

Samenvattingen werkgroepbijeenkomsten

Samenvattingen van presentaties op de bijeenkomst van de werkgroep *Fusarium* van de KNPV, op 2 maart 2005 in het CBS, Utrecht

Heterogeneity of Dutch Fusarium oxysporum strains isolated as forma specialis radidis-lycopersici

S.Z. Validov¹, F. Kamilova¹, T.S. Azarova², S. Qi² and B. Lugtenberg¹

¹Institute Biology, Leiden University, Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands

²Institute of Agricultural Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Shosse Podbelskogo 3, Pushkin-6, St.Petersburg, 189620, Russian Federation

Vijftien *Fusarium oxysporum* f. sp. *radidis-lycopersici* (*Forl*) stammen die voet- en wortelrot veroorzaken bij tomaat, geïsoleerd uit kassen in Nederland (14) en Rusland, zijn geanalyseerd op basis van de 18S-28S intergenic spacer region (IGS) en fenotypische karakteristieken. Vergelijking van IGS sequenties leverde vijf groepen op. De voor tomaat meest agressieve stammen kwamen verspreid voor in 4 groepen, dus virulentie is geen eigenschap van een bepaalde groep. Stammen die gevoelig zijn voor phenazines en 2,4-diacetylphloroglucinol werden ook in verschillende groepen gevonden. Vergelijking van de IGS sequenties van *Forl* met sequenties aanwezig in Genbank van *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) en *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (*Fom*) leverde clusters op van *Fol* en *Fom* met *Forl*. Op basis van IGS sequentie kan de stam PD87/245 worden beschouwd als *Fom*. Er zijn aanwijzingen dat voet- en wortelrot symptomen bij tomaat veroorzaakt kunnen worden door vertegenwoordigers van andere formae speciales dan *Forl*.

Een proteomics benadering om eiwitten te identificeren die door *Fusarium oxysporum* worden uitgescheiden in xylemsap van tomaat

Petra M. Houterman¹, Dave Speijer³, Henk L. Dekker², Ben J.C. Cornelissen¹ en Martijn Rep¹

¹Plant Pathology, ²Mass Spectrometry, Swammerdam Institute for Life Sciences, ³Medical Biochemistry, Academic Medical Center (AMC), University of Amsterdam, The Netherlands

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* is een schimmel die verwelkingsziekte veroorzaakt in tomaat. *Fusarium* dringt de plant binnen via de wortels en koloniseert vervolgens de plant via de xyleemvaten. Het is aannemelijk dat eiwitten die een belangrijke rol spelen in de interactie tussen plant en schimmel uitgescheiden worden in het xylemsap.

We hebben daarom de eiwitten geanalyseerd die zich ophopen in xylemsap van tomaat na infectie met *Fusarium oxysporum*. Deze eiwitten werden geïdentificeerd met behulp van een combinatie van tweedimensionale gel electroforese, *peptide mass fingerprinting* (MALDI-MS) en massaspectrometrische sequentiebepaling van peptiden (LC-MS/MS).

We hadden eerder al laten zien dat een aantal *pathogenesis-related* (PR) eiwitten van tomaat alswel het Six1 eiwit ('secreted in xylem 1') van *Fusarium* in xylemsap ophopen na infectie. We rapporteren hier de identificatie van nog andere planteneiwitten en mogelijke schimmeleiwitten. Van tomaat hebben we een polygalacturonase (endoPG), een aantal peroxidases, een xyloglucaan-specifiek endoglucanase inhibitor eiwit (XEGIP) en een xyloglucaan endotransglycosylase (XET) geïdentificeerd. Verder werden een aantal peptidesequenties verkregen van nog onbekende eiwitten, mogelijk afkomstig van de schimmel. Met behulp van deze peptidesequenties kunnen we 'gedegeneerde PCR' gebruiken om de corresponderende DNA sequenties te identificeren.

Ontwikkeling en implementatie van een moleculaire toets voor in planta detectie van *Fusarium foetens*

Linda Kox¹, Ilse Heurneman¹,
Marjanne de Weerd², Gerard van Leeuwen¹ en
Carolien Zijlstra²

¹Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102,
6700 HC Wageningen

²Plant Research International, Postbus 16,
6700 AA Wageningen

Fusarium foetens is een nieuw pathogeen voor *Begonia elatior* planten. Deze schimmel is op grond van morfologie lastig te onderscheiden van *Fusarium* species die deel uitmaken van het zeer verwante *F. oxysporum* species complex (FOC). Met behulp van RAPD-fingerprinting (Schroers *et al.*, Mycologia 2004, 96: 393-406) is het mogelijk om *F. foetens* te onderscheiden van FOC. Nadeel van de methode is dat een reïncultuur van de schimmel nodig is, hetgeen een tot twee weken in beslag neemt. Wij hebben twee specifieke moleculaire toetsen ontwikkeld voor de directe detectie van *F. foetens* in planta: (1) een real-time (Taqman) PCR methode gebaseerd op mitochondriële small subunit (mtSSU) rDNA sequenties en (2) een conventionele PCR met het elongatiefactor (EF) - 1 alpha gen als target. De specificiteit van beide methoden werd bepaald met zestien isolaten van *F. foetens*, 28 isolaten van FOC species, een isolaat van *F. begoniae* en een isolaat van *F. commune*. Alle *F. foetens* isolaten werden aangetoond. Er werd geen kruisreactie gevonden met de andere *Fusarium* species. Beide methoden gaven positieve resultaten met blad, stengel en basis van geïnfecteerde *Begonia* planten. Sinds december 2004 wordt de Taqman PCR op de PD ingezet voor routinematige toetsing op de aanwezigheid van *F. foetens* in planta. Tot nu toe zijn er 21 monsters getoetst met de Taqman PCR. Vier monster bleken positief in de Taqman PCR. Deze vier monsters waren ook de enige waaruit *F. foetens* kon worden geïsoleerd middels kweek. RAPD analyse op de reïncultures bevestigde de aanwezigheid van *F. foetens* in het plantmateriaal. Onze conclusie is dat de Taqman PCR een snelle en betrouwbare methode is voor het direct aantonen van *F. foetens* in *Begonia*.

Gebruik van TaqMan PCR voor het kwantificeren van *Fusarium* spp. en *Microdochium nivale* in gewassen en gewasresten van tarwe

J. Köhl, B.H. de Haas, P. Kastelein,
S.L.G.E. Burgers en C. Waalwijk

Plant Research International, Postbus 16,
6700 AA Wageningen

Toxigene *Fusarium* spp. kunnen in graan diverse mycotoxines produceren. De mate van besmetting varieert tussen percelen en seizoenen afhankelijk van weersomstandigheden, vruchtwisseling, grondbewerking en cultivar. Uit het oogpunt van voedselveiligheid en diergezondheid, maar ook bedrijfseconomisch, is een zo laag mogelijke mycotoxinebesmetting gewenst.

Eerder onderzoek heeft aangetoond dat in Nederland *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* en *F. poae* de belangrijkste mycotoxine-producerende soorten in tarwe zijn. Voor deze vier *Fusarium* soorten, als ook voor *Microdochium nivale*, is een kwantitatieve detectie mbv TaqMan PCR ontwikkeld. Hiermee kan nu de populatiedynamiek van de pathogenen gedurende het seizoen in het gewas en ook op gewasresten gevolgd worden. Dit epidemiologisch onderzoek is vooral gericht op de mogelijke rol van gewasresten bij het ontstaan van een epidemie.

De kolonisatie door toxigene *Fusarium* spp. van tarweplanten werd gevolgd vanaf de bloei in juni 2003 tot de oogst en van de gewasresten (op de grond onder veldomstandigheden) vanaf de oogst tot in juni 2004. Hierbij is onderscheid gemaakt tussen verschillende plantendelen, zoals voeten, bladeren, stengels, knopen, korrels en aarresten. De kolonisatie door *Fusarium* spp. was tijdens de afrijping van het gewas het hoogst. In de verschillende plantendelen bleek de dynamiek van de kolonisatie verschillend te zijn voor de diverse *Fusarium* spp. De mate van kolonisatie door *Fusarium* spp. was hoger in knopen, stengel en aarresten dan in het geoogste graan. Na de oogst daalde de mate van kolonisatie door *Fusarium* spp. in gewasresten afkomstig van de aar, stengel en knopen, maar niet in stoppels.

In lopend onderzoek wordt nagegaan of het mogelijk is een relatie te vinden tussen populaties van *Fusarium* spp., die op gewasresten in een perceel aanwezig zijn en het voorkomen van deze pathogenen op de aar en later in het geoogste graan.

Cytogenetica van Fusarium-soorten

Cees Waalwijk, Masatoki Taga en Gert Kema.

Plant Research International, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen, Nederland.

Chromosomen van schimmels zijn zo klein dat klassieke cytologie, zoals die wordt gebruikt bij planten en dieren niet mogelijk is. Met behulp van de Germ Tube Burst Method (GTMB) is dit inmiddels wel mogelijk. De kiembuizen van net ontkiemde sporen van verschillende schimmelsoorten worden hierbij opgeblazen, waarna de specimen met een DNA kleuring worden zichtbaar gemaakt. Deze methode is toegepast op verschillende soorten uit het geslacht *Fusarium*. In *Fusarium graminearum* zijn vier chromosomen geïdentificeerd, een aantal dat overeenkomt met het aantal koppelingsgroepen in de genetische kaart en het aantal fragmenten van de fysische kaart (<http://www.broad.mit.edu/annotation/funqi/fusarium/maps.html>). Dit aantal is het kleinste dat tot op heden is gevonden in filamenteuze schimmels. Verwante soorten zoals *F. pseudograminearum* en *F. culmorum* hebben eveneens vier chromosomen. Daarentegen bestaat het genoom van minder verwante soorten, zoals *F. oxysporum*, pathogeen van meer dan honderd verschillende plantensoorten, en *F. verticillioides* en *F. proliferatum*, berucht om hun vermogen tot de productie van het mycotoxine fumonisine, steeds uit twaalf chromosomen. Dit aantal komt overeen met de waarnemingen voor deze soorten mbv Pulsed Field Gel Electrophoresis en de genetische kaart van *F. verticillioides*.

Beurzen KNPV

Het KNPV-bestuur is voornemens om met in gang van 2005 subsidie te verlenen om activiteiten mogelijk te maken die passen in de doelstelling van de vereniging. Daartoe zal per jaar een tweetal subsidieronden ingesteld worden (indienen eind januari en eind juni) en per ronde maximaal 10.000 euro verdeeld worden over de gehonoreerde voorstellen. De voorstellen worden beoordeeld door een toetsingscommissie, die het beschikbare budget uitzet en terugrapporteert bij de jaarvergadering van de KNPV.

Randvoorwaarden voor de toekenning:

- indienen gemotiveerd verzoek: wat, met welk doel, welke kosten, wie financiert en wat wordt teruggeleverd (aanvraag formulier te downloaden van website);
- passen binnen de doelstelling van de vereniging, c.q. bevorderen samenwerking en/of kennisuitwisseling op gebied van gewasbescherming;
- ingediend kan worden door individuele personen, KNPV lid, verenigingen, (KNPV) werkgroepen en maatschappelijke organisaties;
- de gevraagde financiële bijdrage zou niet logischerwijs door de werkgever betaald moeten worden (om dit te beoordelen inzicht geven in medefinanciering en/of eigen bijdrage);
- iets voor breder publiek terug laten komen (b.v. korte rapportage voor gewasbescherming; plaatsing ter bepaling van redactie);
- een pre hebben voorstellen die samenwerking tussen de groepen onderzoek, onderwijs, industrie en beleid bevorderen.

De toetsingscommissie bestaat uit de secretaris van de vereniging en 2 bestuursleden:

A. Wesselo (PD), J. Buurma (LEI) en R. van der Weide (PPO).