

# KNPV-werkgroepen

## Samenvattingen van de presentaties gehouden op de bijeenkomst van de werkgroep Fusarium op 3 maart 2004 te Utrecht

### Indeling Fusarium-stammen geïsoleerd uit patiënten met opportunistische infecties

Richard Summerbell<sup>1</sup>,  
Kris Honraet<sup>2</sup>, Hans-Josef  
Schroers<sup>1,3</sup>, en  
Mieke Starink-Willemse<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centraal Bureau voor  
Schimmelcultures, Utrecht.

<sup>2</sup> Laboratorium voor Farmaceutische  
Microbiologie, Universiteit Gent, België.

<sup>3</sup> Agricultural Institute of Slovenia,  
Ljubljana.

Plantenziekten-veroorzakende isolaten van de *Fusarium solani* groep zijn reeds lang onderverdeeld in verschillende kruisingspopulaties en *formae speciales*. Er zijn echter nog maar weinig stammen geanalyseerd die opportunistische infecties in mensen kunnen veroorzaken, om hun plaats in deze groepen te bepalen. Summerbell en Schroers hebben eerder aangegevoerd dat sommige stammen die geïsoleerd zijn uit patiënten met opportunistische infecties horen bij *F. solani* f. sp. *cucurbitae* ras 2 (MPV) ofwel bij *F. lichenicola* (vroeger *Cylindrocarpon lichenicola*), een lid van de *F. solani* soort-complex. De chronische subcutane ziekte mycetoma wordt regelmatig veroorzaakt door *F. falciforme* (vroeger *Acremonium falciforme*), ook lid van de *F. solani* soort-complex. Isolaten uit een patiënt met een fusariële biofilm op de stemprothese horen tot een genetische subgroep van *F. solani* f. sp. *radicola* die nauw verwant is aan *F. falciforme*. Andere net zo nauwverwante isolaten werden uit ginseng, gladiool en de sojaplant geïsoleerd. De infectie van de sojaplant was bijna onschadelijk. *Fusarium* isolaten uit mycetoma veranderen mor-

fologisch sterk in de loop van het infectieproces. Na sequencen blijken deze stammen soms verwant te zijn met de 'echte' *F. solani* f. sp. *radicola*, die een ziekte veroorzaakt bij aardappel en tomaat. In sommige gevallen zijn ze verwant met een taxusendofyt die alleen als *Fusarium* spec. bekend is. De mycetoma-isolaten vormen weinig conidiën en groeien buitengewoon langzaam; daardoor lijken ze op *F. falciforme* isolaten uit gevallen van mycetoma. Het blijkt dat langdurige kolonisatie van een menselijke gastheer door *F. solani* isolaten van verschillende genetische groepen, vooral in gevallen van mycetoma, grondige en onomkeerbare veranderingen in de morfologische ontwikkeling kan veroorzaken.

### FusariumScreen™: een niet-destructieve analyses van de pathogenese van aarfusarium

Theo van der Lee, Gert Kema,  
Ineke de Vries, Henk Jalink,  
Rob van der Schoor en  
Cees Waalwijk

Plant Research International B.V.,  
Droevendaalsesteeg 1, P.O. Box 16,  
6700 AA Wageningen, Nederland,  
Email: theo.vanderlee@wur.nl

Fusarium aarziekte in granen is een wereldwijd probleem. De directe opbrengstreducties zijn enorm en de indirecte verliezen door kwaliteitsproblemen en mycotoxinen zijn van een nog grotere orde. Resistentie is vanzelfsprekend een uitstekende manier om Fusarium problemen voor te zijn. Fusarium in granen wordt echter door een complex van soorten veroorzaakt. Over de resistentie tegen deze individuele soorten is weinig

bekend, laat staan over het resistentiemechanisme.

Resistentie tegen Fusarium wordt onderscheiden in diverse typen waarvan resistentie tegen penetratie en kolonisatie het belangrijkste lijken te zijn. Het onderscheid tussen de diverse typen is echter niet goed omschreven. Hierdoor is weinig tot niets bekend over de genetische basis van deze resistentietypen. Het is daarom moeilijk om resistentietypen te combineren in veredelingsprogramma's. Wij hebben daarom FusariumScreen™ ontwikkeld. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een met GFP getransformeerd *Fusarium* isolaat. Met FusariumScreen™ wordt het kolonisatieproces in levende planten vanaf het allereerste begin kwantitatief gevolgd waardoor veel inzicht wordt verkregen over onderliggende resistentiemechanismen. Met behulp van FusariumScreen™ kunnen deze in vele rassen tegelijkertijd op een snelle wijze geïdentificeerd en in veredelingsprogramma's gebruikt worden. Het principe van FusariumScreen™



kan op meerdere pathosystemen worden toegepast.

### **Syntenie in toxine producerende Fusarium soorten: het gencluster verantwoordelijk voor het mycotoxine fumonisine en het mating type locus als voorbeelden**

Cees Waalwijk,  
Theo van der Lee,  
Ineke de Vries,  
Thamara Hesselink,  
Joop Arts and  
Gert H.J. Kema

Plant Research International BV,  
Business unit Biointeractions and Plant Health, Wageningen, The Netherlands.  
Droevendaalsesteeg 1, P.O. Box 16,  
6700 AA Wageningen, The Netherlands.  
Email: cees.waalwijk@wur.nl

De genoom regio's die coderen voor eiwitten betrokken bij kruisingen (mating type locus) en het gencluster coderend voor eiwitten betrokken bij de synthese van het mycotoxine fumonisine zijn bestudeerd in *Fusarium proliferatum*.

Vergelijking van de sequenties van deze regio's met die van andere ascomyceten geeft aan dat de mate van syntenie, het behouden blijven van gen-volgorde en gen-richting in het genoom, verschilt in beide gebieden en dat tevens de mate van verwantschap tussen homologe genen in eenzelfde gebied sterk kan fluctueren. Syntenie in het mating type locus werd gevonden met soorten die zo'n 280 miljoen jaar geleden [Berbee en Taylor. Dating the evolutionary radiations of the true fungi. Can J. Botany 71: 1114-1127 (1993)]

1993). uit elkaar zijn gedivergeerd. De fumonisine genclusters van de nauw verwante soorten *Fusarium proliferatum* en *F. verticillioides* zijn volledig syntenisch maar de flankerende gebieden bleken sterk verschillend. Dit geeft aan dat het gencluster zich in deze twee soorten op verschillende posities in het genoom bevindt. Vergelijking met

de genoom sequentie van de tarwe pathogeen *F. graminearum* suggereert dat deze cluster via horizontale genoverdracht is verkregen, wellicht via twee onafhankelijke gebeurtenissen. Deze resultaten illustreer de kracht van vergelijkende genomica voor studies naar de evolutie van genen, genclusters en soorten.

### **Het eiwit Six1 van Fusarium oxysporum wordt uitgescheiden in tomaten planten gedurende infectie en is vereist voor volledige virulentie**

Lotje van der Does,  
Mark Opdam, Michiel Meijer,  
Ben J.C. Cornelissen en  
Martijn Rep

Universiteit van Amsterdam,  
Swammerdam Instituut voor Levenswetenschappen, Fytopathologie, Amsterdam. Tel: 020-5257764,  
Fax: 020-5257934,  
e-mail: lvddoes@science.uva.nl

*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) is een bodemschimmel die tomatenplanten via de wortels kan infecteren en dan het xyleem weefsel koloniseert. In de xyleem vaten scheidt Fol een 12 kD eiwit uit, dat afkomstig lijkt van een 30 kD voorloper eiwit. Vermoedelijk geschiedt dit via proteolitische bewerking van Six1, het is nog niet duidelijk of de plant of de schimmel hiervoor verantwoordelijk is. Het *SIX1* gen is vereist voor volledige virulentie op tomatenplanten. Twee allelen van *SIX1* zijn gevonden. Een van de twee allelen levert een meer virulent fenotype op dan het andere allel. De twee allelen verschillen enkel in een aminozuur. Afgezien van het feit dat Six1 een of andere rol in virulentie moet hebben is er niets bekend over de functie van Six1. Om aanwijzingen te verkrijgen voor een mogelijke functie van Six1 onderzoeken we op dit moment hoe de expressie

van *SIX1* is gereguleerd. *SIX1* komt tot expressie in de plant, maar niet in media die ontworpen waren om de situatie in xyleem sap na te bootsen, of in xyleem sap zelf. Om de expressie van *SIX1* in de plant te kunnen volgen construeren we op dit moment een *SIX1* promoter- *GFP* fusie gen. Om de effecten van gezuiverd Six1 op de plant te onderzoeken en de proteolitische bewerking van Six1 te kunnen analyseren zijn we bezig met het produceren van Six1 in *Pichia pastoris*.

### **Fusarium in bloembollen: veelzijdig onderzoek aan een praktisch probleem**

Rik de Werd, Marjan de Boer,  
Suzanne Breeuwsma en  
Martin van Dam

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,  
Bloembollen. Postbus 85,  
2160 AB Lisse, e-mail:  
rik.dewerd@wur.nl

*Fusarium* kan in een groot aantal bloembolgewassen opbrengstdevering veroorzaken. De problemen komen zowel in de bollenteelt als in de teelt van de bloemen (broeierij) voor. Het gaat hierbij voornamelijk om: bol- of knolrot (*F. oxysporum*, diverse formae speciales in tulp, lelie, narcis, krokus en gladiool, *F. hostae* f. sp. *hyacinthi* in hyacint) en wortelrot (*F. avenaceum* en *F. culmorum* in tulpenbroei, *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* in irisbroei). In lelies komt ook stengelaantasting veroorzaakt door *F. oxysporum* f.sp. *lilii* voor. Economisch gezien lijkt de schade veroorzaakt door *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* (in de praktijk bekend als zuur in tulp) het grootst. Dit heeft mede te maken met de indirecte schade (verminderde broeikwaliteit) die gezonde bollen kunnen oplopen door ethyleenproductie van geïnfecteerde bollen. Ook veelvuldig voorkomende latente, onzichtbare infecties maken het zuurprobleem gecompliceerd.

Momenteel richt veel van het onderzoek aan *Fusarium* zich dan ook op laatstgenoemde gewas-pathogene combinatie (dit onderzoek wordt voornamelijk gefinancierd door het Productschap Tuinbouw).

PPO Bloembollen onderzoekt veel aspecten van de *Fusarium*-problematiek en maakt hierbij gebruik van een grote verscheidenheid aan onderzoekdisciplines en -technieken variërend van DNA- tot op sectorniveau. Op gebied van epidemiologie wordt onderzoek gedaan naar de verschillende infectiemomenten door de keten heen. Hieruit is onder andere gebleken dat een *Fusarium* besmetting zich vooral tijdens verwerking na het oogsten snel van bol tot bol kan verspreiden. Tussen planten en oogsten vindt er echter nauwelijks verspreiding plaats. Uit onderzoek op praktijkbedrijven bleek dat de kritieke momenten waarop de infectiepercentages het sterkst toenemen vaak verschillen tussen bedrijven. Daarom is voor een diagnose op maat een brochure opgesteld en verspreidt, waarmee een ondernemer zelf aan de hand van tips, achtergrondinformatie en een protocol voor monsternamen zijn eigen bedrijf door kan lichten.

Daarnaast wordt op het gebied van epidemiologie onderzocht hoe door middel van vruchtwisseling het beste perceelsbesmettingen teruggedrongen kunnen worden en wordt momenteel in kas- en veldexperimenten de waardplant-specificiteit van de verschillende fusaria bepaald.

Ook is naar aanleiding van toeneemende problemen in voorheen resistente tulpencultivars, samen met Plant Research International onderzoek gedaan naar de agressiviteit van verschillende *Fo. f.sp. tulipae* stammen.

Met behulp van DNA-technieken (RFLP-PCR) is een hele collectie *Fusarium* isolaten van diverse bol-

gewassen geïdentificeerd en gekarakteriseerd.

PPO gebruikt veel aspecten uit het epidemiologisch onderzoek voor de ontwikkeling van preventie- en bestrijdingsmaatregelen. Hierbij kan het gaan om verwerkings- en selectietechnieken, cultivarkeuze, plant- en oogsttijdstip, bemesting, toepassing van natuurlijke of chemische bestrijdingsmiddelen, etc.. Het doden van latente infecties in tulp heeft momenteel speciaal de aandacht, omdat dit een onmisbare stap is in het opschonen van met *Fusarium* besmette partijen. In het verleden is het lastig gebleken om de latente infectie te doden en tegelijkertijd een gezonde bol te behouden. Vragen uit de praktijk en vernieuwde kennis en inzichten vormen de aanleiding voor hervatting van dit onderzoek.

Door een goede samenwerking met andere onderzoeksinstituten en een sterke betrokkenheid van vertegenwoordigers van de bloembollensector bij het opzetten en uitvoeren van onderzoek en door middel van presentaties, lezingen, open dagen en publicaties in vakbladen blijft het werk bij PPO Bloembollen goed afgestemd op de praktische problemen en wordt implementatie van de verkregen resultaten sterk bevorderd.

### **Visualisatie van de interacties tussen de tomatenwortel, een pathogene en een biocontrole *Fusarium* stam onder ziekte reducerende condities**

Annouschka Bolwerk,  
Anastasia L. Lagopodi,  
Ben J. J. Lugtenberg en  
Guido V. Bloemberg

Instituut Biologie Leiden, sectie  
Microbiologie, Universiteit Leiden,  
Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden.

De plant pathogeen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

(*Fo.r.l.*) veroorzaakt het rotten van de wortels van tomatenplanten. De niet pathogene *Fusarium oxysporum* Fo47 kan de planten tegen deze ziekte beschermen als sporen van beide schimmels door potgrond zijn gemengd. Om een beter inzicht te krijgen in de interacties tussen de *Fusarium* stammen en de plantenwortel tijdens de biologische controle van de ziekte zijn de schimmels gelabeld met autofluorescerende eiwitten en vervolgens zichtbaar gemaakt middels confocale laser scanning microscopie. De resultaten waren als volgt. (i) Wanneer de concentratie van Fo47 vijftig maal hoger was dan die van de pathogeen vond er biologische controle van de ziekte plaats. (ii) Fo47 werd eerder aangetroffen op de wortel dan de pathogeen, *Fo.r.l.*. (iii) De pathogeen koloniseerde vervolgens de wortel sneller en heviger dan Fo47. De wortelkolonisatie door *Fo.r.l.* was significant gereduceerd. (iv) Het percentage sporen van Fo47 dat kiemde in tomatenwortellexudaat was hoger dan dat van *Fo.r.l.*

### **Samenvattingen van de 71e bijeenkomst van de KNPV-werkgroep Bodempathogenen en bodemmicrobiologie van april 2004**

#### **Compost in potgrond: ziekteverendheid en beperkingen**

Dirk Jan van der Gaag,  
Cees de Kreij en Roel Hamelink

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,  
Business Unit Glastuinbouw, Postbus 8,  
2670 AA Naaldwijk

In het door de Europese Unie gesubsidieerde project "Compost Management" wordt door zeven onderzoekspartners uit zes verschillende landen onderzoek gedaan naar de ziekteverendheid van compost. Op PPO-Glastuinbouw zijn in dit project 23 composten getoetst tegen drie ver-

schillende bodemziekten: *Phytophthora cinnamomi* in lupine, *Cylindrocladium spathiphylli* in *Spathiphyllum* en *Rhizoctonia solani* AG2-1 in bloemkool; twaalf van deze composten zijn ook getoetst tegen *Phytophthora nicotianae* in tomaat. Elf van de 23 composten kwamen uit Frankrijk, Griekenland en Israël. Het materiaal waaruit deze composten gemaakt waren was zeer variabel. De andere twaalf composten kwamen uit Nederland en waren gemaakt van groenafval (snoeihout, gras en/of bladafval). De composten werden tevens beoordeeld op hun eventuele geschiktheid als potgrondingrediënt op basis van hun zoutgehalte en het effect van de compost op de pH van de potgrond.

Verschillende buitenlandse composten hadden een hoge mate van ziekteverendheid tegen één of meerdere van bovengenoemde bodemziekten. Deze composten hadden echter een hoog gehalte aan Na, Cl en/of voedingselementen waardoor deze composten in slechts kleine hoeveelheden in potgronden kunnen worden bijgemengd (<20%). De twaalf Nederlandse groencomposten hadden een relatief laag gehalte aan balastzouten en voedingselementen en waren ook wat betreft pH-effect geschikt als potgrondingrediënt bij een volumemengverhouding van 80% veen en 20% compost. In de ziekteverendheidstoetsen had geen van de groencomposten een effect tegen *P. cinnamomi*, drie composten hadden een zwak maar significant effect tegen *C. spathiphylli* en 9 composten waren effectief tegen *R. solani*. De ziekteverendheid van de composten tegen *R. solani* kon grotendeels verklaard worden door de pH van het veen-compost-mengsel. De mate van ziekteverendheid nam af met toenemende pH van het mengsel in het traject pH 4-6. In potgrondmengsels bestaande uit 100% veen werd een vergelijkbaar verband gevonden tussen de mate

van ziekteverendheid en de pH. In vervolgonderzoek wordt bekeken of door het beënten van jonge Nederlandse groencompost met een compost met een hoge mate van ziekteverendheid een ziekteverende compost kan worden verkregen die ook geschikt is als potgrondsubstraat.

### **Agrobiodiversiteit en ziektevering van bodempathogenen**

Joeke Postma en  
Mirjam Schilder

Plant Research International,  
Postbus 16, 6700 AA Wageningen

Eerder onderzoek, gefinancierd door NWO en LNV, toonde aan dat er een relatie bestaat tussen gewasrotatie, microbiële diversiteit en ziekteverende eigenschappen van de bodem op het proefveld Wildekamp te Bennekom (Garbeva et al, 2002, 2003, 2004). Veldjes met een permanente grasland-historie waren ziekteverender ten aanzien van *Rhizoctonia solani* AG3 in aardappel dan de veldjes met een langdurige akkerbouw historie. Ook de microbiële diversiteit, geanalyseerd met PCR-DGGE, was hoger in grasland dan in akkerbouw, evenals de percentages antagonistische bacteriën. Diverse analyses wezen dus op een hogere ziekteverendheid tegen *Rhizoctonia* bij een grotere microbiële diversiteit.

Voor een bredere interpretatie van deze resultaten zijn in de herfst van 2003 grondmonsters verspreid over Nederland verzameld. Hiervoor zijn vijftien percelen gekozen die onder andere verschilden in grondsoort en bemestingsregime. Het betrof biologische bedrijven en bedrijven in omschakeling die deelnemen aan het BIOM-project (coördinatie door PPO-agv en DLV). Deze grondmonsters zijn m.b.v. biotoetsen onderzocht op bodemweerbaarheid tegen *Rhizoctonia solani* AG3 en *Verticillium*

*dahliae* in aardappel. De microbiële samenstelling is geanalyseerd met de moleculaire fingerprinting techniek PCR-DGGE, zowel voor de totale bacteriële als de *Pseudomonas* populatie. Bovendien zijn soorten en aantallen isolaten die *in vitro* antagonisme tegen *Rhizoctonia* vertoonden bepaald.

Resultaten van al deze bepalingen toonden aan dat het aantal jaren dat een bedrijf biologisch beheerd werd en de pH van de bodem, een significante invloed hadden op de samenstelling van de *Pseudomonas* populatie. De samenstelling van de totale bacterie-populatie verschilde significant voor gronden met verschillende mate van ziektevering tegen *Rhizoctonia*. De ziektevering correleerde niet met de diversiteit van de DGGE patronen. Type bemesting (vloeibare of vaste dierlijke mest; plantaardig bemesting) gaf binnen dit onderzoek geen significante verschuiving in de microbiële populaties. Zandgrond had een onverwacht hoog percentage antagonistische bacteriën, voornamelijk *Streptomyces* spp. In de kleigronden kwamen naast *Streptomyces* spp. ook veel *Lysobacter* en *Xanthomonas* isolaten voor die een zeer sterke *in vitro* remming vertoonden ten aanzien van *Rhizoctonia*. Helaas hadden de uitgevoerde biotoetsen in aardappel een grote variatie, waardoor correlaties met ziektevering niet zo duidelijk waren.

Het is belangrijk om herhaalbaarheid van deze data de toetsen, en om biotoetsen met een geringere variatie te gebruiken. Het betreft complex onderzoek, waarbij nieuwe verbanden tussen bodemmicroflora, bodemweerbaarheid en beïnvloedende teelt- en omgevingsfactoren boven tafel kunnen komen. Dergelijke verbanden kunnen dan vervolgens onder experimentele omstandigheden verder ontrafeld worden.