worden toegepast op de Fusarium collecties van 2000 en 2001. In 2008 zal vooral aandacht worden besteed aan de opbouw van een nieuwe Fusarium collectie die een goede representatie zal zijn van de populaties die op wintertarwe voorkomen in Nederland, Duitsland en Frankrijk. Deze collectie zal vervolgens worden gekarakteriseerd met soort-specifieke DNA methoden. Tevens zal in 2008 worden bepaald welke mycotoxinen deze isolaten produceren.

Projectdoelen

1. Identificatie van isolaten uit de 2000 en 2001 collecties die als onbekend werden getypeerd.
2. Ontwikkeling van een PCR methode voor de identificatie van het chemotype van *F. graminearum* en *F. culmorum.*
3. Bepaling van het chemotype van isolaten uit de 2000 en 2001 collecties.
4. Verzamelen van referentie isolaten van *F. equiseti*, *F. langsethiae* en *F. sporotrichioides* van collega onderzoekers uit het buitenland.
5. Opbouw van een collectie van Nederlandse isolaten in 2008.
6. Opbouw van een collectie van Franse en Duitse isolaten.
7. Ontwikkeling van een specifieke PCR voor T2 en HT2 producerende schimmels.
8. Identificatie van isolaten uit Nederland, Frankrijk en Duitsland mbv soortspecifieke PCRs.
9. Bepaling van het chemotype van *F. graminearum* en *F. culmorum* isolaten van deze 2007/2008 collectie.
10. Ontwikkeling van een TaqMan voor *F. equiseti*, *F. langsethiae* en *F. sporotrichioides.*

Tabel 1. Welke mycotoxinen worden geproduceerd door welke Fusarium soorten?

Toxinegroep	Mycotoxine	Werking	Soort
Type A trichothecenen	T-2 toxine, HT-2 toxine	acute toxiciteit, immuno-toxiciteit	*F. equiseti* *F. sporotrichioides* *F. langsethiae*
Type B trichothecenen	Deoxynivalenol, (3AcDON/15AcDON) Nivalenol	acute toxiciteit, braken	*F. graminearum* *F. culmorum* *F. poae* *F. equiseti*
	Moniliformin	cardio-toxisch	*F. tricinctum* *F. avenaceum*
	Zearalenone	estrogene werking	*F. graminearum* *F. culmorum* *F. equiseti*
Vaak geassocieerd met Fusarium aarziekte, maar produceert geen mycotoxinen			*Microdochium nivale*

Resultaten

1. Identificatie van onbekenden isolaten uit de collecties 2000 en 2001

In 2000 en 2001 werden respectievelijk 243 en 147 isolaten verkregen van elk 40 percelen verdeeld over vijf regio's in Nederland (PRI nota #54). Deze isolaten konden voor het merendeel worden getypeerd, maar van 15 isolaten uit 2000 en van drie isolaten uit 2001 kon de identiteit destijds niet worden vastgesteld. Sinds de verschijning van dit rapport en de wetenschappelijke publicatie over dit onderzoek (Waalwijk *et al.*, 2003) hebben diverse ontwikkelingen op het terrein van de taxonomie van *Fusarium* spp. plaatsgevonden (O'Donnell *et al.,* 2004; 2006). Met name de onderverdeling van *F. graminearum* in meerdere soorten heeft een grote vlucht genomen. *F. graminearum* blijkt uit een complex van soorten te bestaan, die van elkaar verschillen in (voorkeur voor) het type van mycotoxine dat wordt geproduceerd, het gewas waarop zij voorkomen en in hun geografische verspreiding. Zo bleek uit een uitvoerige studie op gerst in China dat daar vooral *F. asiaticum* werd aangetroffen. Voorts bleek dat isolaten van deze soort afkomstig uit bergachtige gebieden uitsluitend nivalenol (NIV) produceren, terwijl isolaten afkomstig uit de laagvlakten in merendeel deoxynivalenol (DON) produceren (Yang *et al.,* 2008). Het was opvallend dat naast deze NIV producerende *F. asiaticum* isolaten in dezelfde velden ook *F. graminearum* werd aangetroffen. Deze *F. graminearum* isolaten produceren echter geen NIV, maar DON. Kennelijk kunnen deze soorten naast elkaar in dezelfde velden voorkomen en heeft het mycotoxine dat zij produceren een verschillende rol in de epidemiologie van beide schimmels. Een dergelijke conclusie werd ook door Maier en medewerkers getrokken na vergelijking tussen het ziektebeeld van DON- en NIV-producenten op tarwe, gerst en maïs (Maier *et al.,* 2006).

Met behulp van onze toegenomen kennis op taxonomisch gebied, zijn de collecties van 2000 en 2001 opnieuw bekeken. Zoals in Tabel 2 wordt weergegeven, zijn alle isolaten nu wel getypeerd, waarbij vooral opvalt dat van de 2000 collectie alle isolaten konden worden ondergebracht in de *'traditionele'* soorten. Van de 15 onbekende isolaten (anno 2003) werden er twee alsnog als *F. graminearum* geïdentificeerd. Drie andere bleken *Microdochium nivale* te zijn, terwijl de overige 10 als *Ascochyta* spp. (n=2) of *Ascochyta skagwayensis* (n=1) of als *Epicoccum* spp. (n=7) werden gedetermineerd. Daarnaast bleken drie isolaten abusievelijk als *F. proliferatum* te zijn geïdentificeerd, dit bleken *F. graminearum isolaten* te zijn. Tenslotte waren drie *F. graminearum* isolaten ten onrechte getypeerd als *F. graminearum* aangezien dit feitelijk *F. cerealis* (syn.: *F. crookwellense*) isolaten bleken te zijn.

Tabel 2. Verdeling van Fusarium spp. in Nederland in 2000 en 2001.

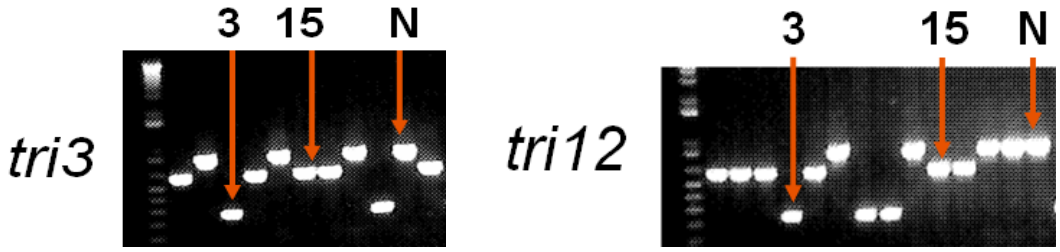
Species	2000		2001	
	oud	nieuw	oud	nieuw
Fusarium avenaceum	3	3	1	1
F. cerealis		3		3
F. culmorum	45	45	43	45
F. graminearum	146	148	85	72
M. nivale	31	34	10	10
FG complex [a]				4
F. langsethiae				1
F. poae			3	3
F. proliferatum	3			
F. vorosii				4
F. chlamydosporum				1
Ascochyta		3		
Epicoccum		7		
Alternaria				1
onbekend	15		3	
Totaal	243	243	145	145

[a] *Deze isolaten reageren wel met de primers, specifiek voor het F. graminearum complex, maar niet met primers, die specifiek zijn voor individuele soorten. Wellicht zijn dit leden van een nog te duiden populatie.*

In 2001 is de situatie complexer, vooral omdat dan *'nieuwe'* soorten worden aangetroffen. Dit betreft opnieuw *F. cerealis* (n=3), maar daarnaast ook *F. vorosii*, één van de nieuwe soorten binnen het *F. graminearum* complex (n=4). Voorts werden vier isolaten gevonden, die voorlopig als *F. graminearum* complex dienen te worden aangeduid, in afwachting van de beschrijving van deze nieuwe soort(en). In 2001 werd verder een isolaat van *F. chlamydosporum* geïsoleerd. Tevens werd in 2001 één isolaat aangetroffen van *F. langsethiae*, momenteel een belangrijke én toenemende zorg in brouwgerst, vanwege het vermogen T2 en HT2 toxine te produceren.

2. Ontwikkeling van een PCR methode voor de identificatie van het chemotype van *F. graminearum* en *F. culmorum*

In de rapportage over 2001 (PRI rapport 57) werd al melding gemaakt van het voorkomen van *F. graminearum* en *F. culmorum* isolaten die DON of NIV produceren. In 2001 werd gebruikt gemaakt van de toenmalige kennis over de genen betrokken bij de biosynthese van trichothecenen, TCTCs, de familie van chemische verbindingen waartoe ook DON en NIV behoren. Dit betreft een groep van genen, die bijeengelegen voorkomen in het genoom van TCTC-producerende schimmels, als een zogenaamde genencluster. Deze genen, genaamd *tri3* t/m *tri14*, verzorgen verschillende functies in de biosynthese van TCTCs (Kimura *et al.,* 2003; Lee *et al.,* 2002) Destijds werd met behulp van PCR reacties gebaseerd op het *tri7*–gen en het *tri13*–gen vastgesteld dat er grote verschillen in de distributie van beide chemotypen bestonden tussen *F. graminearum* en *F. culmorum*. Terwijl de *F. culmorum* populatie voornamelijk bestond uit NIV producenten, werd door de meeste *F. graminearum* isolaten DON geproduceerd. Tegelijkertijd was toen reeds duidelijk dat deze analyses niet accuraat zijn, aangezien een groot aantal isolaten van beide soorten geen signaal gaf. In 2000 kon slechts 55% van de isolaten van zowel *F. culmorum* als *F. graminearum* worden getypeerd. In 2001 kon aan 65% van alle *F. culmorum* en aan 78% van alle *F. graminearum* isolaten een chemotype worden toegewezen.
Sinds 2003 is de stand van de wetenschap omtrent de relatie tussen de genen betrokken bij de biosynthese van TCTCs aanzienlijk toegenomen. Nieuwe primers gebaseerd op de genen *tri3* en *tri12* geven een veel betere identificatie, zoals is te zien in Figuur 1.



Figuur 1. *Onderscheiding van isolaten die 3-AcDON, 15-AcDON of NIV produceren met behulp van primers gericht tegen respectievelijk het tri3- (links) en het tri12- gen (rechts). Voor beide genen geldt dat in elk geval een bandje wordt waargenomen (dus geen vals-negatieve resultaten), terwijl het verschil in lengte een ondubbelzinnige uitspraak over het chemotype toelaat.*

In isolaten die 3 AcDON produceren, wordt met de primers voor *tri3* en *tri12* een PCR-product van respectievelijk 243 of 410 bp aangetroffen (Tabel 3), terwijl met 15-AcDON producenten met de primers voor *tri3* en *tri12* PCR fragmenten van respectievelijk 610 bp en 670 bp worden gegenereerd. Isolaten van zowel *F. graminearum* als *F. culmorum,* die NIV produceren, geven bandjes van 840bp met zowel *tri3*– als *tri12*– specifieke primers (Tabel 3).

Tabel 3. *PCR fragmenten voor de bepaling van het chemotype van F. graminearum en F. culmorum*.*

	tri3	*tri12*
3-AcDON	243	410
15-AcDON	610	670
NIV	840	840

* *Primers volgens Ward et al., 2002.*

3. Bepaling van het chemotype van isolaten uit de 2000 en 2001 collecties

Alle isolaten van *F. graminearum* en *F. culmorum* uit de collecties van 2000 en 2001 zijn op deze manier gescreend, wat resulteerde in de distributie van chemotypen volgens Tabel 4. In 2000 werd door het merendeel van de *F. graminearum* isolaten 15-AcDON geproduceerd (92 van de 123 isolaten, 74,8%). Daarnaast werd bij 17.9% (22/123) het 3-AcDON chemotype aangetroffen en bij 7,3% (9/123) het NIV chemotype. In de *F. culmorum* populatie daarentegen werd het 15-AcDON chemotype vrijwel niet aangetroffen (2/43 = 4,6%), terwijl 3-AcDON- en NIV-chemotypen in frequenties van 53,4 en 41,8%, respectievelijk, voorkwamen. In 2001 werden vergelijkbare frequenties gevonden voor zowel *F. graminearum* (15-AcDON 70,1%, 3-AcDON 16,4% en NIV 13,4% als voor *F. culmorum* (8,7% voor 15-AcDON- producenten en 45,6% voor zowel 3-AcDON- als voor NIV- producenten).

Tabel 4. *Verdeling van chemotypes van F. graminearum en F. culmorum isolaten verzameld in wintertarwe-rassen in 2000-2002 (percentages).*

			Aantal	3-AcDON	15-AcDON	NIV
Nederland	2000	*F. graminearum*	123	17,9	74,8	7,3
	2001	*F. graminearum*	67	16,4	70,1	13,4
	2000	*F. culmorum*	43	53,4	4,6	41,8
	2001	*F. culmorum*	46	45,6	8,7	45,6
	2000	*F. cerealis*	3			100
	2001	*F. cerealis*	3			100
	2001	*F. vorosii*	4		100	
	2001	FG complex [a]	4	25		75
Noord-Frankrijk	2002	*F. graminearum*	34		91,4	5,8
Midden-Frankrijk	2002	*F. graminearum*	12		100	

[a] *Zie voetnoot van Tabel 1.*

Isolaten verzameld op twee locaties in Frankrijk produceren in merendeel 15-AcDON (Tabel 4). In Noord-Frankrijk ($50^0$30' N; $30^0$10' E) wordt dit chemotype 32 keer onder 34 isolaten aangetroffen (94,1%), terwijl alle 12 isolaten uit Midden-Frankrijk ($48^0$26' N; $1^0$29' E) 15-AcDON producent zijn. Kennelijk is de diversiteit van de populaties in Nederland groter dan die in Frankrijk. Isolaten van *F. cerealis* bleken in beide jaren (n=3 en 3) uitsluitend NIV te produceren, terwijl de *F. vorosii* isolaten verkregen tijdens de survey van 2001 (n=4) uitsluitend 15-AcDON produceren.

4. Verzamelen van referentie-isolaten van *F. equiseti*, *F. langsethiae* en *F. sporotrichioides* van collega onderzoekers uit het buitenland

Voor de ontwikkeling van detectiemethoden voor *'nieuwe'* soorten is het van groot belang om te kunnen beschikken over referentie materiaal. Vanwege berichtgeving vanuit het buitenland omtrent het voorkomen van T2 en HT2 toxine is vooral aandacht besteed aan soorten die deze mycotoxinen produceren, *F. langsethiae, F. equiseti en F. sporotrichioides.* Voor de opbouw van een dergelijke verzameling zijn verschillende buitenlandse onderzoekers aangeschreven. Het uiteindelijke resultaat is samengevat in Tabel 4. Vijf isolaten van *F. langsethiae* werden verkregen van Dr. Ralf Kristensen van het Noors Veterinair Instituut in Oslo. Hieronder bevond zit ook het holotype isolaat. Dit is het isolaat waarmee deze soort is beschreven en dat als internationaal erkende referentie dient (Torp *et al.,* 2004). *F. langsethiae* werd vroeger als een ondersoort van *F. poae* beschouwd, en vanwege een iets ander kolonie-uiterlijk als *'powdery F. poae'* aangeduid. Drie isolaten werden van Dr. Paul Nicholson (John Innes Center, Norwich, Verenigd Koninkrijk) verkregen, die oorspronkelijk als *F. poae* bekend stonden, maar m.b.v. de in het kader van dit project ontwikkelde PCR methoden als *F. langsethiae* moeten worden beschouwd.

Van *F. sporotrichioides* werden twee isolaten verkregen uit de collecties van het ISPA (voormalig het Istituto Tossine e Micotossine di Parasiti Vegetale, ITEM) in Bari, Italië en één isolaat van de Plantenziektenkundige Dienst, Nederland. Daarnaast werden zeven isolaten ontvangen van Dr. Erich Oerke (Universiteit Bonn, Duitsland), die morfologisch als *F. sporotrichioides* waren getypeerd. Van *F. equiseti* tenslotte werden van vier verschillende bronnen isolaten verkregen: Prof. W. Marasas zond twee isolaten afkomstig van maïs, drie *F. equiseti* isolaten van tarwe zijn afkomstig uit respectievelijk Duitsland en Engeland en 14 isolaten afkomstig van onbekende gewassen werden verkregen uit Noorwegen (Tabel 5).

Tabel 5. Herkomst van isolaten van F. equiseti, F. langsethiae en F. sporotrichioides.

	Mycotoxine	Herkomst
F. langsethiae	T-2/HT-2	5x NO [a] 3x UK [b]
F. sporotrichioides	T-2/HT-2	2x IT [c] 7x DE [d] 1x NL [e]
F. equiseti	DON ZEA	2x RSA [f] 3x DE 14x NO 3x UK

[a] *National Veterinary Institute, Oslo, Noorwegen.*
[b] *John Innes Centre, Norwich, Verenigd Koninkrijk.*
[c] *Institute of Sciences of Food Production, Italië.*
[d] *Institut für Pflanzenkrankheiten, Universität Bonn, Duitsland.*
[e] *Plantenziektenkundige Dienst, Nederland.*
[f] *Medical Research Council, Kaapstad, Zuid-Afrika.*

5. Opbouw van een collectie van Nederlandse isolaten in 2008

De doelen van deze studie waren tweeledig. Enerzijds is deze studie opgezet om inzicht te krijgen in het voorkomen van zogenaamde *'nieuwe'* soorten. Daarnaast is het onderzoek zo ingericht dat een (mogelijke) verschuiving tussen *'traditionele'* soorten en/of geproduceerde mycotoxinen kon worden waargenomen. In tegenstelling tot de inventarisaties van 2000 en 2001 (toen steeds 40 percelen beperkt werden bemonsterd), zijn in 2008 zes percelen intensief bemonsterd. Het streven was om voor elk perceel ~ 50 isolaten te verkrijgen, waarmee een betrouwbare weergave van de lokale samenstelling van het Fusarium aarziekte complex wordt verkregen. Met >300 isolaten is de kans groot om, naast de overvloedige soorten *F. graminearum* en *F. culmorum,* ook minder abundante soorten aan te treffen. In overleg met de begeleidingscommisie Fusarium is gekozen voor steeds twee velden in respectievelijk Zuidwest-Nederland, Centraal-Nederland en Noordoost-Nederland. Tevens is getracht een eventuele invloed van rassenkeuze uit te sluiten, door waar mogelijk, voor percelen met hetzelfde ras te kiezen. Zoals in Tabel 6 is te zien werd op vier percelen SW Tataros verbouwd, terwijl op de resterende percelen *cv.* Residence of *cv.* Globus stond. In totaal werden 377 isolaten van deze zes percelen verkregen.

Tabel 6. Herkomst van de isolaten verzameld in 2008 in Nederland.

Regio*	Locatie	GPS**	Ras	Aantal isolaten***	
ZWN	Westmaas	$54^0$47' N/$04^0$26' E	Residence	62	(1)
	Colijnsplaat	$51^0$35' N/$03^0$50' E	SW Tataros	61	(5)
CN	Lelystad	$52^0$38' N/$05^0$43' E	Globus	95	(9)
	Zeewolde	$52^0$19' N/$05^0$32' E	SW Tataros	57	(9)
NON	Nieuw Beerta	$53^0$01' N/$07^0$09' E	SW Tataros	59	(6)
	Uithuizermeeden	$53^0$24' N/$06^0$43' E	SW Tataros	43	(1)
			Totaal	377	(31)

* *ZWN, Zuidwest-Nederland; CN, Centraal-Nederland en NON, Noordoost-Nederland.*

** *Bepaald mbv Google Earth.*

*** *Tussen haakjes het aantal isolaten dat niet kon worden getypeerd met de huidige PCR methoden.*

Van de isolaten die niet konden worden getypeerd, bleken er tien afkomstig van aren met FHB symptomen. De overige 21 isolaten waren afkomstig van aren zonder symptomen en werden waarschijnlijk abusievelijk als mogelijke FHB-veroorzaker beschouwd. Tot welk schimmelgeslacht deze 31 (10 + 21) isolaten behoren, valt buiten het kader van dit project en werd daarom niet verder onderzocht.

6. Opbouw van een collectie van Franse en Duitse isolaten

Samenwerking met collega's in Duitsland en Frankrijk stelde ons in staat een groot aantal isolaten uit deze landen te verzamelen. Vanuit Frankrijk werden zowel in 2007 als in 2008 aren met zichtbare aantasting verzameld en naar Wageningen getransporteerd. Uit de aren verzameld in 2007 werden 235 (212) isolaten verkregen en in 2008 werden 35 schimmels geïsoleerd. Via de samenwerking met de Universiteit van Bonn werden 117 (107) isolaten verkregen (Tabel 7).

Tabel 7. Herkomst van de isolaten verzameld in Duitsland en Frankrijk.

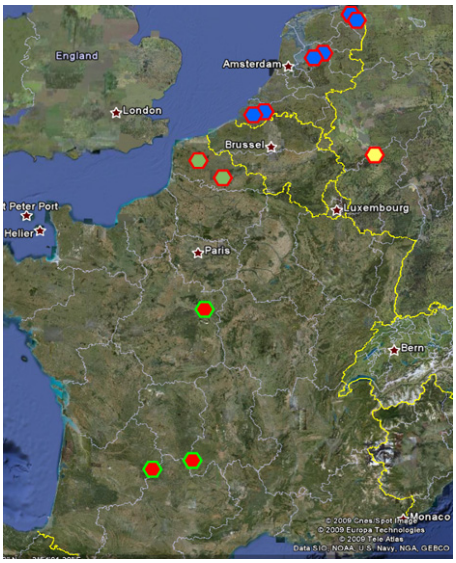
		Locatie	GPS ***	Ras	Aantal isolaten****	
Duitsland	2007	Dedenbach	50^{0}29' N/07^{0}12' E	Aristos	117	(10)
Frankrijk	2007	Lectoure	43^{0}56' N/00^{0}37' E	diverse*	172	(3)
		Montbartier	43^{0}54' N/01^{0}16' E	diverse**	53	(19)
		Houville	48^{0}26' N/01^{0}39' E	?	10	(1)
	2008	Florimond	50^{0}30' N/03^{0}10' E	Balance	13	
		Serasem	50^{0}40' N/02^{0}57' E	Balance	22	
				Totaal	387	(33)

* *Op de locatie Lectoure werden aren verzameld uit een rassenproef met tien wintertarwe en van 11 durumtarwe rassen.*

** *Op de locatie Montbartier werden aren verzameld uit een rassenproef met drie wintertarwe en drie durumtarwe rassen.*

*** *Bepaald mbv Google Earth.*

**** *Tussen haakjes het aantal isolaten dat niet kon worden getypeerd met de huidige PCR methoden.*



Figuur 2. Screenshot van een deel van West-Europa met daarin de locaties, waar aren van wintertarwe werden verzameld:
, , isolatie plaatsen in Frankrijk in 2007 en 2008.
, isolatie plaats in Duitsland (2007) en
, isolatie plaatsen in Nederland (2008).

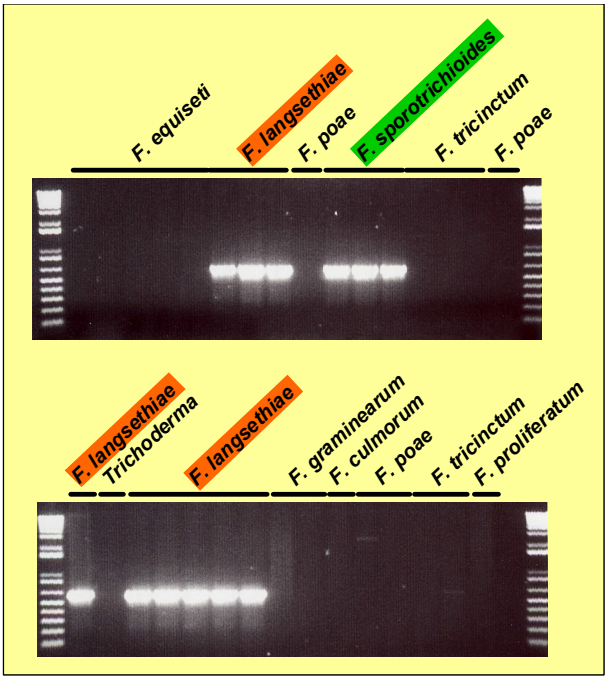
7. Ontwikkeling van een specifieke PCR voor T2 en HT2 producerende schimmels

Ten tijde van de vorige inventarisatie in 2000 en 2001, beschikten we over een moleculaire detectie voor vijf soorten uit het Fusarium aarziekte complex. Dit betrof de veelvoorkomende soorten *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* en de niet-toxigene soort *Microdochium nivale,* die echter wel vaak wordt aangetroffen tijdens aarziekte epidemieën (PRI nota #54). Gezien de signalen uit het buitenland over opkomende soorten én gezien de uitkomst van de determinatie van voorheen onbekende soorten uit de collecties 2000 en 2001 (zie ook Tabel 2) is het van belang om te kunnen beschikken over identificatiemethoden voor deze *'nieuwe'* soorten.
F. langsethiae is lange tijd beschouwd als een variant van *F. poae*, maar is op grond van morfologische, chemische en moleculaire kenmerken als zelfstandige soort beschreven in 2004 (Torp *et al.,* 2004). De afsplitsing van *F. langsethiae* als aparte soort blijkt ook vanuit mycologisch en fytopathologisch opzicht terecht, aangezien deze schimmel zich anders manifesteert op groeimedia, maar ook andere, onderscheidbare, symptomen vertoont op de plant. Zo groeit *F. langsethiae* langzamer op de gebruikelijke voedingsbodems dan de meeste andere soorten uit het FHB complex. Hierdoor wordt *F. langsethiae* vaak overgroeid door ander leden van het FHB complex (Edwards *et al.,* 2009; Imathiu *et al.,* 2009). Dit kan een verklaring zijn waarom in het verleden *F. langsethiae* (of onder de oude naam *F. poae*) zo weinig werd gerapporteerd. *F. langsethiae* blijkt vooral op haver (Prof. Hans Petterson, 30e Mykotoxin Workshop, Woudschoten, 2008) en op gerst een groot probleem te vormen (Edwards *et al.,* 2009). Voorts blijkt bij metingen in Frankrijk in 2007 dat vrijwel alle partijen brouwgerst besmet te zijn met T2 en/of HT-2 (persoonlijk mededeling van D. Patrick Boivin, IBFM, Nancy, Frankrijk). Het is dus van groot belang een specifieke detectie methode voor *F. langsethiae* en *F. sporotrichioides* te ontwikkelen.

Tabel 8. Lengte van de verwachte PCR fragmenten (bp) voor de verschillende primercombinaties.

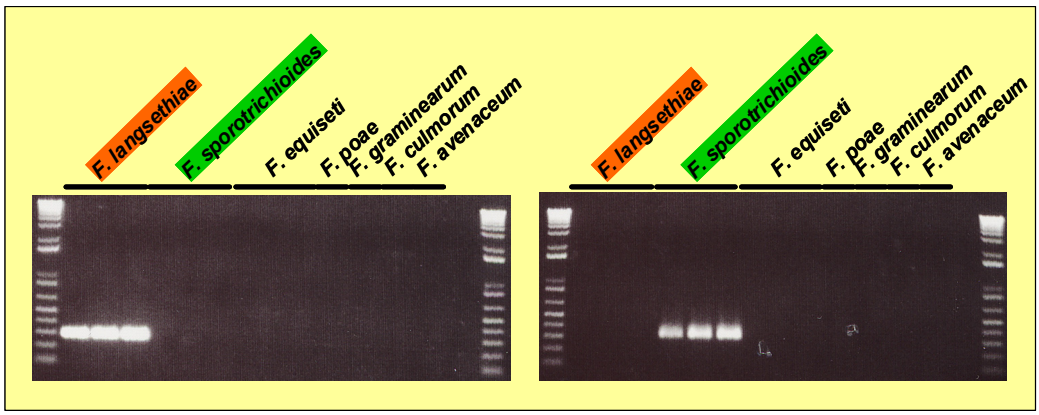
Primers	*F. sporotrichioides*	*F. langsethiae*	*F. equiseti*	*F. graminearum*	*F. culmorum*	*F. avenaceum*	*F. poae*
T4F1506/T4EndR2	550	550	-	-	-	-	-
FsporF1/LanspoR1	332	-	-	-	-	-	-
FlangF3/LanspoR1	-	310	-	-	-	-	-
127F2/127R2	410	410	-	-	-	-	-
ITS1/ITS	~550	~550	~550	~550	~550	~550	~550

Een literatuurstudie naar DNA sequenties van *F. langsethiae* en *F. sporotrichioides,* leidde naar een aantal primers, die PCR producten genereren specifiek voor *F. langsethiae* en/of *F. sporotrichioides*, (Tabel 8). Deze primers zijn getest op een aantal isolaten van soorten uit het FHB complex en de resultaten van deze experimenten zijn te zijn in Figuur 3. Primercombinatie T4F1506 en T4EndR2 geeft het verwachtte fragment van 550 bp met alle geteste isolaten van *F. langsethiae* én *F. sporotrichioides,* terwijl géén product wordt gevormd in reacties waarin DNA werd gebruikt van *F. equiseti*, *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. graminearum*, *F. culmorum* of *F. proliferatum* (Figuur 3). Tevens werd geen product gevormd met DNA afkomstig uit *Trichoderma* spp.



Figuur 3. *Specificiteit van primers voor de detectie van F. langsethiae en F. sporotrichioides. De primercombinatie T4F1506 en T4EndR2 produceert wel een product in de T2 en HT2 producenten F. langsethiae en F. sporotrichioides, maar niet in de overige geteste Fusarium soorten.*

Vervolgens werden weer andere primers getest, die beide soorten kunnen onderscheiden van *'overige'* Fusarium soorten, maar tevens deze twee soorten uit elkaar houden. Hiertoe werd de primer LanspoR1 gebruikt in combinatie met FlangF3 (Tabel 8), voor specifieke detectie van *F. langsethiae* en i.c.m. primer FsporF1 voor specifieke detectie van *F. sporotrichioides*. In Figuur 4 is te zien dat de eerste combinatie (FlangF3/LanspoR1) een duidelijk product geeft met DNA van alle geteste *F. langsethiae* isolaten. Wederom vindt geen amplificatie plaats met andere Fusarium soorten, maar nu wordt óók geen product gevormd met *F. sporotrichioides* DNA (Figuur 4, linker paneel). Anderzijds wordt met de primercombinatie FsporF1/LanspoR1 een product van de verwachtte grootte gevonden met *F. sporotrichioides*, maar niet met *F. langsethiae* (Figuur 4, rechter paneel). Opnieuw wordt met DNA van de andere geteste *Fusarium* soorten geen product gevormd.



Figuur 4. *Specificiteit van primers voor de detectie van F. langsethiae of F. sporotrichioides. In beide panels is de generieke primer lanspoR1 gebruikt. In het linker panel in combinatie met de F. langsethiae specifieke primer FlangF3 en in het rechter panel met de specifieke F. sporotrichioides specifieke primer FsporF1.*

8. Identificatie van isolaten uit Nederland, Frankrijk en Duitsland mbv soortspecifieke PCRs

Situatie in Nederland

De primers voor *F. langsethiae* en *F. sporotrichioides* bieden de mogelijkheid om de aanwezigheid van deze soorten in de collecties van 2000 en 2001 te onderzoeken. Zoals in Tabel 2 reeds staat vermeld bleek in de 2001 collectie één isolaat van *F. langsethiae* aanwezig te zijn. Mogelijk is *F. langsethiae* in 2000 en 2001 een weinig voorkomende soort of kan deze minder goed geïsoleerd worden door het eerder genoemde groeigedrag (Edwards *et al.*, 2009; Imanthiu *et al.,* 2009) zodat deze schimmel minder goed uitgroeien met de door ons gebruikte procedure of door ons geselecteerde aren. Dit is in de survey in 2007 & 2008 ten dele ondervangen door een 'diepte-inventarisatie' waarbij een groot aantal isolaten werd verzameld van aren met een breed spectrum aan symptomen. Zoals in de Tabel 6 vermeld, zijn 377 isolaten verkregen van zes percelen in Nederland. Deze isolaten zijn mbv de soortspecifieke primers getypeerd (Tabel 9). Evenals in eerdere surveys zijn *F. graminearum* en *F. culmorum* de meest prominente soorten, waarbij opvalt dat één van beide soorten steeds duidelijk de overhand heeft.

Het voorkomen van *F. graminearum* en *F. culmorum* is in deze survey niet gecorreleerd met de regio. Zowel in Zuid-West Nederland, de Flevopolders als Noord-Oost Nederland wordt steeds één perceel met vooral *F. graminearum* en één perceel met vooral *F. culmorum* aangetroffen. Op alle percelen met voornamelijk *F. graminearum* werd het ras Tataros verbouwd, wat een mogelijke relatie suggereert. Echter in Uithuizermeeden, waar eveneens Tataros werd verbouwd, komt vooral *F. culmorum* voor (Tabel 9).
Van de minder prominente Fusarium soorten wordt *F. poae* in alle percelen aangetroffen terwijl verder sporadisch een isolaat van *F. avenaceum* en *F. equiseti* werd gevonden. Deze survey, die erop gericht was om inzicht te krijgen in het voorkomen van de T2/HT2 producenten *F. langsethiae* en *F. sporotrichioides,* heeft slechts één isolaat van beide soorten opgeleverd. Een aanzienlijk aantal isolaten reageerde met niet één van de Fusarium primers en van deze isolaten werd het internally transcribed spacer (ITS) gebied van het ribosomale DNA gesequenced, waarna het merendeel als Epicoccum spp. kon worden geïdentificeerd (Tabel 9). Voorts konden sommige isolaten als *Alternaria, Ascochyta of Stemphylium* spp worden getypeerd. Tenslotte kon van 31 isolaten (8,2%) de identiteit door verschillende omstandigheden niet worden vastgesteld. Het feit dat niet alleen *Fusarium* maar ook *Epicoccum*, *Alternaria* en *Ascochyta* of *Stemphylium* werden geïsoleerd, geeft aan dat de geselecteerde aren voldoende divers waren en onze inventarisatie voldoende breed van opzet.

Situatie in het buitenland

Via samenwerking met collega's in Duitsland en Frankrijk werden 387 isolaten verkregen (Tabel 7). In analogie met de situatie in Nederland werd in alle buitenlandse percelen *F. graminearum* als meest prominente soort aangetroffen (Tabel 9). Alleen in Houville in Midden-Frankrijk wordt *F. culmorum* als prominente soort aangetroffen. Opvallend is verder dat in Dedenbach (Dld) de soortvariatie aanzienlijk is met naast 20 isolaten van *F. avenaceum* en 18 isolaten van *F. poae* ook isolaten van *F. langsethiae* (n=1), *F. sporotrichioides* (n=1) en *F. tricinctum* (n=2). In Lectoure en Montbartier, beide gelegen in het zuiden van Frankrijk zijn *Microdochium nivale* en *Epicoccum* spp. zéér prominent aanwezig. In Lectoure overstijgt de incidentie van *M. nivale* (38.5%) die van *F. graminearum* (33.7%).

Tabel 9. Voorkomen van de verschillende Fusarium spp. uit het Fusarium aarziekte complex.

		F. graminearum	*F. culmorum*	*F. avenaceum*	*F. poae*	*F. langsethiae*	*F. sporotrichioides*	*F. cerealis*	*F. tricinctum*	*F. equiseti*	*Epicoccum**	*M. nivale*	Overig**
NL 2008	Westmaas	1	53		2						2		3
	Colijnsplaat	28	7		1						18	2	
	Lelystad	10	46		4						17		9
	Zeewolde	26	5	3	2	1				1	5	3	2
	Nieuw Beerta	33	2		2		1				14		1
	Uithuizermeeden	7	17	1	4						12		1
D 2007	Dedenbach	65		20	18		1	1	2				
F 2007	Lectoure	57		7		1	2				30	65	7
	Montbartier	16									6	9	3
	Houville		9										
F 2008	Florimond	10	1										2
	Serasem	18		2							2		
Totaal		271	140	33	33	2	4	1	2	1	106	79	28

** Isolaten die mbv sequencen van het ITS gebied konden worden geïdentificeerd als Epicoccum.*

*** Overig: isolaten van Alternaria, Ascochyta, Stemphylium spp. die mbv ITS sequenties werden geïdentificeerd.*

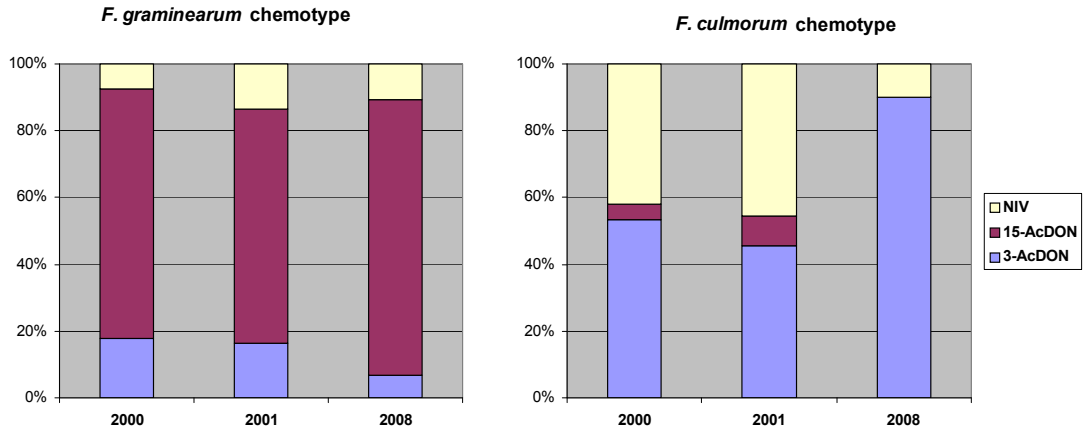
9. Bepaling van het chemotype van *F. graminearum* en *F. culmorum* isolaten van de 2007/2008 collectie

Indertijd werd geconcludeerd dat wellicht sprake zou zijn van een geringe, maar systematische, toename van NIV producerende *F. graminearum* en *F. culmorum.* Dit werd vooral toegedicht aan een toename van het areaal maïs. Sindsdien hebben Maier *et al* (2006) aangetoond dat NIV fungeert als virulentie factor bij de infectie van maïs, terwijl DON een virulentie factor is voor tarwe. Een toename van maïs zou dus kunnen leiden tot een toename van NIV producenten. Met de onder 2 beschreven chemotype PCRs is van alle isolaten van *F. graminearum* en *F. culmorum* het chemotype bepaald (Tabel 10). Evenals in eerdere surveys is er een duidelijk verschil tussen beide soorten ten aanzien van de trichothecenen die worden geproduceerd. Door isolaten van *F. graminearum* wordt voornamelijk 15-AcDON geproduceerd, terwijl het merendeel van de *F. culmorum* isolaten 3-AcDON produceert. Onafhankelijk van de herkomst van de isolaten, komt de productie van 3-AcDON sporadisch voor in *F. graminearum* (10/271 = 3,4%). Anderzijds worden geen isolaten van *F. culmorum* aangetroffen die 15-AcDON produceren. Werden in 2000 en 2001 nog respectievelijk 4,6% en 8,7% *F. culmorum* isolaten gevonden die 15-AcDON produceren, in de screening van 2007-2008 werden geen 15-AcDON producerende *F. culmorum* isolaten gevonden (Tabel 10).

Tabel 10. Verdeling van chemotypen over de F. graminearum en F. culmorum populaties van diverse jaren en locaties.

		F. graminearum			*F. culmorum*		
		3-AcDON	15-AcDON	NIV	3-AcDON	15-AcDON	NIV
Duitsland, 2007	Dedenbach	1	63	1	-	-	-
Frankrijk, 2007	Montbartier	-	9	7	-	-	-
	Lectoure	-	49	8	-	-	-
	Houville	-	-	-	6	-	3
Frankrijk, 2008	Serasem	2	14	2	-	-	-
	Florimond	-	9	1	1	-	-
Nederland, 2008	Westmaas	-	1	-	53	-	-
	Colijnsplaat	1	25	2	5	-	2
	Lelystad	0	6	4	41	-	5
	Zeewolde	3	21	3	3	-	2
	Nieuw Beerta	3	27	2	1	-	1
	Uithuizermeeden	-	7	-	14	-	3
	Totaal	10	231	30	124	0	16

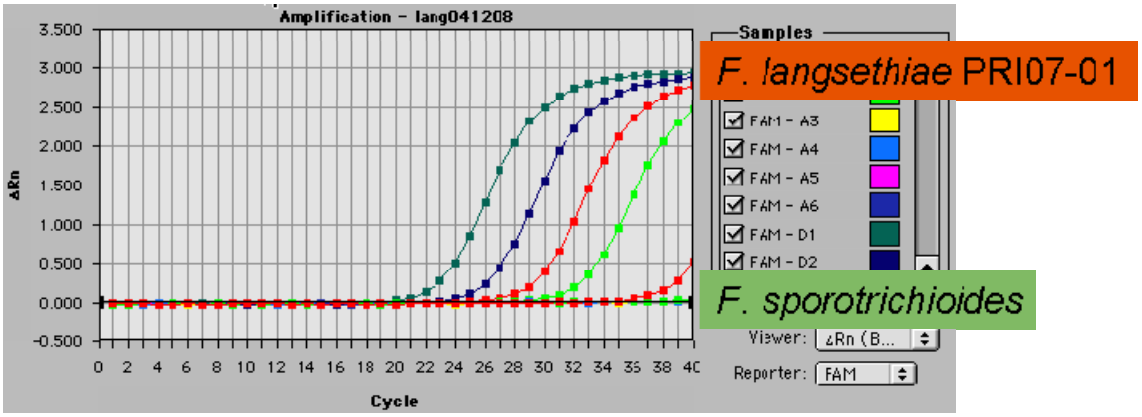
Het vermogen tot productie van NIV is aanwezig in 11,1% (30/271) isolaten van *F. graminearum*, hetgeen niet wezenlijk afwijkt van het percentage uit de collecties van 2000 en 2001 (respectievelijk 7,3% en 13,4%). Productie van NIV door *F. culmorum* daarentegen lijkt wel te zijn afgenomen tot slechts 11,4% tegenover 41,8% en 45,6% in respectievelijk 2000 en 2001. Daarnaast zien we in *F. graminearum* een verschuiving ten faveure van 15-AcDON producenten met name ten opzichte van de 3-AcDON producenten. In *F. culmorum* zien we vooral een toename van 3-AcDON producenten. Wellicht spelen beide mycotoxinen een verschillende rol in de epidemiologie van beide Fusarium soorten.



Figuur 5. *Verdeling van de verschillende chemotypen van F. graminearum en F. culmorum in 2000, 2001 en 2008.*

10. Ontwikkeling van een TaqMan voor *F. langsethiae* en *F. sporotrichioides*

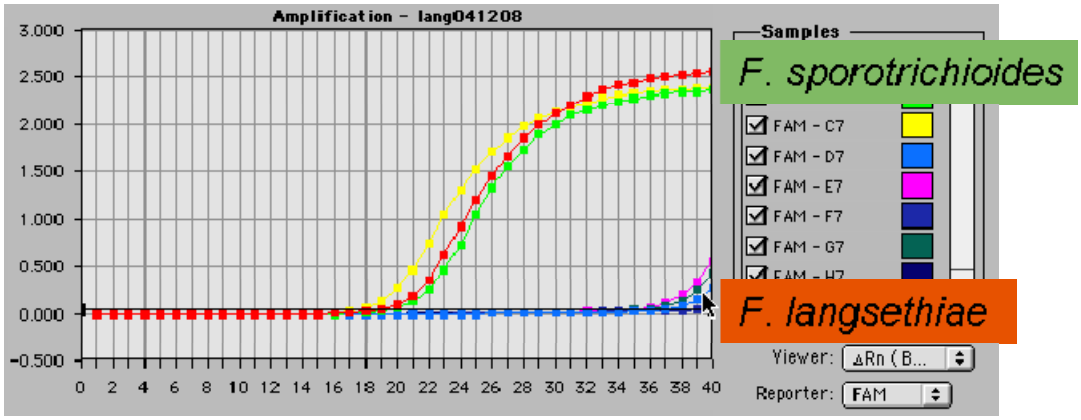
In paragraaf 7 zijn DNA fragmenten beschreven, die specifiek zijn voor *F. langsethiae* én *F. sporotrichioides* alsmede fragmenten die uniek zijn voor beide soorten. Deze fragmenten zijn geïsoleerd en de DNA volgorde is opgehelderd. Vervolgens zijn de sequenties van elk van deze fragmenten met elkaar vergeleken, om posities te vinden die voldoen aan de eisen voor een robuuste kwantitatieve PCR. Hiertoe dienen verschillen aanwezig te zijn die in alle isolaten van beide soorten aanwezig zijn. Daarnaast dienen meerdere verschillen op korte afstand van elkaar gelegen te zijn, zodat zowel primers als een probe kunnen discrimineren tussen beide soorten. Tenslotte dienen deze sequenties niet aanwezig te zijn in andere soorten óf in tarwe, gerst en mogelijke andere gastheren. De sequenties afkomstig van het 410 bp fragment dat wordt gegenereerd met de primers 127F2 en 127R2 (zie Bijlage I) voldoen aan deze criteria en primers en probes zijn getoetst op DNA preparaten van een aantal *F. langsethiae* en *F. sporotrichioides* isolaten.



Figuur 6A. *Specifieke detectie van F. langsethiae DNA met de primers & probe combinatie voor deze Fusarium soort. Seriële verdunning van isolaat PRI07-01 geeft een robuust signaal van 10 ng tot 1 pg, terwijl diverse isolaten van F. sporotrichioides niet reageren.*

In Figuur 6A valt te lezen, dat de specifieke primers voor *F. langsethiae* goed reageren met het *F. langsethiae* isolaat PRI07-01. Daarbij blijkt dat DNA van dit isolaat detecteerbaar is in een verdunningsreeks van 10 ng tot 1 pg.

Kwantitatieve detectie van *F. sporotrichioides* werd uitgevoerd met de voor deze soort specifieke primers en probe combinatie (zie Bijlage I). Ook hier bleek een robuuste detectie mogelijk met een verdunningsreeks van 10 ng t/m 1 pg. Daarnaast blijken alle isolaten van *F. sporotrichioides* te reageren (drie voorbeelden zijn te zien in Figuur 6B). De specificiteit van deze primers en probe combinaties is getoetst door kwantitatieve PCRs uit te voeren op een aantal soorten uit het FHB complex. De primers&probe combinatie, specifiek voor *F. langsethiae,* reageerde niet met DNA afkomstig van *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. poae* en *F. tricinctum*. Ook met de primers&probe combinatie specifiek voor *F. sporotrichioides*, werden geen kruisreacties waargenomen met deze soorten. Er kan dus geconcludeerd worden dat voor beide T2 & HT2 producerende schimmels specifieke kwantitatieve PCRs zijn ontwikkeld, die ingezet kunnen worden voor de risiko inschatting van deze mycotoxinen in granen.



Figuur 6B. *Detectie van F. sporotrichioides met specifieke primers en probe voor deze Fusarium soort. De F. sporotrichioides isolaten E09.1, PD82/1726 en ITEM3596 uit respectievelijk Duitsland, Nederland en Italië reageren allemaal goed, terwijl alle geteste isolaten van F. langsethiae niet reageren.*

Een specifieke detectie voor *F. equiseti* is om meerdere redenen niet tot stand gekomen. In de eerste plaats is *F. equiseti* ten onrechte als T2 en/of HT2 producent aangemerkt. Deze karakterisering (in de offerte) was gebaseerd op een enkele waarneming in de literatuur, maar wordt in meerdere recent verschenen publikaties tegengesproken. Voorrtschrijdend onderzoek in de moleculaire taxonomie van *F. equiseti* geeft aan dat tenminste vijf haplotypen bestaan *F. equiseti* moet derhalve als een soortcomplex worden beschouwd. Toekomstig fylogenetisch onderzoek zal moeten uitwijzen of deze haplotypen elk een nieuw te beschrijven soort voorstellen, zoals ook is gebleken in het soortcomplex *F. graminearum*, waarbinnen inmiddels 13 soorten worden onderscheiden (O'Donnell *et al.*, 2008).

Literatuur

Edwards, S.G., B. Barrier-Guillot, P.E. Clasen, V. Hietaniemi & H. Petterson, 2009.
Emerging issues of HT-2 and T-2 toxins in European cereal production. World Mycotoxin J. **2**: 173-182.

Goswami, R.S. & H.C. Kistler, 2004.
Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops Molec. Pl. Pathol. **5**: 515–525.

Imathiu, S.M., R.V. Ray, M. Back, M.C. Hare & S.G. Edwards, 2009.
Fusarium langsethiae pathogenicity and aggressiveness towards oats and wheat in wounded and unwounded *in vitro* detached leaf assays. Eur. J. Plan Pathol **124**: 117-126.

Infantino, A., N. Pucci, G. Conca & A. Santori, 2008.
First report of *Fusarium langsethiae* on durum wheat kernels in Italy**.** Pl. Dis. **91:** 1362.

Kimura, M., T. Tokai, K. O'Donnell, T.J. Ward, M. Fujimura, H. Hamamoto, T. Shibata & I. Yamaguchi, I., 2003.
The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. FEBS Lett. **539**, 105–110.

Lee, T., Y.K. Han, K.H. Kim, S.H. Yun & Y.W. Lee, 2002.
Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. Appl. Env. Microbiol. **68**, 2148–2154.

Lukanowski, A. & C. Sadowski, 2008.
Fusarium langsethiae on kernels of winter wheat in Poland – occurrence and mycotoxigenic abilities. Cereal Res. Comm. **36**: 453-457.

Maier, F.J., T. Miedaner, B. Hadeler, A. Felk, S. Salomon, M. Lemmens, H. Kassner & W. Schaefer, 2006.
Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase *(tri5)* gene in three field isolates of different chemotype and virulence. Molec. Pl. Pathol. **7**: 449-461.

Niessen, L., H. Schmidt & R.F. Vogel, 2004.
The use of *tri5* gene sequences for PCR detection and taxonomy of trichothecene-producing species in the *Fusarium* section *Sporotrichiella* . Int J Food Microbiol **95**: 305-319.

O'Donnell, K., 2006.
Phylogenetics of the *Fusarium* Head Blight Pathogens and their toxins. 9e European *Fusarium* Seminar, Wageningen, NL.

O'Donnell, K., H.C. Kistler, B.K. Tacke & H.H. Casper, 2000.
Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**:7905-7910.

O'Donnell, K., T.J. Ward, D.M. Geiser, H.C. Kistler & T. Aoki, 2004.
Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. Fungal Genet. Biol. **41**:600-623.

O'Donnell, K., T.J. Ward, D. Aberra, H.C. Kistler, T. Aoki, N. Orwig, M. Kimura, S. Bjørnstad & S.S. Klemsdal, 2008.
Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. 1: Fungal Genet Biol. **45**:1514-22.

Starkey, D.E., T.J. Ward, T. Aoki, L.R. Gale, H.C. Kistler, D.M. Geiser, H. Suga, B. Tóth, J. Varga & K. O'Donnell, 2007.
Global molecular surveillance reveals novel Fusarium head blight species and trichothecene toxin diversity. Fungal Genet. Biol. **44**: 1191-1204.

Torp, M. & H.I. Nirenberg, 2004.
Fusarium langsethiae sp. nov. on cereals in Europe. Int'l. J. Food Microbiol. **95**: 247-256.

Verordening (EG) nr. 1881/2006 tot vaststelling van de maximumgehalten aan bepaalde verontreinigingen in levensmiddelen. Publicatieblad van de Europese Unie **L364**, p5-24 (20.12.2006).
http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:NL:PDF

Verordening (EG) nr. 1126/2007 van de commissie van 28 september 2007 tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1881/2006 tot vaststelling van de maximumgehalten aan bepaalde verontreinigingen in levensmiddelen, wat

betreft Fusarium toxinen in maïs en maïsproducten. Publicatieblad van de Europese Unie **L255**, p14-17 (29.9.2007).
http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:255:0014:0017:NL:PDF

Waalwijk, C., R. van der Heide, P.M. de Vries, T.A.J. van der Lee, C. Schoen, G. Costrel-de Corainville, I. Häuser-Hahn, P. Kastelein, J. Köhl, P. Lonnet, T. Demarquet & G.H.J. Kema, 2004.
Quantitative detection of Fusarium species in wheat using Taqman. Eur. J. Pl. Pathol. **110**: 481-494.

Waalwijk, C., T. Hesselink, P.M. de Vries, B.H. de Haas, P. Kastelein, E.C.P. Verstappen, T.A.J. van der Lee & G.H.J. Kema, 2000.
Fusarium in Nederland: inventarisatie en identificatie. PRI rapport 54.

Waalwijk, C., P. Kastelein, T. Hesselink, P.M. de Vries, C. Lombaers, R. van der Heide, C. Schoen, T.A.J. van der Lee, J. Köhl, H.T.A.M. Schepers & G.H.J. Kema, 2002.
Inventarisatie van toxigene *Fusasium* spp. En andere ziekten en plagen in Nederlandse wintertarwe in 2001. PRI rapport 57.

Waalwijk, C., P. Kastelein, P.M. de Vries, Z. Kerenyi, T. van der Lee, T. Hesselink, J. Kohl & G.H.J. Kema, 2003.
Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. Eur. J. Pl. Pathol. **109**: 743-754.

Waalwijk, C., S.H. Koch, E. Ncube, J. Allwood, B. Flett, P.M. de Vries & G.H.J. Kema, 2008.
Quantitative detection of *Fusarium* spp. and its correlation with fumonisin content in maize from South African subsistence farmers. World Mycotoxin J. **1**: 39-47.

Ward, T.J., J.P. Bielawski, H.C. Kistler, E. Sullivan & K. O'Donnell, 2002.
Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**:9278-9283.

Ward, T.J., R.M. Clear, A.P. Rooney, K. O'Donnell, D. Gaba, S. Patrick, D.E. Starkey, J. Gilbert, D.M. Geiser & T.W. Nowicki, 2007.
An adaptive evolutionary shift in Fusarium head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. Fungal Genet. Biol. **45**: 473-484.

Wilson, A., D. Simpson, E. Chandler, P. Jennings & P. Nicholson, 2004.
Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. FEMS Microbiology Letters **233**: 69–76.

Yang, L.J., T.A.J. van der Lee, X.J. Yang, D.Z. Yu & C. Waalwijk, 2008.
Fusarium Populations on Chinese Barley Show a Dramatic Gradient in Mycotoxin Profiles. Phytopathology **98**: 719-727.

Bijlage I.

Primers en probes die in dit onderzoek werden gebruikt

Naam	Sequentie	*Grootte van PCR product (bp)*	
		F.lang	*F.spor*
Spo3F Spo1R	ATAACTCCGTGGCTGCTTGG ATCAACAAACTAGATCGCTATACATT	641	641
FlangF3 LanspoR1 FsporF1	CAAAGTTCAGGGCGAAAACT TACAAGAAGACGTGGCGATAT CGCACAACGCAAACTCATC	310	332
T4F1506 T4EndR2	CCCCTGGCTACTCTCGAGA AAGCTTTGAGAACCTTCAC	550	550
127F2 127R2	CAGGTAGTAGTAGAGAGGTAGGTAGGTA GTCCCCAAAGAAGAAGAAGAA	410	410
ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	~550	~550
F. langsethiae probe *F. langsethiae* forward *F. langsethiae* reverse	CACACCCATACCTACGTGTAA GTTGGCGTCTCACTTATTATTC TGACATTGTTCAGATAGTAGTCC	+	-
F. sporotrichioides probe *F. sporotrichioides* forward *F. sporotrichioides* reverse	CCACACCCATAGTTACGTGTAA GGTTGGCGTCTCACTTATAC AATTTCTGATTCGCTAAAGTGG	-	+