Overzicht diagnostiek van Fusarium

Mogelijkheden, vooruitzichten en biotoetsen voor lelie

R. Peters | A.D. van Diepeningen & C. Slootweg | Wageningen University & Research, mei 2021

WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

Overzicht diagnostiek van Fusarium

Mogelijkheden, vooruitzichten en biotoetsen voor lelie

R. Peters[1], A.D. van Diepeningen[1], C. Slootweg[1]

[1] Wageningen University & Research

Dit overzicht is geschreven als onderdeel van de PPS 'Akkerbouw op Zand' uitgevoerd door de Stichting Wageningen Research (WR), business unit Open Teelten, projectnummer 3750413700.

WR is een onderdeel van Wageningen University & Research, samenwerkingsverband tussen Wageningen University en de Stichting Wageningen Research.

Wageningen, mei 2021

Rapport WPR-884

WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

Peters, R., van Diepeningen, A. D., Slootweg, C., 2021. *Overzicht diagnostiek van Fusarium; Mogelijkheden, vooruitzichten, biotoetsen voor lelie.* Wageningen Research, Rapport WPR-884.

Dit rapport is gratis te downloaden op https://doi.org/10.18174/548061

ISBN 987-94-6395-845-5

Trefwoorden: *Fusarium*, diagnostiek, lelie, biotoets

© 2021 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Open Teelten, Postbus 430, 8200 AK Lelystad; T 0320 29 11 11; www.wur.nl/plant-research

KvK: 09098104 te Arnhem
VAT NL no. 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. 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 Stichting Wageningen Research.

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

Foto omslag: Wageningen UR

Inhoud

Inhoud **3**

Woord vooraf **5**

Samenvatting **6**

1 Inleiding **7**

2 De eigenschappen van *Fusarium oxysporum* ff. spp. **8**

2.1 De levenscyclus 8
2.2 Verspreiding en bemonstering in het veld 10

3 Klassieke methoden **13**

3.1 Uitplaten van plantendelen 13
3.2 Uitplaten van grond (minerale deel) 14
3.3 Uitplaten van organische delen 15
3.4 Uitplaten van grondsuspensies in verdunningsreeks 16
3.5 Nadelen klassieke methoden 17

4 Moleculaire methoden **19**

4.1 Wat is DNA precies? 19
4.2 Extractie van genetische materiaal 20
4.3 (quantitative) Polymerase Chain Reaction 21
4.4 Blotting en Reverse Blotting 23
4.5 Vergelijking klassieke en moleculaire methoden 24

5 Biotoetsen voor lelie **25**

5.1 Schubtoets 25
5.2 Biotoets commerciële bollen 27
5.3 Concept biotoets voor teelt van leverbare bollen 28

6 In de nabije toekomst... **31**

6.1 SIX-virulentiegenen qPCR 31

7 In de verre toekomst... **33**

7.1 Volledige genoom analyse per isolaat 33

8 Conclusies en toekomstperspectief **34**

9 Literatuur **35**

Woord vooraf

Het volgende is een overzicht van diagnostische-/detectietechnieken voor *Fusarium* spp. in grond of in plantenmateriaal. Behoefte aan zulk een overzicht kwam voort uit een vraag van Agrifirm, een van de projectpartners uit de PPS 'Akkerbouw op Zand'. Zij beschouwen *Fusarium* spp. als een belangrijk knelpunt voor de teelt van met name lelie op zandgrond. Het is daarom vanuit Werkpakket 1: Integrated Crop Management (ICM) wenselijk de aantasting door *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* (*Foli*) na verschillende voorvruchten in de rotatie te kunnen volgen. Om deze behoefte in te vullen is hier, als aanvulling op een bakkenproef, een overzicht gemaakt van de beschikbare kwalitatieve en kwantitatieve technieken voor de detectie en diagnostiek van *Fusarium* spp. in het algemeen en meer specifiek via biotoetsen van *Foli* in lelie.

Dit overzicht is bedoeld als kennisneming van de mogelijkheden en bevat daarom geen diepgaande beschrijvingen van met name de moleculaire technieken.

Samenvatting

Het geslacht *Fusarium* is zeer divers en bevat een groot aantal soorten dat pathogeen kan zijn op een zeer breed scala aan waardplanten. Op basis van waardplantreeks en pathogeniciteit is er een indeling in soorten, *formae speciales* (ff.spp.) en pathogene versus saprofytische vormen. De belangrijkste en meest diverse soort in het geslacht is *F. oxysporum*, een soort die zowel als pathogeen als saprofyt voor kan komen en door de vorming van chlamydosporen jarenlang (>7 jaar) zonder waardplant in de bodem kan overleven.

De levenscyclus van *F. oxysporum* ff.spp. (*Fofs*) kent twee fasen. In de saprofytische fase overleeft de schimmel vaak afwisselend als chlamydosporen en mycelium op gewasresten en organische stof. Tevens kunnen niet-waardplanten oppervlakkig gekoloniseerd worden om de schimmelpopulatie in stand te houden. In de pathogene fase (waarvan sprake is als er een geschikte waardplant aanwezig is), dringt de schimmels met hyfen via wonden, natuurlijke openingen, huidmondjes en soms direct door de epidermis heen de cortex van de wortels binnen. Hierna wordt het xyleem gekoloniseerd wat uiteindelijk leidt tot verwelken van de plant. Bij bloembollen vindt infectie ook vaak direct in de schubben of rokken plaats.

De verspreiding van *Fofs* in het veld is te typeren als 'vlekkerig' en wordt via (verstuivende) grond, (opspattend) water, zaad en plantenmateriaal verspreid. Overigens lijkt er veel verschil te zijn in de mate waarin zaadpartijen afkomstig van besmette percelen zelf besmet zijn. Omdat zaadbesmetting afhankelijk is van stuivend zand/opspattend water in combinatie met breuken in de zaadhuls is het niet mogelijk één enkele oorzaak aan te wijzen voor dit verschijnsel.

Er zijn in de loop van tientallen jaren verschillende methoden voor de identificatie en kwantificatie van *Fofs*, waarvan een deel klassiek en het recentere deel moleculair is. Onder de klassieke methoden vallen het uitplaten van plantendelen, grond en (aggregaten van) organische stof en verdunningsreeksen daarvan. Deze methoden zijn bewerkelijk, zijn niet altijd geschikt voor soortbepaling en zeggen zonder biotoets weinig over de pathogeniciteit van een isolaat.
Onder de moleculaire methoden vallen het gebruik van PCR, qPCR en (Reversed) Dot Blotting. Deze methoden zijn duur om te ontwikkelen maar zijn daarna goedkoper in gebruik en makkelijker te automatiseren dan de klassieke methoden. Daarnaast zijn deze methoden in staat isolaten tot op soortniveau en zelfs *forma specialis*-niveau te determineren mits er een geschikt referentiegenoom/primerpaar beschikbaar is.

De qPCR-methode die momenteel in ontwikkeling is bij Wageningen Research maakt gebruik van de combinatie van aanwezige virulentiegenen (in het bijzonder de SIX (Secreted In Xylem) - virulentiegenen) om iets te zeggen over de pathogenen vermogens van een isolaat. Doordat de prijs van het gebruik van moleculaire methoden door de toenemende efficiëntie van de gebruikte technieken relatief gezien in prijs afneemt is het niet ondenkbaar dat op een bepaald punt het volledig laten sequencen en analyseren van een genoom, bijvoorbeeld voor BGC`s (Biosynthetic Gene Clusters) even goedkoop is, maar voorlopig is dat nog niet het geval. De beste benadering voor het 'gedrag' van een gegeven isolaat in een veldsituatie blijft echter een biotoets.

Voor de lelieteelt zijn momenteel twee biotoetsen beschikbaar, de schubtoets met schubben als uitgangsmateriaal en een toets met eerstejaars plantmateriaal (of stengeljongen) als uitgangsmateriaal. Deze toetsen zijn wel specifiek op *F. oxysporum* f. sp. *lilii* gericht maar zijn meer ontworpen om iets over de mate van genetische resistentie te zeggen dan om een voorspelling te doen voor de mate van schade bij teelt van lelies op een perceel met een bepaalde besmetting. Een concept voor een biotoets voor leverbare bollen is als onderdeel van dit overzicht beschreven.

1 Inleiding

Het geslacht Fusarium bestaat uit zowel niet pathogene als pathogene bodemschimmels. Van de pathogene zijn er vele belangrijk voor de landbouw, omdat ze verschillende soorten droge rot (zoals wortel- en kroonrot) en Fusarium-verwelkingsziekte kunnen veroorzaken. De agronomisch belangrijkste soorten zijn *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum* en *F. graminearum*. Van deze vier soorten is *F. oxysporum* het meest divers met meer dan 58 bevestigde waardplantsoorten en ruim 80 goed gedefinieerde *formae speciales* (ff. spp.) (Edel-Hermann & Lecomte, 2019)

Een '*forma specialis*' (f.sp) betekende in de klassieke taxonomische terminologie een ras/stam van een schimmel die slechts op één plantensoort en soms zelfs maar op één ras voorkwam. In recentere jaren is gebleken dat deze definitie niet klopt met de praktijkervaring en ook genetisch/evolutionair niet uit te leggen is (Morris & Moury, 2019). Hier wordt de term '*forma specialis*' daarom gebruikt als zijnde een ras/stam die zich weliswaar fysiologisch gespecialiseerd heeft op één soort waardplant (of een ras daarvan), maar ook schade kan veroorzaken of zich in stand kan houden op andere planten.

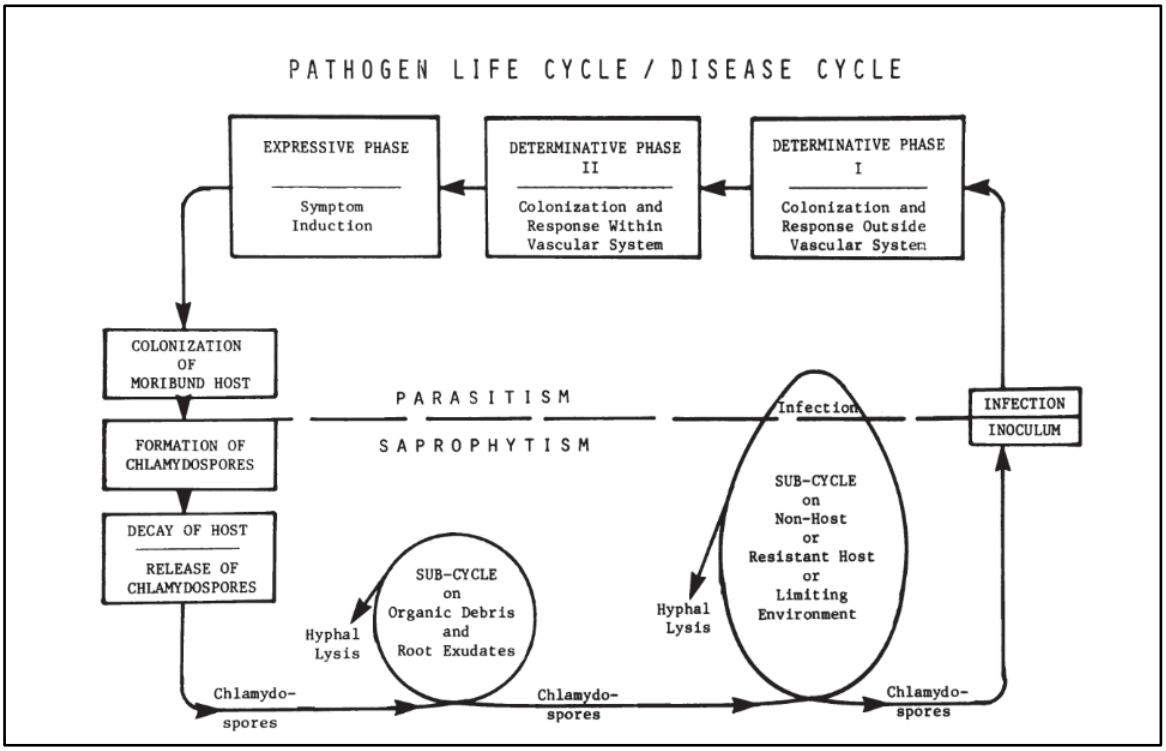
In sommige '*formae speciales'* (ff. spp.) blijken verschillen te kunnen bestaan tussen schimmelstammen, die dan verschillende rassen van de waardplant kunnen aantasten en ook kunnen variëren in de mate van pathogeniciteit. In zo'n geval spreken we over fysio's (Engels *races*) van het betreffende pathogeen.

Niet-pathogene Fusarium stammen koloniseren oppervlakkig de wortels van de planten of leven als endofyten in de plant zonder symptomen te veroorzaken en daarnaast beconcurreren ze de pathogene stammen om nutriënten (met name ijzer en simpele suikers). Deze niet-pathogene Fusariumstammen zijn op deze manier zelfs in staat om aantasting door pathogene Fusariumstammen te voorkomen of te verminderen (Fravel, D.; Olivain, C.; Alabouvette, 2003).

Voor een teler is het dan ook van belang niet alleen te weten dat er Fusarium spp. in het perceel aanwezig zijn, maar ook of de betreffende stam pathogeen is, welke f. sp. het betreft en idealiter hoeveel ruststructuren er in de grond aanwezig zijn, het zogenaamde inoculumpotentieel van de bodem. Deze maat voor potentiële ziektedruk wordt meestal bepaald in kolonievormende eenheden (CFU). Helaas is dit voor Fusarium spp. (nog) niet altijd mogelijk. Dit overzicht heeft als doel om inzichtelijk te maken wat er wel en niet kan qua Fusarium diagnostiek/detectie en welke methoden ervoor gebruikt kunnen worden.

2 De eigenschappen van *Fusarium oxysporum* ff. spp.

2.1 De levenscyclus



Afb. 1: *Schematische weergave van de levens-/ziektecyclus van Fusarium spp. in fasen van infectie (Beckman, C. H., 1987)*

De levenscyclus van *Fusarium oxysporum* ff. spp. (*Fofs*) bestaat grofweg uit twee delen, een saprofytische fase in de bodem en op gewasresten, en een plantpathogene fase rondom en in de waardplant (Afb.1). Zoals te zien op bovenstaande afbeelding kunnen tijdens de saprofytische fase (of bij het uitblijven van een waardplant, de overlevingsfase) zich verkorte sub-cycli voordoen waarmee de schimmel zichzelf (het inoculumpotentieel) in stand kan houden.

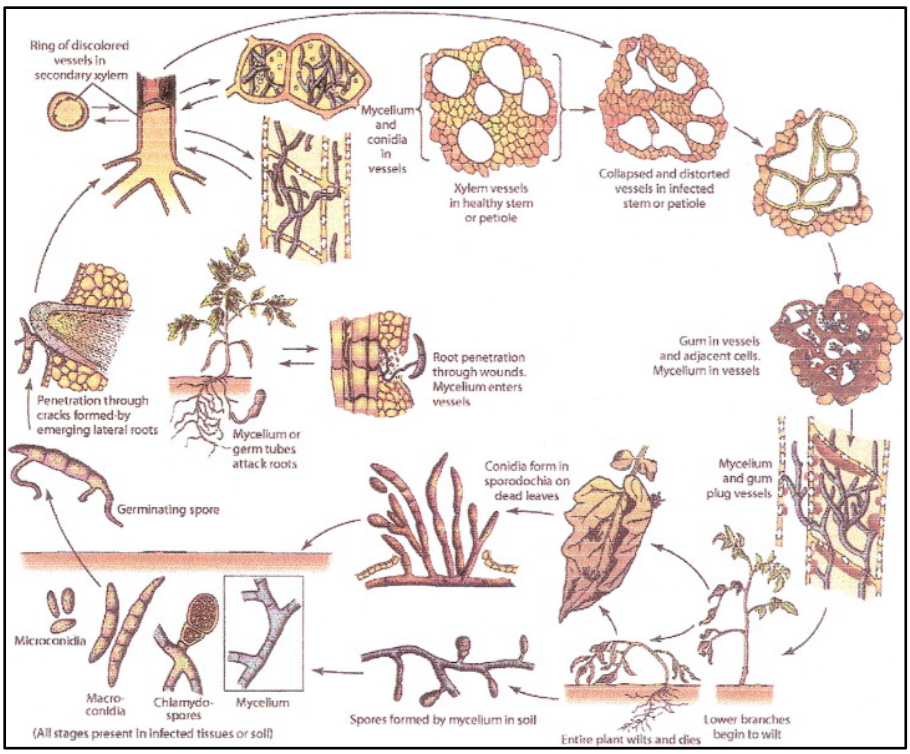
Wanneer je binnen deze fasen gaat kijken zie je dat er per fase veel verschillende stappen zijn die samen het proces van infectie, kolonisatie en uiteindelijk vermeerdering vormen (Afb. 2). Het proces begint bij een van de (overlevings)structuren van de schimmel in de bodem of in besmet weefsel (Afb. 2, linksonder. Omdat *Fofs* ook zonder waardplant in de bodem op organische deeltjes kunnen groeien kan de schimmel tegelijkertijd voorkomen als:

-Mycelium: dit is een relatief compacte massa van individuele schimmeldraden (hyfen). Het woord compact wordt hier gebruikt omdat sommige andere schimmelsoorten een 'pseudo-mycelium' vormen met minder dichte hyfen .

-Chlamydosporen: dit zijn (drie)dubbelwandige sporen die goed beschermd zijn tegen ongunstige invloeden uit de omgeving. Het zijn als het ware de overlevingsstructuren van de schimmel voor de lange termijn en ze vormen zich direct in de schimmelstructuren zoals de hyfen.

-Macroconidiën: dit zijn structuren met meestal 2-5 compartimenten (cellen) die voor de verspreiding op de korte(re) termijn bedoeld zijn, maar bij ongunstige omstandigheden tot chlamydosporen kunnen transformeren. Je kan ze als meervoudige sporen beschouwen. De macroconidiën hebben de typische banaanvormige of *'fusiforme'* groei die Fusarium zijn naam hebben bezorgd.

-Microconidiën: hetzelfde soort structuren als macroconidiën, maar kleiner, meestal 1-cellig, ook bedoeld voor verspreiding op de korte termijn maar kunnen niet tot chlamydosporen transformeren. Vertonen de meeste overeenkomsten met wat je in andere schimmels sporen zou noemen.



Afb. 2: *Weergave van de verschillende stappen van infectie, kolonisatie en vermeerdering van Fusarium oxysporum spp. (Agrios, G. N., 2005)*

Als er bronnen van koolstof, stikstof en ijzer beschikbaar zijn en de temperatuur voldoende hoog is (ca. 10 °C) kiemen de structuren (chlamydosporen, macroconidiën, microconidiën) en groeit er een kiembuis bij de wortels naar binnen door wonden, daar waar zijwortels door de epidermis naar buiten groeien of direct door de epidermis heen. Er wordt hierbij geen appressorium gevormd, wel worden soms celwand afbrekende enzymen uitgescheiden. De laag hieronder (de cortex) wordt vaak enige tijd gekoloniseerd, waarschijnlijk om voldoende voedingsstoffen te verzamelen om de centrale vaatbundel te koloniseren.

Na het doorbreken van de endodermis (de laag tussen de cortex en de centrale vaatbundel) groeien de hyfen het xyleem in en vormen microconidiën. Deze liften op de opwaartse stroom mee totdat ze een zeefplaat tegenkomen, waarna ze kiemen en de zeefplaat als hyfe passeren. De hyfen vormen dan een nieuw mycelium, vormen weer microconidiën enzovoort. De voedingsstoffen voor deze groei zijn afkomstig van de cellen die rondom het xyleem liggen (zie ook Afb. 2, linksboven).

Tegelijkertijd met het binnendringen van de schimmel in het xyleem begint ook de afweerreactie van de plant, welke door het vormen van gelachtige pluggen, de depositie van callose en het vormen van tylosen (uitgroeisels van de celwanden van cellen rondom het xyleem) de doorgang proberen te blokkeren. Bij een niet-resistente plant verlopen deze processen echter te langzaam, en dragen samen met de schimmelgroei bij aan het verstopt raken van het xyleem, waardoor de typische symptomen van verwelking en het bruin worden van het vaatweefsel ontstaan.

Bij bloembollen verloopt het infectieproces iets anders waarbij de schimmel of via de wortels of direct de bollen infecteert. De volgende informatie is afkomstig uit het boek "Ziekten en plagen bij bloembollen" (van Leeuwen et al., 2018).

Lelie: Tijdens de groei ontstaan aan de top en/of de zijkant van de bol en/of op de inplantingsplaats van de schubben licht- tot donkerbruine plekken, waar het schubweefsel begint te rotten (schubrot); deze plekken kunnen sterk verschillen in vorm en grootte. Ook de bolbodem kan worden aangetast. Dit wordt bolrot genoemd, vooral indien de aantasting beperkt blijft tot de bolbodem en zo heftig is dat de schubben loslaten van de bolbasis.

Tulp: Besmetting vanuit de grond kan bij een onvoldoende ruime vruchtwisseling mede een rol spelen bij de verspreiding van de ziekte. Deze infectiebron is vooral belangrijk, indien de tulpen in een warm najaar relatief vroeg worden geplant. De schimmel dringt dan gemakkelijk de bolbodem binnen langs de naar buiten brekende wortels, wat het volgende voorjaar onder daarvoor gunstige omstandigheden (warmte) kan leiden tot 'blauwe planten' en 'bodemzuur'. Tijdens het verwerken en bewaren van de oogst worden de sporen gemakkelijk verspreid via water, handen of machine-onderdelen, of door de lucht. Indien zij op het beschadigde oppervlak van nog natte bollen terechtkomen, kunnen de sporen snel kiemen en de buitenste bolrok infecteren.

Uiteindelijk verwelkt de waardplant in zulke maten dat deze deels of in zijn geheel afsterft en omvalt. In en op het afstervende en dode weefsel worden clusters van conidiënvormende structuren gevormd (sporodochia) waarop micro- en macroconidiën groeien. Als de omgevingstemperatuur te laag word, er niet voldoende voedingsstoffen aanwezig zijn of als gekoloniseerde plantenresten enige tijd in het donker komen te liggen worden ook chlamydosporen gevormd. Zodra de omstandigheden het weer toelaten begint de cyclus opnieuw.

2.2 Verspreiding en bemonstering in het veld

Uit onderzoek naar de verspreiding van *Fofs* in erwt (*Pisum sativum*) (Oyarzun, 1994), asperge (*Asparagus officinalis*) (Blok & Bollen, 1997), katoen (*Gossypium hirsutum*) (Davis et al., 2006), banaan (*Musa* spp.) (Ghag et al., 2015) en kikkererwten (*Cicer arietinum*) (Jiménez-Díaz et al., 2015) blijkt dat er verschillende manieren van verspreiding zijn. Wind en water, besmette grond, gewasresten, zaad en plantmateriaal zijn allemaal potentiële besmettingsbronnen. Bij gewassen die op ruggen geteeld worden is de invloed van afstromend irrigatie- of regenwater groot. Onderstaande afbeelding (Afb. 3) laat ook heel duidelijk zien dat de besmetting meelift in de richting van de grondbewerkingen.

De rol van zaad in de verspreiding geeft geen eenduidig beeld en lijkt te verschillen per gewas en *formae specialis*. Zo is de verspreiding van *F. oxysporum* f. sp *vasinfectum* (Fusarium van katoen) in de orde van 5% besmet zaad bij een resistent ras katoen tot 21% bij een zeer vatbaar ras. In kikkererwt wordt zaad juist als een van de belangrijkste manieren van verspreiding gezien (22% besmet zaad van een *Fusarium* tolerant ras).

(Blok & Bollen, 1997) leggen in hun werk aan asperge ook de nadruk op verspreiding via ander plantmateriaal en het belang van 'reservoir'-waardplanten. Hiermee worden planten aangeduid waarop *F. oxysporum* weliswaar niet als pathogeen voorkomt (geen ziektesymptomen) maar wel het inoculum in de bodem in stand houden of vermeerderen waardoor de ziektedruk niet af- en soms zelfs toeneemt.

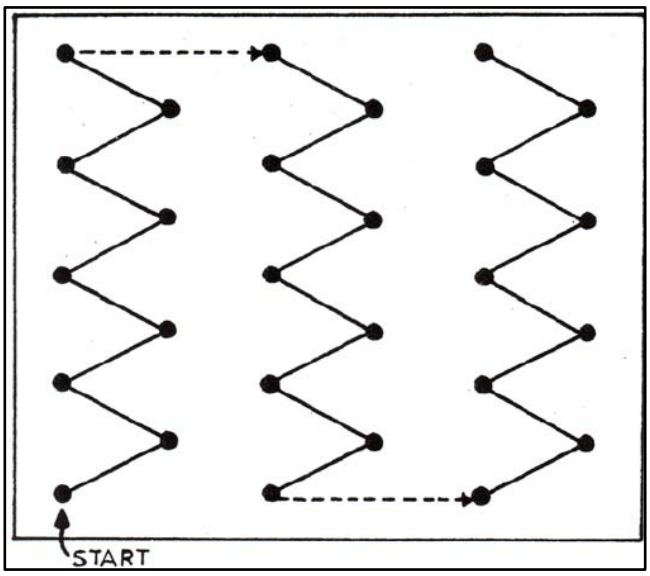
Afb. 3: *Verspreiding van F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in een veld met katoen (Davis et al., 2006)

Zaden worden besmet door bestuiven met grond of bespatten met water waarin overlevingsstructuren van de schimmel aanwezig zijn. De hyfen groeien dan veelal door natuurlijke breuken in de zaadhuls naar binnen, koloniseren een deel van het endosperm van het zaad (de voedselvoorraad voor het plantembryo) en vormen er chlamydosporen.

Door de in veel gevallen 'vlekkerige' verspreiding van *Fofs* over een perceel is het belangrijk bij het bemonsteren zo verspreid mogelijk over het veld te monsteren. Een diepgaande studie naar het voet- en wortelrotcomplex van vlinderbloemigen waarvan *Fusarium solani* f. sp. *pisi* een van de hoofdveroorzakers is (Oyarzun, 1994), leverde het volgende bemonsteringsprotocol op:

Voor elk te onderzoeken perceel wordt 1 hectare (ha) gekozen dat (bijvoorbeeld via veldhistorie) representatief wordt geacht. Akkerranden, waterlopen en hellingen zijn hiervoor niet geschikt. Binnen deze ha worden na het ploegen in de herfst 50 submonsters genomen met een guts (5 cm) op 20-25 cm diepte, waarbij een W-vormig patroon wordt aangehouden (methode Nematologie) (Afb. 4) met ongeveer 1 monster (dus 50 steken) per 200 m rij. Voor een grove indicatie van de besmettingsgraad kan per 0,33 ha een monster gestoken worden. Het vaststellen van het verspreidingspatroon is met de laatstgenoemde wijze van monstername niet mogelijk.

Wanneer bijvoorbeeld door hoogteverschillen een gradiënt in het perceel te verwachten is, monsters dwars op deze gradiënt nemen. Monsters verzamelen in een plastic zak en zo snel mogelijk bewaren bij 4 °C. Als monsters erg nat zijn (uitlopend water) deze aan de lucht laten drogen.



Afb. 4: *Patroon van monstername ten behoeve van biotoets bodemschimmels (Oyarzun, 1994)*

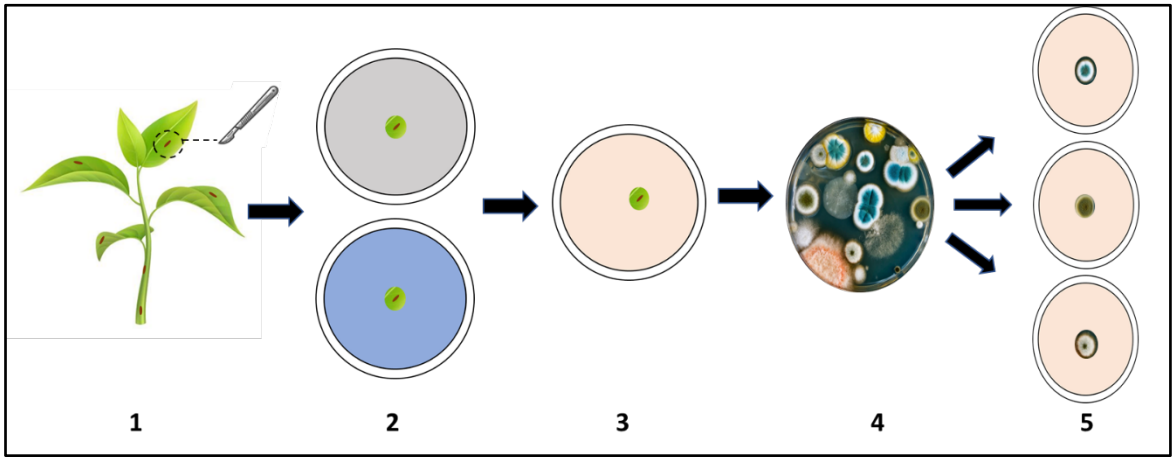
3 Klassieke methoden

Hieronder zijn kort de methoden beschreven die al sinds tientallen jaren worden gebruikt om schimmels te identificeren en kwantificeren. De methoden zijn beschreven en vergeleken door McMullen & Stack (1983).

3.1 Uitplaten van plantendelen

Een van de klassieke methoden om de aanwezigheid van een bepaalde schimmel in plantenmateriaal aan te tonen is door een aangetast stukje plant, zoals een lesie of vlek, op een voor de schimmel selectief medium te plaatsen (voor *Fusarium* spp. wordt meestal Komada`s of Nash & Snyder medium gebruikt) en te zien of er uitgroei plaatsvind (Afb. 5). Voorafgaand aan het uitplaten wordt het stukje plantenmateriaal uitwendig ontsmet (bijvoorbeeld in ethanol of een 1% chlooroplossing) en vervolgens afgespoeld in steriel water om besmetting van het medium met organismen die niet de symptoomveroorzaker zijn zo klein mogelijk te maken. Na uitgroeien van de kolonies worden delen uit de rand van de kolonies of enkele sporen overgeënt op nieuw medium om zuivere isolaten te verkrijgen.

Omdat bij deze methode niet al het vermeerderingsmateriaal (chlamydosporen, conidiën) het medium raakt, zullen niet alle sporen kiemen. De sporen die wel kiemen, groeien waarschijnlijk door de hoge plaatselijke dichtheid door elkaar heen, waardoor het kwantificeren van de kolonievormende eenheden (CFU) erg lastig is. Deze methode is, mits zuivere isolaten kunnen worden verkregen en op basis van morfologische kenmerken op naam kunnen worden gebracht, dus voornamelijk kwalitatief (tot soortniveau).



Afb. 5: *Schematische weergave uitplaten plantendelen, met 1) Wegsnijden aangetast plantendeel, 2) Steriliseren in ethanol/chlooroplossing en afspoelen met steriel water, 3) Uitplaten op selectief medium, 4) Uitgroei van schimmels die op het medium kunnen groeien, 5) Randen van kolonies overenten tot zuivere isolaten zijn verkregen*

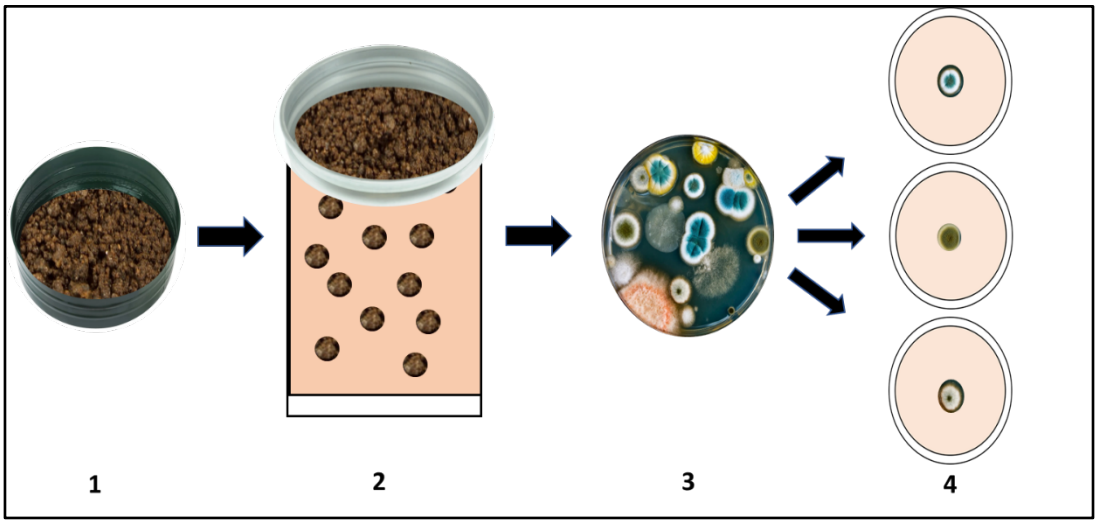
3.2 Uitplaten van grond (minerale deel)

Schimmels zijn vaak in meerdere vormen tegelijk in de bodem aanwezig (mycelium, conidiën). Omdat *Fusarium* spp. ook saprofytisch (zich op dood organisch materiaal voedend) in de bodem voor kunnen komen, kunnen ze zowel vanuit mycelium, chlamydosporen en conidiën uit de bodem geïsoleerd worden. Van deze methode bestaan twee varianten, de originele methode van Warcup (Warcup, 1955) en een modificatie daarvan.

In de originele methode van Warcup wordt een hoeveelheid, vaak klonterige grond van ca. 15 gram verzadigd met water, met een waterstraal zo nodig in kleinere stukken gebroken en vervolgens wordt de suspensie te bezinken gezet. Na 15 minuten wordt het grootste deel van de suspensie afgegoten zodat de zwaarste delen overblijven. Dit proces wordt herhaald totdat de suspensie na opspoelen helder blijft. De grovere delen die overblijven worden op een selectief medium gebracht, en schimmels van daaruit overgeënt tot een zuiver isolaat wordt verkregen.

Omdat deze methode tijdrovend en arbeidsintensief is, is deze later aangepast naar het grof verkruimelen van een brokje grond en delen kleiner dan 1 mm diameter eruit te zeven. De delen met een diameter tussen de 1 en 2 mm worden of met een zeef over een grote plaat met selectief medium verdeeld of individueel uitgeplaat voor optimale spreiding (Afb.6).

Op deze manier worden de aanwezige bronnen van inoculum veel fijner verspreid en is de kans op contact met het selectieve medium groter. Er moet echter wel rekening mee worden gehouden dat potentieel grote hoeveelheden inoculum met het zeven verdwijnen. Als het mogelijk is zuivere isolaten te verkrijgen en de schimmel op morfologische kenmerken op naam te brengen, is deze methode zowel kwalitatief (tot soortniveau) als semi-kwantitatief. Daarbij moet worden opgemerkt dat het morfologisch herkennen van Fusarium zeer lastig is omdat veel soorten soortgelijke structuren en pigmenten vormen en daarom vaak overgegaan wordt op herkenning op grond van DNA-sequentiedata.



Afb. 6: *Schematische weergave uitplaten grond, met 1) Grof zeven (verwijderen delen groter dan 1 cm), 2) Fijn zeven (delen 1 – 2 mm) boven grote plaat selectief medium, 3) Uitgroei van schimmels die op het medium kunnen groeien, 4) Randen van kolonies overenten tot zuivere isolaten zijn verkregen*

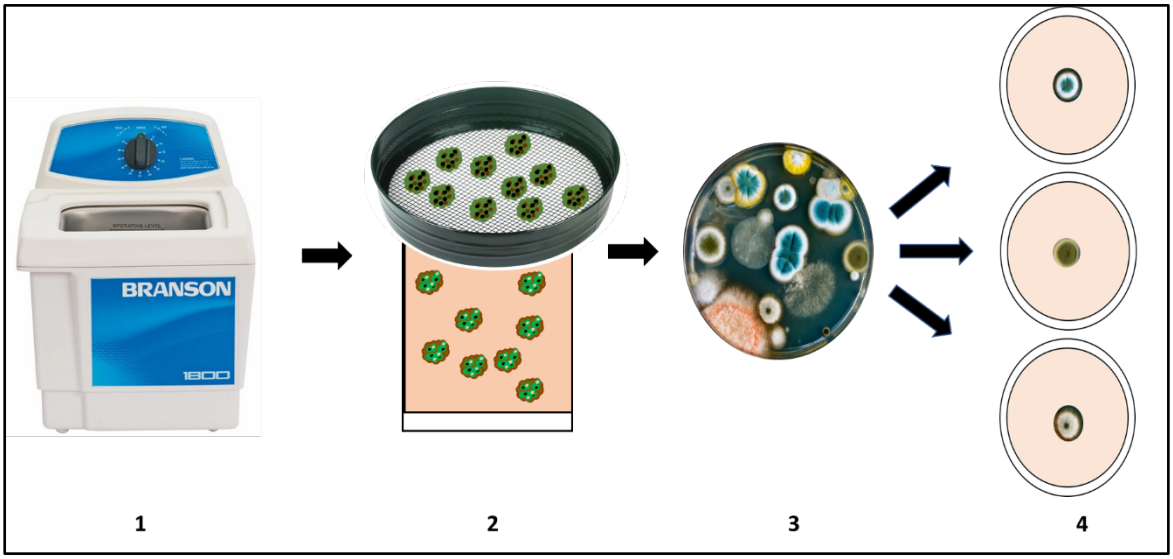
3.3 Uitplaten van organische delen

Naast het uitplaten van de grond (het minerale oftewel anorganische deel) kan ook juist het organische deel op een selectief medium geplaatst worden. Omdat *Fusarium* spp. ook saprofytisch (zich op dood organisch materiaal voedend) in de bodem voor kunnen komen, worden stukjes organisch materiaal intensief gekoloniseerd.

Bij deze methode wordt een grondmonster al dan niet nat gezeefd (door te spoelen met water). Parkinson en Williams (Parkinson & Williams, 1960) namen de grondspoelmethode van Warcup als startpunt maar verfijnden zijn methode. Ze gebruikten hiervoor een set van drie achtereenvolgende zeven met een steeds kleiner wordende maaswijdte (1 mm, 0.75 mm en 0.2 mm). Uit hun proeven bleek dat de meeste soorten Fusarium werden aangetroffen in de fractie macroaggregaten >1 mm en in de organische delen.

Omdat scheiding van organische delen, al dan niet in aggregaten met minerale delen op basis van grootte lastig is, wordt tegenwoordig meer uitgegaan van het verschil in dichtheid. Cerli en collega's (Cerli et al., 2012) testten verschillende dichtheden van suspensieoplossingen en sonificatie-intensiteit voor het scheiden van nagenoeg zuiver organisch materiaal van minerale delen. Zij kwamen tot een protocol waarmee de lichtste en op een na lichtste fractie van het organische materiaal van de bulk van de minerale delen gescheiden kon worden. Deze twee fracties waren het rijkst aan organische koolstof met nagenoeg geen 'vervuiling' met minerale delen. Zie voor het volledige protocol de publicatie van Cerli (Cerli et al., 2012). Net zoals bij het uitplaten van de (minerale delen van de) grond kan ervoor gekozen worden deze delen met een zeef te verdelen over een grote plaat of ze individueel te uit te platen op selectieve media, al naar gelang het doel (Afb. 7). Dit kan een identificatie, kwantificatie van een specifieke soort of een idee geven van de samenstelling van de schimmelpopulatie van de organische delen.

Parkinson & Williams zagen dat alle verschillende *Fusarium* spp. die ze in totaal uit de verschillende fracties minerale en organische delen isoleerden ook op alleen de organische delen aanwezig waren. Bij deze manier van isoleren worden de aanwezige bronnen van inoculum relatief goed verspreid en is de kans op contact met het selectieve medium groot. Er moet echter wel rekening mee worden gehouden dat potentieel grote hoeveelheden inoculum met het zeven verdwijnen. Daarnaast kan het voorkomen dat, afhankelijk van de concurrentiekracht van een bepaalde soort, organische delen grotendeels door dezelfde soort gekoloniseerd kunnen worden, terwijl er wel andere soorten in de bodem aanwezig zijn. Als het mogelijk is zuivere isolaten te verkrijgen en de schimmel op morfologische of moleculaire (DNA) kenmerken op naam te brengen, is deze methode zowel kwalitatief (tot soortniveau) als semi-kwantitatief.



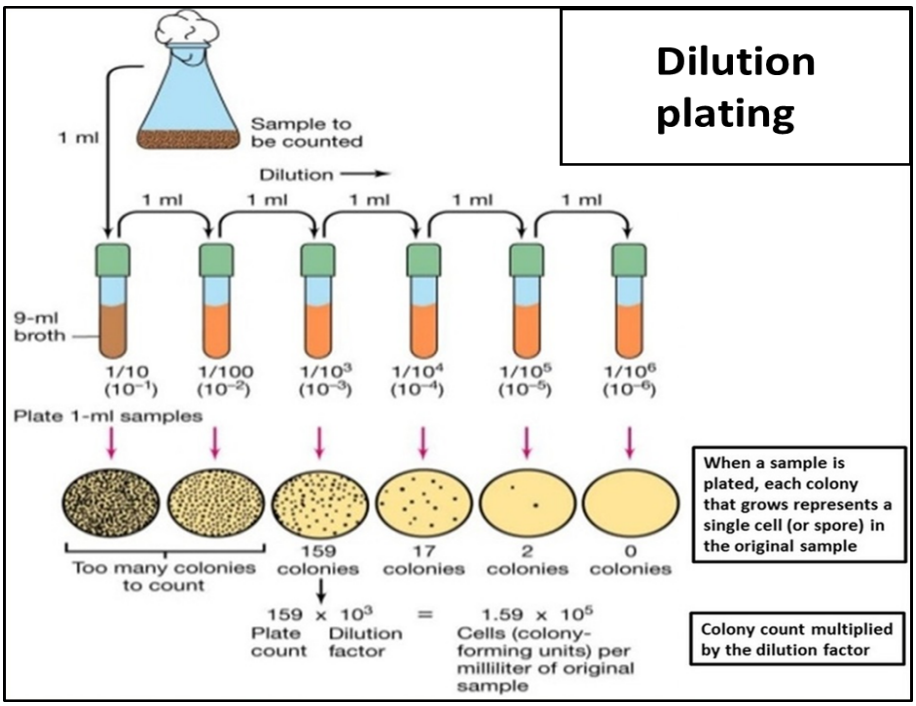
Afb. 7: *Schematische weergave uitplaten organische delen, met 1) Sonificatie in water of oplossing met specifieke dichtheid, 2) Met een zeef verdelen of individueel uitplaten van organische delen, al dan niet op selectief medium, 3) Uitgroei van schimmels die op het medium kunnen groeien, 4) Randen van kolonies overenten tot zuivere isolaten zijn verkregen*

3.4 Uitplaten van grondsuspensies in verdunningsreeks

Wellicht de oudste methode voor het kwantificeren van bodemschimmels (en bacteriën) is het fijnmaken van grond en het maken van een suspensie hiervan met steriel water of een bufferende oplossing (zoals kalium- of magnesiumsulfaat). Deze suspensie wordt in stappen van 10 verdund, vaak in een serie van 1:10 tot 1:10^7 (oftewel een suspensie met een dichtheid van 10^{-7} van het originele monster) (Afb. 8).

Afhankelijk van het doel en de dichtheid van de aanwezige organismen worden verschillende verdunningen geteld, voor bacteriën (uit de rhizosfeer, de directe wortelomgeving) vaak de verdunningen 10^{-5} tot 10^{-7}. Schimmels komen in verhouding tot bacteriën in absolute aantallen minder voor, waardoor met de verdunning 10^{-3} tot 10^{-5} kan worden volstaan. Let wel dat dit vuistregels zijn, waarop uitzonderingen natuurlijk mogelijk zijn. Van deze verdunningen wordt in de regel 100 µL (0.1 mL) op een selectief medium gebracht meestal in een aantal herhalingen per verdunning. Het aantal koloniën dat na een bepaalde tijd uitgroeit wordt geteld, per verdunning het gemiddelde aantal van de herhalingen berekend en vermenigvuldigd met de verdunningsfactor. Eventueel kan CFU berekend worden als aantal per gram of milligram grond in de suspensie.

De belangrijkste kritiek op het uitplaten van een suspensie met fysieke bodemdeeltjes is dat bodemdeeltjes vanwege hun sterk heterogene karakter nooit gelijkmatig verdeeld zullen zijn. Daarom zijn er verschillende homogenisatietechnieken aan het protocol toegevoegd. Zo ontwikkelden Buxton en Kendrick hiervoor zelf een soort luchtpomp die bodemdeeltjes gelijkmatig zou moeten verspreiden bij een gegeven luchtdruk (Buxton, E. W & Kendrick, 1963).



Afb. 8: *Schematische weergave van de bereiding van een verdunningsreeks (Loreto College, onbekend)*

Tegenwoordig worden bacteriën en schimmelstructuren vaak door een combinatie van sonificatie en schudmengen (vortexen) van bodem- en plantendelen gescheiden. Bij sonificatie worden monsters in suspensie gebracht in een bepaalde container (reageerbuis of Eppendorf) en in een sonificatiebad geplaats. Dit apparaat veroorzaakt via geluidstrillingen microscopisch kleine vacuümbellen in de suspensie die bij het in elkaar klappen trillingen veroorzaken en zo bacteriën en schimmelstructuren losschudden.

De vaste delen worden uit de suspensie gefilterd zodat alleen een suspensie met bacteriën en schimmelstructuren op plaat wordt gebracht. Met deze methode wordt het inoculum erg goed gemengd en is de kans groot dat het op individueel niveau (een enkele bacterie, een enkele schimmelspoor) op het selectieve medium komt. Als het mogelijk is zuivere isolaten te verkrijgen en de schimmel op morfologische of moleculaire (DNA) kenmerken op naam te brengen, is deze methode zowel kwalitatief (tot soortniveau) als kwantitatief.

3.5 Nadelen klassieke methoden

Er zijn dus een aantal methoden om onderzoek te doen naar schimmels in planten en in de bodem. Afhankelijk van de gekozen methode zijn deze kwantitatief redelijk tot goed bruikbaar voor het genomen monster. Uit de vergelijking van McMullen & Stack bleek dat Komada`s medium (Komada, 1975) even goed presteerde in de isolatie van *Fusarium* spp. als twee andere selectieve media (Martin`s medium (Martin, 1950) en Nash & Snyder (NS) medium (Nash & Snyder, 1962)). Daarnaast zijn er verschillende andere selectieve media baseren op verschillende inhoudsstoffen (bijvoorbeeld Malachite green agar (Castellá et al., 1997) en myclobutanil agar (Vujanovic et al., 2002)). Komada's medium dat zijn selectiviteit dankt aan pentachloronitrobenzeen is het selectieve meidum dat het meest gebruikt wordt.

Het uitplaten van organische delen leverde de hoogste diversiteit aan *Fusarium* spp. op, maar het uitplaten van minerale delen leverde qua aantallen CFU de meeste betrouwbare data op (vergelijkbaar met het uitplaten van een verdunningsreeks).

Alle klassieke methoden kennen echter enkele gemeenschappelijke nadelen:
1. Ze zijn zeer bewerkelijk, en dus tijds- arbeid- en kapitaalintensief.

2. Omdat ze zo bewerkelijk zijn is het aantal geanalyseerde monsters vaak beperkt, waardoor meestal gekozen wordt de aantallen in de tijd (jaar na jaar of voor en na een teelt) en niet in de ruimte (verspreiding in het veld) te onderzoeken.

3. Het accuraat op naam brengen van een schimmel aan de hand van morfologische eigenschappen is specialistenwerk en vereist veel tijd en kennis. Bovendien zijn sommige soorten en het overgrote deel van de stammen binnen een soort niet morfologisch te onderscheiden.

4. Als men er in slaagt zuivere isolaten te verkrijgen en deze correct op soortnaam te brengen is niet bekend of A) het een pathogeen isolaat betreft en B) of men van doen heeft met een gespecialiseerde stam (*forma specialis*) en zo ja, welke.

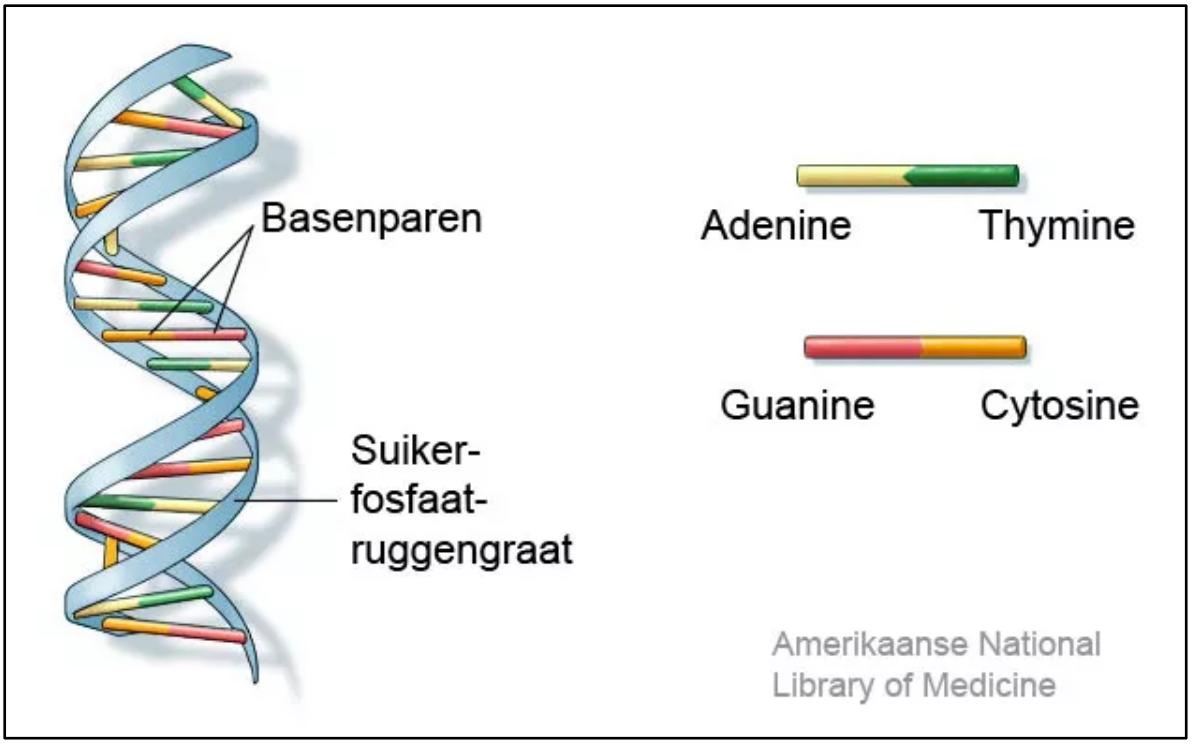
4 Moleculaire methoden

In dit deel worden de methodes voor het op naam brengen van schimmels en eventueel het onderscheiden van *formae speciales* (f. spp.) beschreven die uitgaan van genetisch materiaal (in dit overzicht ligt de focus op DNA). Hoewel er veel verschillende methoden zijn om op basis van het DNA onderscheid te maken tussen organismen (dit wordt ook wel 'molecular/genetic fingerprinting' genoemd) is een groot deel hiervan vanwege hun complexiteit, specifieke werking of bepaalde randvoorwaarden voor hun gebruik minder geschikt als diagnostische tool. In dit overzicht worden de meest gebruikte methodes die zich hier wel goed voor lenen beschreven zonder diep in detail te treden.

4.1 Wat is DNA precies?

Desoxyribonucleïnezuur ('Desoxyribonucleic acid' (DNA)) bevat de moleculaire blauwdruk van een organisme. Het bevat alle mogelijke eigenschappen van het organisme, ongeacht of deze tot uiting komen. Het aantal eigenschappen besloten in het DNA noemen we het genotype, de eigenschappen die tot uiting komen (die zichtbaar/meetbaar zijn zonder naar het DNA te kijken) noemen we het fenotype. Het verschil hiertussen ligt in de omstandigheden waarin het organisme leeft (en welke eigenschappen het nodig heeft om te overleven.

DNA als molecuul bestaat uit een lange keten van zogenaamde nucleotiden (Afb. 9). Alle nucleotiden bevatten een suikergroep (ribose) en een fosfaatgroep, deze vormen de 'ruggegraat' van het DNA. Wat van belang is voor identificatie zit daaraan vast, dat zijn de basen adenine, thymine, guanine en cytosine. In het DNA vormen deze basen vaste paren (adenine altijd tegenover thymine, guanine altijd tegenover cytosine).



Afb. 9: *Schematische weergave van de structuur van DNA (US National Library of Medicine, 2015)*

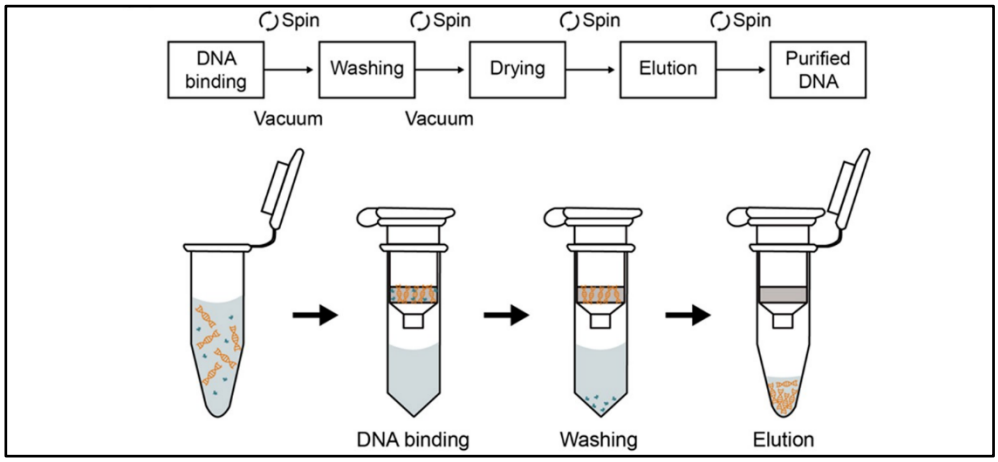
De eigenschappen van een organisme liggen besloten in de sequentie, dus de volgorde waarin deze baseparen aanwezig zijn. Door bepaalde processen is deze sequentie voor elk individu uniek, maar tussen nauwverwante individuen, zoals schimmels van dezelfde soort of dezelfde f. sp. bestaan wel grote overeenkomsten. Het is dankzij deze overeenkomsten in basenparensequentie dat we organismen kunnen herkennen en indelen op basis van hun genetische materiaal.

4.2 Extractie van genetische materiaal

Hoewel het gebruik van deze methodes natuurlijk begint met de monstername is dit een onderwerp wat op zichzelf behandeld moet worden. We gaan er hier daarom vanuit dat een representatief grond- of plantrestenmonster is genomen dat netjes is verpakt en voldoende gekoeld bij een laboratorium aankomt voor verwerking. DNA is chemisch stabieler dan vaak gedacht wordt en denatureert niet snel. In grond of plantenmateriaal kunnen wel enzymen voorkomen die het DNA afbreken (bijvoorbeeld afkomstig van micro-organismen). Door een monster op 6 °C of koeler te bewaren neemt de activiteit van de enzymen sterk af. Overigens is het DNA in levende cellen natuurlijk beschermd tegen deze enzymen, waardoor dit koelen vooral van belang is wanneer er interesse is in 'meta-DNA', DNA dat als los molecuul in het te onderzoeken materiaal voorkomt.

De eerste stap is nu het extraheren van het genetisch materiaal. Hiervoor zijn door bedrijven als Thermo Fisher, Promega en QIAGEN speciale kits samengesteld met alle reagentia en filters die je nodig hebt voor een DNA extractie. Plantenresten en organische delen worden vaak bevroren m.b.v. vloeibare stikstof (-196 °C) en na toevoeging van metalen balletjes (beads) tot poeder geschud om het reactieoppervlak zo groot mogelijk te maken en cellen kapot te maken zodat het DNA eruit te halen is.

De meeste van deze kits maken gebruik van de zogenaamde BOOM-methode (Afb. 10), wat erop neerkomt dat de cel wordt opengebroken (gelyseerd) en eiwitten (enzymen) buiten werking worden gesteld om vertering van het DNA tegen te gaan. Hierna wordt het DNA gebonden aan een silica membraan of silica balletjes en worden de eiwitten en vetten weggewassen. Vervolgens wordt het DNA weer van het membraan of de balletjes losgemaakt (geëludeerd), waarna een oplossing met alleen DNA overblijft.

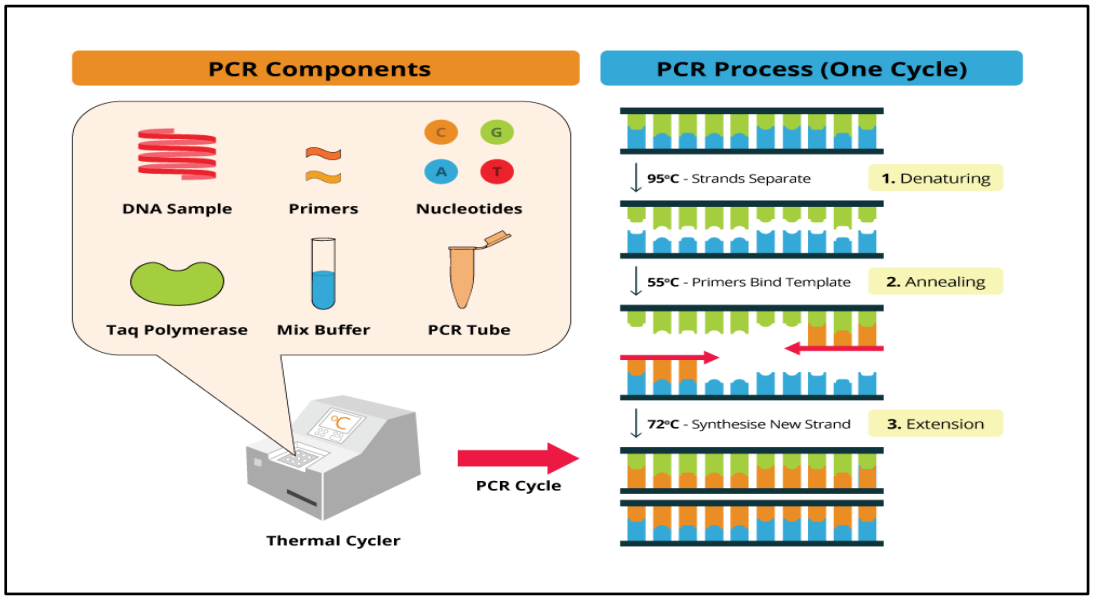


Afb. 10: *Schematische weergave van de BOOM-methode van DNA-extractie, de lyse-stap wordt niet weergegeven (Lee, H., Na, W., Park, C. et al, 2018)*

4.3 (quantitative) Polymerase Chain Reaction

Nu er (voldoende) zuiver DNA is geëxtraheerd kan ervoor gekozen worden al het DNA te vermeerderen met een normale PCR, of om een gericht deel van het DNA te vermeerderen en direct bepaalde sequenties te detecteren of de hoeveelheid te bepalen met een kwantitatieve PCR, genaamd qPCR (q = kort voor het Engelse quantitative). Soms wordt ook de term RT (Real Time)-PCR gebruikt omdat het apparaat tijdens de reactie de op dat moment aanwezige concentratie DNA meet (dus in Real Time).

Ongeacht de keuze is het basisprincipe hetzelfde (Afb. 11): d.m.v. een enzym (DNA-polymerase), een set primers (korte stukjes genetisch materiaal) en nucleotiden van alle vier de typen wordt een deel van het geëxtraheerde DNA vermeerderd. De primers zijn bepalend voor welk deel, omdat ze de aanhechtingsplaats vormen voor DNA-polymerase. Bij een goed geoptimaliseerde PCR wordt het aantal moleculen genetisch materiaal iedere ronde ongeveer verdubbeld. Door allerlei kleine complicaties wordt een vermenigvuldigingsgetal van exact 2 echter vrijwel nooit gehaald.

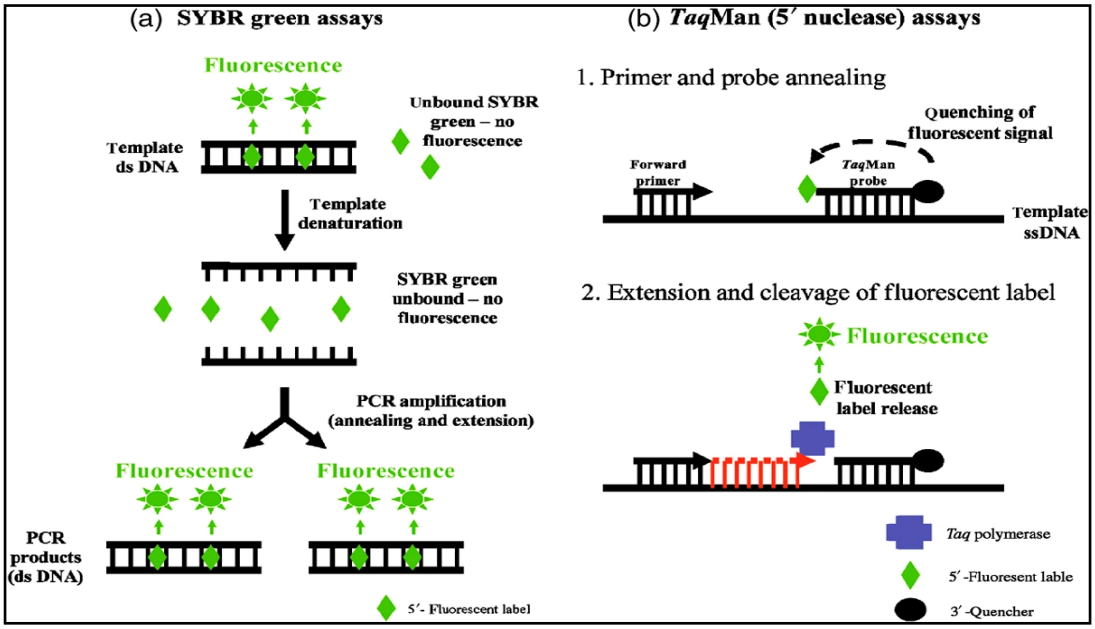


Afb. 11: *Schematische weergaven van een PCR-reactie (www.thebiologynotes.com)*

Na de PCR is er veel meer genetisch materiaal aanwezig dat vrijwel volledig bestaat uit het door de primers aangewezen deel van het DNA. Deze stap (een normale PCR) wordt vaak gebruikt voorafgaand aan moleculair onderzoek en soms voor kwalitatieve bepalingen om de kans op detectie te verhogen.

Een kwantitatieve PCR (qPCR) heeft de vermeerdering en de detectie in één stap zitten. Er kan op verschillende manieren en niveaus gedetecteerd worden. Het totaal aan vermeerderd DNA kan gemeten worden met zogenaamde 'intercalerende verf' (Afb. 12A). Deze kleurstof (meestal fluorescent groen met productnaam SYBR Green) bindt middenin de baseparen (dus bijvoorbeeld tussen adenine en thymine in). De moleculen zijn fluorescent wanneer ze eenmaal aan DNA gebonden zijn.

Voor de detectie van een specifiek stukje DNA (dus een specifieke sequentie van basen) met behulp van de *Tag*Man techniek worden fluorescente probes in plaats van kleurstoffen gebruikt (Afb. 12B). Een probe is een stukje enkelstrengs DNA (esDNA) van 18-22 basen lang, en zo ontworpen dat de sequentie van de basen van de probe past op de sequentie van de basen die gedetecteerd moeten worden.



Afb. 12: *Schematische weergave detectiemethoden in qPCR, A) Detectie van totale hoeveelheid DNA via intercalerende SYBR Green kleurstof, B) Detectie van specifieke basensequentie d.m.v. een TaqMan-probe met fluorofoor en quencher (Smith & Osborn, 2008)*

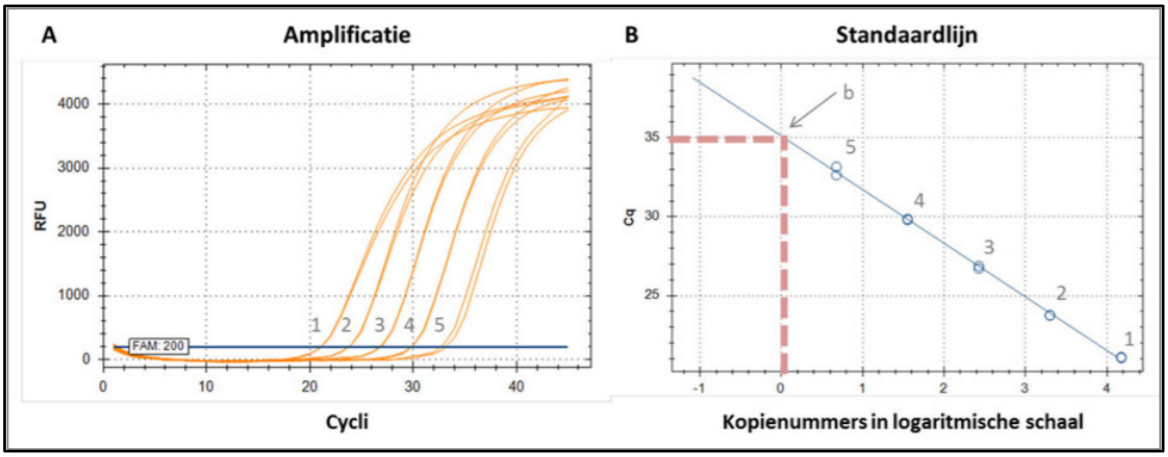
Hoewel er andere producten zijn, wordt door vrijwel elk laboratorium *Tag*Man-probes gebruikt omdat deze meestal minder achtergrond signaal en onjuist positieve reacties geven. Deze probes hebben dus een specifieke 'detectie'-sequentie van basen en gemodificeerde uiteindes met aan een uiteinde een zogenaamde 'reporter', een fluorofoor (ook wel een fluorochroom genoemd) dat een fluorescent signaal uitzendt, en aan het andere uiteinde een 'quencher', een molecuul dat het signaal van de fluorofoor absorbeert zolang de twee moleculen relatief dicht bij elkaar in de buurt zijn. *Taq*Man-probes hechten tijdens de 'annealing-fase' van het PCR-proces aan het esDNA en worden door het DNA-polymerase enzym ingebouwd in de 'extensie-fase'. Hierbij wordt zowel de reporter (de fluorofoor) als de quencher losgemaakt van het stukje esDNA. Hierdoor komt de reporter ver genoeg van de quencher vandaan om zijn fluorescente signaal uit te zenden.

Bij het meetproces is de Cycle of Quantification (Cq) het meeste belangrijk (Afb. 13A). De Cq geeft het aantal cycli van de thermocycler aan waarbij het fluorescente signaal voor het eerst boven de detectiegrens uitkomt. Als de detectiegrens goed bepaald is voorkomt de hoogte ervan dat 'achergrondsignaal' van de fluorescente moleculen (dus de fluoroforen) als amplificatiesignaal wordt gemeten. Hoe meer DNA er in het monster aanwezig is, hoe sneller de hoeveelheid DNA stijgt, en hoe sneller het signaal boven de detectiegrens uitkomt. Monsters met veel DNA hebben dus minder cycli nodig en geven een lagere Cq-waarde. Doorgaans worden per 'run' 32 tot 42 cycli gebruikt, afhankelijk van de verwachte hoeveelheid DNA en de efficiëntie van het proces. Een waarde voor de efficiëntie (E) wordt ook door het qPCR-apparaat gegeven. Deze zou tussen de 90 en de 110% moeten zijn. Een efficiëntie van meer dan 100% is mogelijk in qPCR-reacties door verschillende vormen van artefactvorming (primer dimeren, vermeerdering van niet-target DNA enz.).

Als controle kan er van bijvoorbeeld schimmelsporen of van bekende hoeveelheden DNA van de schimmel een verdunningsreeks gemaakt als ijklijn. Deze ijklijn met Cq-waarden op de y-as en het theoretisch aantal kopieën in logaritmische schaal op de x-as kan dan gebruikt worden om kwantitatief in te schatten hoeveel schimmelmateriaal er in een monster zit (Afb. 13B). Bij deze ijklijn ontstaat een rechte lijn (een lineair verband dus) met de formule:

Cq-waarde = a * (aantal kopienummers) + b

Waarbij: a = helling van de lijn
b = de Cq-waarde waarbij het aantal kopienummers theoretisch 0 is.



Afb. 13: *Voorbeeld van de output van een qPCR en terugrekening naar het aantal kopieën van het target DNA met A) Amplificatiecurven van 5 verdunningen van een monster en B) Ijklijn voor het bepalen van het aantal kopieën van het target DNA aan de hand van de Cycle of Quantification (Cq). De letter 'b' geeft het punt aan waarop het aantal kopieën theoretisch gezien 0 is (Aartse, A., 2017)*

In bovenstaande afbeelding is te zien dat er, wanneer er geen signaal boven de detectiegrens is na 35 cycli, er vanuit wordt gegaan dat het target DNA niet in het monster aanwezig was. Omdat normaliter per 'run' 32 tot 42 cycli worden gebruikt is dat hier een redelijke aanname. Met behulp van bovenstaande formule kan nu het aantal kopienummers bij aanvang van de reactie bepaald worden. Als ook bekend is hoeveel van een bepaalde DNA-sequentie er uit een individu geëxtraheerd word kan vrij exact het aantal CFU bepaald worden en daarmee is deze methode zowel kwalitatief als kwantitatief.

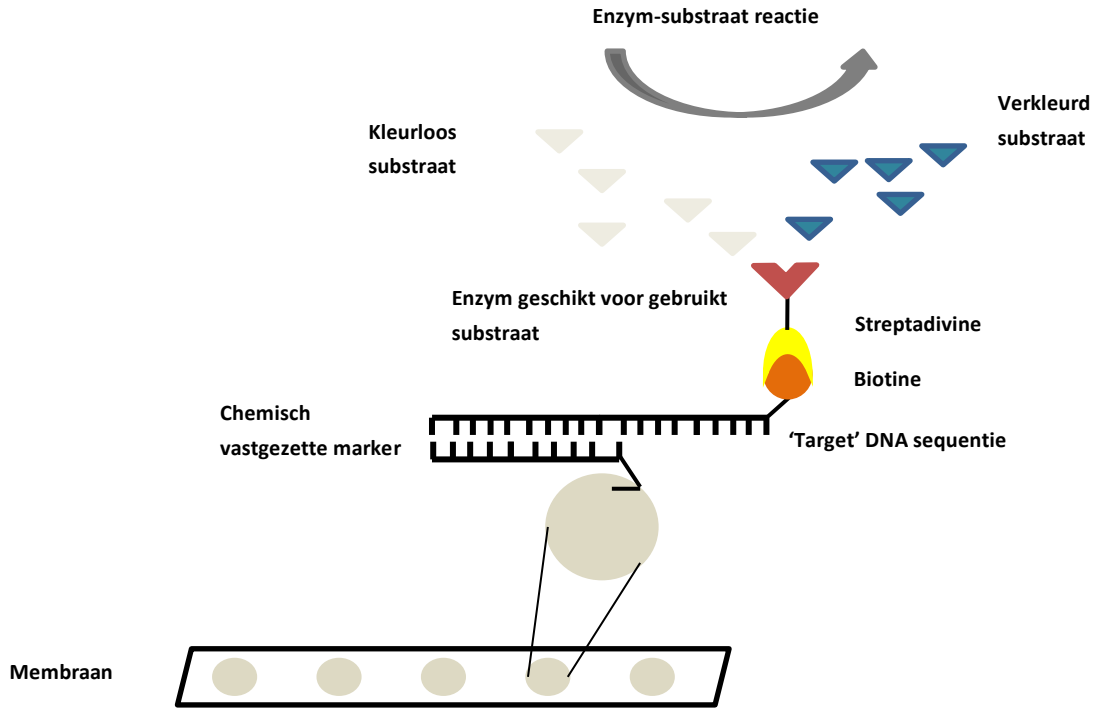
4.4 Blotting en Reverse Blotting

Een alternatieve methode voor het detecteren van specifieke delen DNA is door blotten en reverse blotten. De algehele methode is complex, maar het basisprincipe is dat moleculen genetisch materiaal of eiwitten (in dit geval is het DNA) aan een geladen membraan (meestal van cellulosenitraat of nylon) worden gehecht. Voor nylon wordt het membraan voor een bepaalde tijd beschenen met sterk UV-licht, wat ervoor zorgt dat stukken van de 'ruggegraat' van het DNA bindingen aangaan met het membraan (cross-linking). Voor cellulosenitraat wordt het membraan 2-3 uur verhit tot 70-80 °C. Als het aan het membraan te hechten materiaal DNA is, wordt ook vaak over 'Southern blotting' gesproken.

Het enige verschil tussen blotting en reverse blotting is eigenlijk of je eerst het DNA op het membraan brengt en dan de probes hieraan laat hechten ter herkenning (blotting) of de probes aan het membraan hecht en daarna het DNA opbrengt (reverse blotting) (Afb. 14). Omdat het hierbij vaak gaat om ronde druppels (Engels: *dot)* materiaal op filters hebben we het hier vaak over dot blotting. Als er geld aan een test besteed wordt, zullen telers vaak iets willen weten over meerdere pathogenen. Omdat het vanwege een aantal technische complicaties makkelijker (en goedkoper) is om meer verschillende probes aan een membraan te hechten dan het is om aan een membraan gehechte DNA-moleculen te spoelen met meerdere soorten probes, is reverse blotting de meest gebruikte optie van de twee.

Bij reverse blotting worden dus de probes als eerste aan het membraan gehecht. Het DNA wordt gebiotinyleerd waarna het op het membraan wordt gebracht. Vervolgens wordt het membraan door een oplossing met een aan streptadivine gebonden enzym gehaald (vaak horseradish peroxidase of basische fosfatase). Het streptadivine-molecuul bindt aan de biotine, en de structuur biotine-streptadivine-enzym fungeert nu als moleculair label. Ten slotte gaat het membraan door een substraatvloeistof, waarin een molecuul is opgelost (bijvoorbeeld 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) dat van kleur verandert als het door het juiste enzym (horseradish peroxidase in dit geval) omgezet wordt in een ander molecuul.

Deze verkleuring kan dus alleen plaatsvinden als het gehele moleculaire complex zoals op onderstaande afbeelding te zien is, aanwezig is (en het geëxtraheerde DNA dus de specifieke sequentie bevat waarop gedetecteerd word).



Afb. 14: *Schematische weergave van detectie in een 'reversed dot blot', voor uitleg: zie bovenstaande alinea`s.*

Deze methode is kwalitatief (tot op f. sp.-niveau mits een goede sequentie bekend is) en kan voor veel verschillende organismen tegelijkertijd testen.

4.5 Vergelijking klassieke en moleculaire methoden

In vergelijking met de klassieke methoden zijn moleculaire methoden vaak sneller (isolaten hoeven niet eerst opgekweekt te worden), compacter (met enkele reagentia en andere materialen kunnen tientallen, zo niet honderden tests worden uitgevoerd) en preciezer (detectie tot op *forma specialis*-niveau mits een sequentie uniek voor die f. sp. bekend is). Door deze combinatie van eigenschappen zijn ze uiteindelijk ook goedkoper als ze eenmaal ontwikkeld zijn. De ontwikkeling van een moleculaire methode en de opbouw van een geschikte databank met referentiegenen kost tijd en materiaal en dus geld. Een groot gedeelte van de kosten hiervoor zijn voor het vinden en testen van de optimale sequentie om op te detecteren.

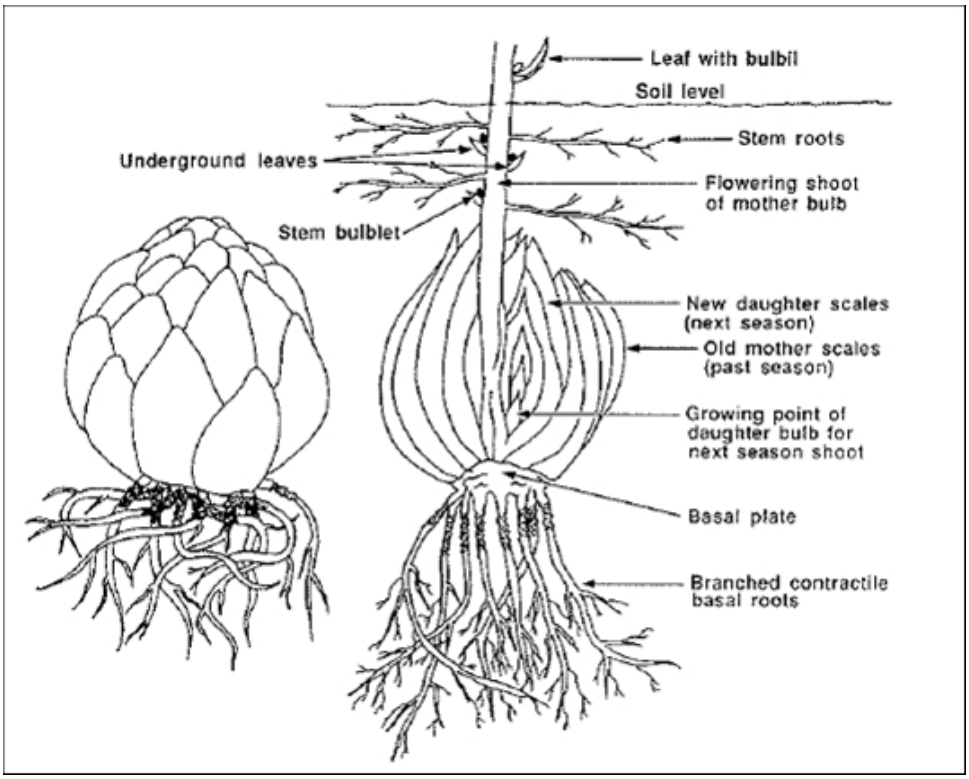
Bij een nieuw pathogeen of twijfel over een bestaand pathogeen blijft een biotoets waarin de veldsituatie benaderd wordt overigens de meest accurate manier om informatie over pathogeniciteit te verzamelen. Dit komt door het verschil in de aanwezigheid van genen en de daadwerkelijke genexpressie. De daadwerkelijke genexpressie (het 'gedrag' van het pathogeen in een praktijksituatie) is namelijk afhankelijk van de specifieke lokale omstandigheden.

5 Biotoetsen voor lelie

Moleculaire methoden tonen het potentieel van een organisme dat besloten ligt in het DNA aan, en klassieke methoden het gedrag van een organisme onder (vaak) nauw gecontroleerde omstandigheden. Het gedrag of de mogelijkheden van een organisme in het veld, waarbij veel meer factoren van invloed zijn, kan anders zijn. Grond is immers een zeer complex medium en het aantal interacties dat bodemorganismen met elkaar aangaan is zeer groot. Er zijn verschillende biotoetsen ontwikkeld om de pathogeniciteit van *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* (*Foli*) isolaten, dan wel de (genetische overerfbare) weerstand van een bepaald ras lelie te meten.

5.1 Schubtoets

Zoals de naam al aangeeft gebruikt deze biotoets 'schubben'' van de lelie (Afb. 15). Aan het eind van een teelt zijn de oude schubben leeg getrokken door de plant, deze zien er droog uit en zijn dun. Onder deze laag zitten de nieuwe schubben die tijdens de teelt gevormd zijn. Deze zijn dikker en vleziger, en bevatten hetzelfde genetische materiaal als de moederplant, wat ze zeer geschikt maakt als uitgangsmateriaal. Genetische overerfbare weerstand en vroege aantasting door *Foli* kan met deze schubben aangetoond worden zonder dat een volledige teelt nodig is.



Afb. 15: *Schematische weergave van een recent uitgelopen leliebol, afkomstig van www.cargohandbook.com (BMT Netherlands, 2021)*

Omdat verschillende lelieonderzoekers deze toets op steeds iets andere wijze uitvoerden is de opzet hier uitgewerkt aan de hand van drie verschillende onderzoeken waarbij de schubtest is toegepast (Löffler & Rumine, 1991)(Löffler et al., 1995)(Baayen et al., 1998). In het onderstaande verwijst de term 'pathogeniciteit' naar het vermogen van een isolaat om ziekte (symptomen) te veroorzaken en de term 'virulentie' verwijst naar de ernst van de aantasting.

5.1.1 Schubtoets als resistentietoets (Löffler & Rumine, 1991)

Isolaten van het pathogeen worden opgekweekt op Czapek-Dox agar (CDA). Van deze kweekplaten worden enkele pluggen gestoken en vermengd met een mengsel van steriele grond en havermout (20% w/w) in 100 mL glazen potten. Deze potten worden twee weken in het donker geïncubeerd bij 23 °C, waarna het mengsel goed wordt losgemaakt en vermengd met de te testen grond (1% w/w). Deze grond wordt in 1 L potten gedaan en nog twee weken in de kas geïncubeerd bij 20 °C. Dit leidt tot een *Fusarium*-populatie van ca. 4 x 10^4 propagulen (micro- en macroconidiën en chlamydosporen) per gram grond (Pi/g grond).

Twaalf symptoomvrije schubben per ras worden van de bolbodem van de leliebol gebroken, uitwendig gedesinfecteerd in 0,7% bleek met een druppel Tween 20 gedurende 10 minuten en daarna afgespoeld met kraanwater. De schubben worden vervolgens bij kamertemperatuur (20 °C) voor 12 uur te drogen gelegd. Hierna worden de schubben geplant in de 1 L potten met besmette grond en 11 weken verzorgd zoals bij een standaard teelt (temperatuur en dag/nachtritme niet vermeld).

Na deze periode worden de schubben opgegraven en op niveau van aantasting beoordeeld waarbij Disease Index (DI) score: (0 = geen aantasting, 4 = volledige verrot). De onderzoekers merken op dat enige verkleuring van de schubben te verwachten is vanwege chemische reacties en andere bodemorganismen. Om deze reden worden schubben met een score van 1 of 2 niet als door *Foli*-aangetaste schubben beschouwd. De schubben worden vervolgens in twee groepen verdeeld, 'licht aangetast' (DI 0, 1 en 2) en 'zwaar aangetast' (DI 3 en 4), om een binomiale verdeling van de DI te verkrijgen. Hiermee kan een binomiale regressieanalyse uitgevoerd worden om de significantie van de verschillen te bepalen.

5.1.2 Schubtoets als pathogeniciteit- en virulentietoets (Löffler et al., 1995)

Isolaten van de te testen pathogenen worden opgekweekt op Czapek-Dox agar (CDA). Van deze kweekplaten worden vijf 5mm pluggen gestoken en vermengd met een mengsel van steriele grond en havermout (20% w/w) in 100 mL glazen potten. Deze potten worden twee weken in het donker geïncubeerd bij 23 °C. Na deze periode wordt het mengsel gezeefd (maaswijdte zeef niet vermeld) en vermengd met de te testen grond (1% v/v). Van dit mengsel gaat 10 L in 20 L bakken (1 per getest *Fusarium*-isolaat), en wordt nog twee weken in de kas geïncubeerd bij 20 °C voor het verkrijgen van een stabiele schimmelpopulatie van 4 x 10^4 propagulen/g grond.

Per ras lelie worden 54 symptoomvrije schubben van de bolbodem van de leliebol gebroken en 10 min. in 1% bleek met een druppel Tween 20 uitwendig gedesinfecteerd. Hierna worden ze afgespoeld met kraanwater en 12 uur bij kamertemperatuur (20 °C) te drogen gelegd. Vervolgens worden ze in de 10 L bakken geplant in negen rijen van zes schubben en acht weken bij 18 °C verzorgd zoals bij een normale teelt (dag/nacht-ritme niet vermeld).

Na deze acht weken worden de schubben opgegraven en beoordeeld op aantasting volgens de volgende schaal: Disease Index (DI) score 0 (vrij van aantasting), 1 (lichtelijk aangetast), 2 (matig aangetast), 3 (lichtelijk rot), 4 (rot), 5 (volledig weggerot). De DI-scores worden per rij van zes schubben gemiddeld en geanalyseerd met een ANOVA op de hoofdeffecten (isolaat en lelieras) en de interactie tussen deze twee.

5.1.3 Schubtoets als pathogeniciteit- en virulentietoets (Baayen et al., 1998)

Isolaten van de te testen pathogenen worden opgekweekt in vloeibaar dextrose medium (Potato Dextrose Broth, PDB) op een schudmachine (instellingen niet vermeld) bij 22 °C voor negen dagen. Het begroeide medium wordt gefilterd door filter(kaas)doek, en met behulp van een hemocytometer verdund tot een dichtheid van 10^7 conidiën (micro, macro[1]) per mL. Van deze suspensie wordt 40 mL vermengd met 1 L grond die is verrijkt met 50 mL maltextract. Dit mengsel wordt vervolgens nog een week geïncubeerd bij 20 °C (licht of donker niet vermeld) om een stabiele schimmelpopulatie van ca. 10^4 propagulen/g grond te verkrijgen.

Per te testen isolaat x ras combinatie worden 10 symptoomvrije schubben van de bolbodem van de leliebol gebroken en uitwendig gedesinfecteerd in 1,5% bleek[2]. De schubben worden in de geïnoculeerde grond in potten geplant en acht weken verzorgd zoals bij een normale teelt (temperatuur en dag/nacht-ritme niet vermeld).

Na deze acht werken worden de schubben opgegraven en beoordeeld op aantasting waarbij Disease Index score (DI): 0 = niet aangetast, 5 = volledig verrot. Onderzoekers merken op dat enige verkleuring (DI = 1 of 2) normaal is, zeker bij het wondoppervlak waar de schaal is afgebroken. Voor de statistische analyse wordt de verdeling van de frequentie van het aantal planten in de bepaalde klassen non-parametrisch getoetst met de Wilcoxon`s signed rank analyse.

5.2 Biotoets commerciële bollen

De hierboven beschreven schubtoetsen richtten zich op het aantonen van vroege aantasting bij een bepaalde ras x isolaatcombinatie, maar kijken niet naar de volwassen, leverbare bollen. De uitwerking van de *Foli*-aantasting op het commerciële 'stadium' van de leliebol kan daarmee dus niet worden voorspeld. Straathof wijdde zijn promotieonderzoek aan het toetsen van lelie op resistentie tegen *Foli* vanuit een veredelingsperspectief. In zijn thesis (Straathof, 1994) ontwikkelt hij o.a. een biotoets die kijkt naar het effect van een gegeven *Foli*-aantasting op eerstejaars plantmateriaal. De opzet en analysemethode zijn er meer op gericht om inzicht te verkrijgen in de genetische 'verdeling' van resistentie over verschillende rassen, maar kunnen in aangepaste vorm wel bruikbaar zijn voor perceelsbeoordeling. De biotoets is hieronder beschreven in dezelfde aangepaste, versimpelde stijl als de schubtoetsen.

Een hoog-virulent isolaat van *Foli*[3] wordt opgekweekt op Czapek-Dox agar en drie weken geïncubeerd bij 23 °C in een gesteriliseerd havermout-grond mengsel (1:4 w/w). Het doorgroeide mengsel wordt met een ratio van 1:100 w/w vermengd met grond. Dit levert direct na het inoculeren een schimmelpopulatie van 150.000 ($1,5 * 10^5$) propagulen/g grond en twee weken na het inoculeren van 100.000 ($1,0 * 10^5$) propagulen/g grond. Deze grond wordt in potten gedaan (afmetingen niet vermeld).

Per te testen ras worden 4 eerstejaars leliebollen in de bakken geplant en in een kas geplaatst bij 18/14 °C met een 16h/8h dag-/nachtritme. Aantasting werd na zes of acht weken gemeten volgens de schaal: 1 = gezond, 2 = licht rot, 3 = matig rot, 4 = sterk rot, 5 = zeer sterk rot, 6 = volledig weggerot. Daarnaast werd het gewicht van de planten (bol + stengel + blad) genoteerd. Wortels werden niet meegenomen om te voorkomen dat grond werd meegenomen.

[1] Chlamydosporen komen in kweekmedia zonder grond die in het licht zijn geïncubeerd weinig voor
[2] Er wordt geen tijd of afspoelmethode vermeld, gebruikelijk is 10 min. desinfecteren gevolgd door 2 of 3 maal 2 min. dompelen in steriel water, waarbij schubben licht in beweging worden gehouden
[3] In deze biotoets worden de isolaten CPRO-Fol4 en CPRO-Fol11 gebruikt

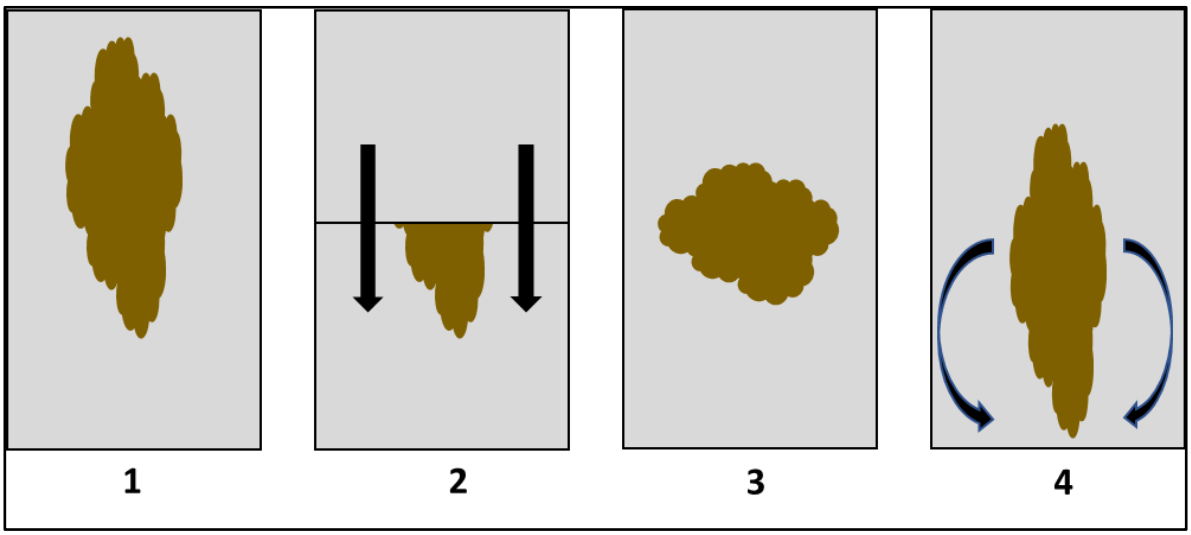
5.3 Concept biotoets voor teelt van leverbare bollen

De hierboven beschreven toetsen (§ 5.1 en 5.2) zijn respectievelijk bedoeld voor teelt vanuit schubben en teelt vanuit eerstejaars plantmateriaal, maar dan met als doel de genetische variatie van de weerstand tegen *Foli* te onderzoeken. Door deze te combineren en iets aan te passen kan ook voor de teelt van tweede- of derdejaars leliebollen een biotoets worden ontworpen.

Let wel dat de hieronder beschreven biotoets een concept is welke op het moment van dit schrijven nog niet in een praktijksituatie gevalideerd is!

5.3.1 Bemonstering en voorbereiding van de grond

Verzamel grond van het/de te testen perce(e)l(en) volgens de bemonsteringsmethode beschreven in § 2.2, met in ieder geval één bemonsteringspunt per 0,33 hectare oppervlak. Houdt rekening met minimaal 4 potten (herhalingen) van ca. 2 L inhoud per grond/rascombinatie. Bewaar de grond tussen het monsteren en het inzetten van de biotoets in een koele, droge ruimte (4-6 °C). Homogeniseer de grond door de verschillende zakken te legen op een voldoende groot stuk plastic of zeil, en dit minstens driemaal te keren, afgewisseld met omscheppen (zie onderstaande afbeelding met instructies). Als alternatief kan in een cementkuip gemengd worden, en bij grote hoeveelheden kan een betonmixer worden gebruikt.



Afb. 16: *Schematische weergave van het homogeniseren van de grond, stap 1) Plaats de grond op het zeil zodat het deels boven óf onder de helft van de lengte van het zeil ligt, stap 2) Trek het zeil om vanuit de kant waar de grond het dichtste bij het uiteinde ligt, zo ver als mogelijk naar het andere uiteinde, stap 3) De grond ligt nu ophoopt op (ongeveer) het midden van het zeil, 4) Schep de grond al omkerend zo vanuit het midden dat het in de omgekeerde positie komt te liggen van stap 1. Herhaal minimaal 3 keer, steeds in tegenovergestelde richting.*

5.3.2 Plantmateriaal en teeltomstandigheden

Idealiter worden als containers ronde potten (inhoud ca. 2 L) gebruikt vanwege de meer gelijkmatige verdeling van bewortelingsruimte en verspreiding van water. Plantmateriaal **niet** vooraf ontsmetten tenzij het onderzoeksdoel is de efficiënte van het ontsmettingsmiddel te bepalen. Per pot worden 4 eerstejaars leliebollen op (ongeveer) evenwijdige afstand van elkaar en de randen van de pot en in een kas geplaatst bij 18/14 °C met een 16h/8h dag-/nachtritme. Zorg dat de potten voldoende vochtig blijven om droogtestress bij de planten te voorkomen. De verdere verzorging hetzelfde uitvoeren als bij een standaard teelt qua bemesting en gewasbescherming. Voorbeelden hiervan kunnen worden gevonden in Bijlage 1 en Bijlage 2 voor respectievelijk bemesting en gewasbescherming.

5.3.3 Looptijd van de biotoets

Omdat in lelie ten tijde van dit schrijven geen absolute (verticale) resistentie tegen *Foli* bekend is, is de aantasting hierdoor een continue proces. Dit wil zeggen dat wanneer de looptijd lang genoeg is, alle bollen volledig worden aangetast. Uit de proeven van Straathof (Straathof, 1994) blijkt dat verschillen tussen rassen/gronden tussen de 8 en de 12 weken verdwijnen voor schubtoetsen. Over het algemeen is de aantasting door *Foli* minder ernstig in eerstejaars leliebollen en volwassen leliebollen dan in schubben.

Omdat in deze toets een gematigde, en voor ontwikkeling van *Foli* suboptimale temperatuur wordt gebruikt (het optimum voor de schimmel ligt tussen de 24 en 27 °C) ligt de ideale looptijd van de toets voor eerstejaars leliebollen waarschijnlijk ergens tussen de 12 en 22 weken. Een verhoging van de temperatuur (bijvoorbeeld tot 24 °C) zou de looptijd aanzienlijk kunnen verkorten. Hier bestaat in de wetenschappelijke literatuur echter **géén** voorbeeld van en zal uit ervaring moeten blijken.

Achterblijvende lengtegroei van de stengels en vergeling/verwelking van de bladeren van de planten kunnen wijzen op een gevorderde aantasting of aaltjesaantasting (bij voorkomen betreft het vaak *Pratylenchus penetrans*, het wortellesieaaltje). Dit soort symptomen kunnen een reden zijn om de biotoets zo snel mogelijk af te breken om verschillen tussen de gronden/rassen zo duidelijk mogelijk te houden.

5.3.4 Beoordeling van de aantasting

Het beoordelen van de aantasting door *Foli* geschiedt op twee manieren: een visuele beoordeling en een vergelijking van de gewichten van de planten. Zet hiervoor de potten in ruim water zodat de grond volledig verzadigd is en laat de grond met de planten voorzichtig uit de pot glijden. Spoel de grond met een zachte waterstroom of broeskop van de bollen/wortels af.

Beoordeel de aantasting van de leliebol (inclusief de wortels die uit de bol groeien) volgens de volgende schaal (snij wanneer nodig de bol door, in het bijzonder bij het maken van onderscheid tussen 3 en 4):

1 = gezond,
2 = licht rot (lichtbruine vlekken op of aan de randen van schubben),
3 = matig rot (verzonken ring rondom bolbodem, lichte verkurking),
4 = sterk rot (sterke verkurking tot diep in de bol, afvallende schubben),
5 = zeer sterk rot (bol is hol,
6 = volledig weggerot.

Knip of snij vervolgens de stengel direct boven de leliebol af (dus inclusief wortels die zich op het ondergrondse gedeelte van de stengels gevormd hebben). Weeg de delen leliebol (bol + uit bol groeiende wortels) en plant (stengel + uit stengel groeiende wortels + blad) apart en noteer het gewicht in grammen in één decimaal. Desgewenst kan het drooggewicht bepaald worden, alhoewel dit gegeven voor de lelieteelt in de praktijk wellicht geen/weinig betekenis heeft.

5.3.5 Indeling klassen van aantasting en statistische analyse

Enige mate van aantasting van de leliebol door bodemorganismen is te verwachten, bijvoorbeeld ten gevolge van oppervlakkige beschadiging bij opslag, vervoer of planten. Lichte verkleuringen of rot hoeven niet noodzakelijk van een *Foli*-besmetting afkomstig te zijn.

Hiervoor worden de klassen van rot heringedeeld naar klassen van aantasting:

Klasse 1 en 2 worden samengevoegd tot klasse: Niet aangetast/onduidelijke aantasting
Klasse 3 en 4 worden samengevoegd tot klasse: Matig aangetast
Klasse 5 en 6 worden samengevoegd tot klasse: Zwaar aangetast

Desgewenst kan een indeling worden gemaakt in wel of niet aangetast door respectievelijk de klassen 3 t/m 6 en klasse 1 en 2 samen te voegen:

Klasse 1 en 2 worden in dit geval samengevoegd tot klasse: Niet aangetast/onduidelijke aantasting
Klasse 3, 4, 5 en 6 worden samengevoegd tot de klasse: aangetast

Naast *Foli* kan ook de schimmel *Cylindrocarpon destructans* schub- en bolrot veroorzaken. De aantastingen kunnen naast elkaar in dezelfde partij of bol voorkomen en zijn op het oog lastig van elkaar te onderscheiden. Wel is de aantasting van de bolbodem door *C. destructans* in de regel meer oppervlakkig, terwijl *Foli* tot diep in het bolweefsel aantasting veroorzaakt.

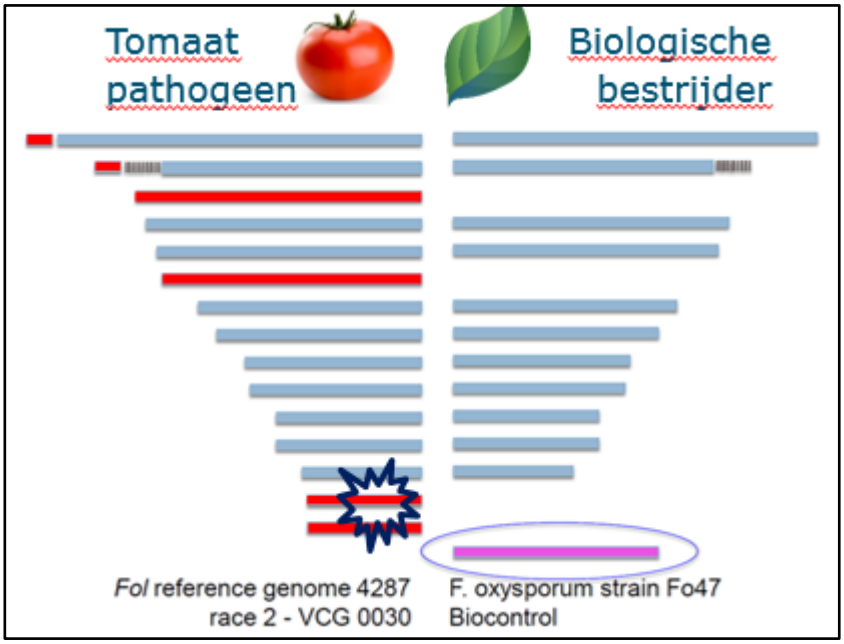
Via een Analysis of Variance (ANOVA) kunnen dan per grond/rascombinatie de verschillen in niet, matig en zwaar óf in wel of niet aangetaste bollen worden onderzocht. Ook de verschillen tussen de gewichten van boven- en ondergrondse delen zoals beschreven in de vorige paragraaf kunnen op deze manier statistisch met elkaar worden vergeleken. Op deze manier is het mogelijk om een uitspraak te doen zowel over de mate van aantasting als over de invloed ervan op de ontwikkeling van de planten en bollen middels het plantgewicht.

6 In de nabije toekomst...

6.1 SIX-virulentiegenen qPCR

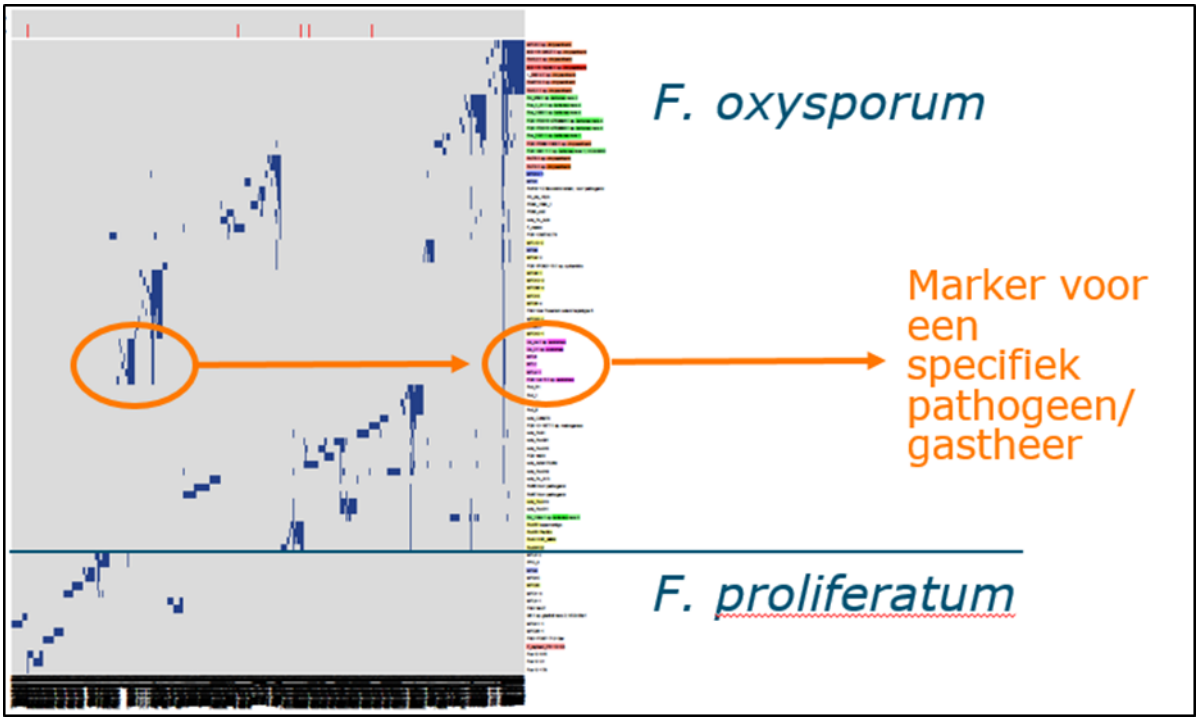
Het lastige met Fusarium blijft dat zelfs als je de soort kent, je niet zeker weet of deze stam ook pathogeen is. Bovendien is het niet ongewoon dat van een door Fusarium aangetast gewas meerdere soorten of stammen worden geïsoleerd. Wanneer identificatie tot op forma specialis niveau mogelijk is, weet je al een stuk meer, maar zoals besproken in de inleiding zegt de naamgeving van een f. sp. ook niet altijd alles. Idealiter zou je snel in het genetische materiaal (DNA) willen nagaan of de juiste genen in een isolaat aanwezig zijn die verbonden zijn aan pathogeniciteit op een gegeven gewas. Deze methode is het verst uitgewerkt voor Fusarium oxysporum stammen. Hierin zijn een aantal virulentie-genen geïdentificeerd waarvan het product in de plant wordt uitgescheiden (bijvoorbeeld de zogenaamde 'SIX -virulentie genen', SIX staat voor 'Secreted In Xylem') en die de pathogeniciteit en waardplant-specificiteit van de schimmelstam bepalen. Er zijn momenteel 14 SIX-virulentie genen bekend, maar ook andere genen kunnen betrokken zijn bij de virulentie.

Wanneer je het genoom (het totaal aan genetische informatie) van een *F. oxysporum* stam die pathogeen is op tomaat is vergelijkt met een *F. oxysporum* stam die eigenschappen heeft als biologische bestrijder van bodempathogenen (Afb. 17) vallen de volgende zaken op. Er zijn in de genomen van beide stammen overeenkomende huishoudgenen (grijs) aanwezig die bepalen tot welke soort de schimmel behoort; de extra genen (rood) bepalen de inhoud van het 'inbrekerskoffertje' en op welke planten de schimmel pathogeen is. Het extra chromosoom van de biologische bestrijder (paars) heeft mogelijk te maken met het vermogen van de schimmel om saprofytisch te overleven. Niet-pathogene f.sp. van *F. oxysporum* hebben vaak een groter saprofytisch vermogen, wat meestal neerkomt op de mogelijk tot extra enzym(type) productie voor de afbraak van complexe koolhydraten zoals cellulose (houtstof).



Afb. 17: *Genetische overeenkomsten en verschillen tussen twee F. oxysporum stammen*

Wanneer je nog dieper kijkt, zijn er zelfs stukjes gen die specifiek zijn voor een bepaalde pathogeen/gastheercombinatie. Voor het vinden van deze stukjes gen met als doel een qPCR-methode te ontwikkelen, moet je heel veel soorten en stammen met elkaar vergelijken. Je kunt dan een overzichtsvergelijking maken zoals getoond op de volgende pagina (Afb. 18).



Afb. 18: *Overzichtsvergelijking van tientallen isolaten om een gen te vinden dat specifiek is voor pathogeniciteit op een bepaald gewas*

Hoewel dit proces veel tijd kost en erg duur is (denk € 50.000,- voor een mogelijk beperkt aantal specifieke markers), biedt een qPCR gebaseerd op dit principe wel écht duidelijkheid over de stam die je hebt en voor welk(e) gewas(sen) het pathogeen kan zijn, mits de omstandigheden het toestaan. Deze methode is momenteel nog in ontwikkeling bij o.a. de Business Unit Biointeracties en Plantgezondheid in Wageningen. Het is een veelbelovende techniek die daadwerkelijk onderscheid kan maken tussen wel en niet pathogene stammen.

7 In de verre toekomst...

7.1 Volledige genoom analyse per isolaat

Door verhoging van de efficiëntie van sequentietechnieken wordt het sequensen (het bepalen van de volgorde van de basenparen in het DNA) in verhouding steeds goedkoper. Hiernaast komt steeds meer informatie beschikbaar over Biosynthetic Gene Clusters (BGC`s). Dit zijn clusters van genen die een gezamenlijke functie hebben (bijvoorbeeld de coördinatie van de synthese van een bepaald enzym) en waarvan de aan-/afwezigheid iets aangeeft over de metabolische vermogens van een organisme en die te maken kunnen hebben met de virulentie.

Het is mogelijk dat er een moment komt waarop het volledig laten sequensen en via BGC-analyse onderzoeken welke combinaties van stoffen een nieuw pathogeen isolaat kan produceren of het zoeken naar effector genen zoals de SIX-genen produceren (en dus hoe en waarop het pathogeen kan zijn) goedkoper zal worden. Zeker is dat er een steeds grotere database aan sequentiedata van verschillende pathogenen en formae speciales opgebouwd wordt ter vergelijking. Het ontwikkelen van de detectiemethode en de validatie ervan zal wel altijd het nodige werk kosten.

Maar op de lange termijn bestaat de mogelijkheid dat er nog een zeer betrouwbare moleculaire methode aan het pakket van diagnostische ‘tools’ wordt toegevoegd.

8 Conclusies en toekomstperspectief

Het samenstellen van dit overzicht dient een drieledig doel: 1) Het uiteenzetten en beschrijven van de diagnostische methoden voor *Fusarium oxysporum* f.spp., zowel klassiek als moleculair, 2) De mogelijkheden voor de voorspelling van schade door *F. oxysporum* f.sp *lilii* te beschrijven in de vorm van biotoetsen en 3) inzicht te verschaffen in de levenscyclus van pathogene *F. oxysporum* f.sp.

Hoewel voor het eerste onderdeel, de detectie en identificatie van *F. oxysporum* veel informatie beschikbaar is, is identificatie tot op *forma specialis*-niveau evenwel als kwantificatie pas in zeer recente jaren mogelijk geworden. Voor het doen van een goed gefundeerde uitspraak over de aanwezige populatie of de populatiedynamica is deze informatie echter cruciaal. Er is een veel belovende methode op basis van de virulentiegenen in ontwikkeling, maar deze worden nog niet aangeboden door commerciële laboratoria. De ontwikkelingen laten wel zien dat deze moleculaire detectiemethoden zowel in plant als in grondmonsters quantitatief inzetbaar zijn.

Er is met voor moleculaire detectie ook nog slechts beperkt gewerkt met *F. oxysporum* f.sp. *lilii*-isolaten waardoor deze methode voor de lelieteelt momenteel geen meerwaarde heeft. Daarnaast blijft het een feit dat ook een techniek die gebruik maakt van specifieke virulentiegenen het genetische potentieel voor pathogeniciteit van een isolaat aangeeft. Het uiteindelijke 'gedrag' van het isolaat in het veld is afhankelijk van de genexpressie, welke op zijn beurt weer gekoppeld is aan omgevingsfactoren.

Voor de lelieteelt in het bijzonder is het, omdat plantgoed en de teelt zelf zo kostbaar zijn, belangrijk te weten of een perceel is besmet en wat het te verwachten niveau van aantasting/schade is dat door de betreffende (samenstelling van) pathogenen van lelie wordt veroorzaakt. Een biotoets met schubben of met jaarlingen/stengeljongen kan een relatief snelle en goedkope indicatie geven en kan wellicht voor de teelt van goedkopere rassen voldoende worden geacht. Voor tweede- of derdejaars teelten en/of de teelt van rassen uit het duurdere segment geeft de biotoets zoals hier in conceptuele vorm beschreven een vollediger beeld. Deze biotoets duurt echter ook langer en is daardoor duurder, hoewel door optimalisatie van de looptijd en de gebruikte temperatuur de kosten nog zouden kunnen worden beperkt.

9 Literatuur

Baayen, R. P., Förch, M. G., Waalwijk, C., Bonants, P. J. M., Löffler, H. J. M., & Roebroeck, E. J. A. (1998). Pathogenic, genetic and molecular characterisation of Fusarium oxysporum f.sp. lilii. *European Journal of Plant Pathology*, *104*(9), 887–894. https://doi.org/10.1023/A:1008676729143

Blok, W. J., & Bollen, G. J. (1997). Host specificity and vegetative compatibility of Dutch isolates of Fusarium oxysporum f.sp. asparagi. *Canadian Journal of Botany*, *75*(3), 383–393. https://doi.org/10.1139/b97-041

Buxton, E. W & Kendrick, J. J. B. (1963). A method of isolating Pythium spp. and Fusarium oxysporum from soil. *Annals of Applied Biology*, *51*, 215–221. https://doi.org/10.1002/bjs.18005022622

Castellá, G., Bragulat, M. R., Rubiales, M. V., & Cabañes, F. J. (1997). Malachite green agar, a new selective medium for Fusarium spp. *Mycopathologia*, *137*(3), 173–178. https://doi.org/10.1023/A:1006886529511

Cerli, C., Celi, L., Kalbitz, K., Guggenberger, G., & Kaiser, K. (2012). Separation of light and heavy organic matter fractions in soil - Testing for proper density cut-off and dispersion level. *Geoderma*, *170*, 403–416. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.10.009

Davis, R. M., Colyer, P. D., Rothrock, C. S., & Kochman, J. K. (2006). Fusarium Wilt of Cotton: Population Diversity and Implications for Management. *Plant Disease*, *90*(6), 692–703.

Edel-Hermann, V., & Lecomte, C. (2019). Current status of fusarium oxysporum formae speciales and races. *Phytopathology*, *109*(4), 512–530. https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW

Fravel, D.; Olivain, C.; Alabouvette, C. (2003). Fusarium oxysporum and its biocontrol. *New Phytologist*, *157*, 493–502. https://doi.org/10.1080/15411796.2011.585906

Ghag, S. B., Shekhawat, U. K. S., & Ganapathi, T. R. (2015). Fusarium wilt of banana: biology, epidemiology and management. *International Journal of Pest Management*, *61*(3), 250–263. https://doi.org/10.1080/09670874.2015.1043972

Jiménez-Díaz, R. M., Castillo, P., Jiménez-Gasco, M. del M., Landa, B. B., & Navas-Cortés, J. A. (2015). Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Protection*, *73*, 16–27. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.023

Komada, H. (1975). Development of a selective medium for quantitative isolation of Fusarium oxysporum from natural soil. *Review of Plant Protection Research*, *8*, 114–124.

Löffler, H. J. M., & Rumine, P. (1991). Virulence and Vegetative Compatibility of Dutch and Italian isolates of Fusarium oxysporum f. sp. lilii. *Journal of Phytopathology*, *132*, 12–20.

Löffler, H. J. M., Straathof, T. P., Mouris, J. R., & Baayen, R. P. (1995). Durability of resistance in lily to basal rot: evaluation of virulence and agressiveness among isolates of Fusarium oxysporum f. sp. lilii. *European Journal of Plant Pathology*, *101*, 261–271.

Martin, J. P. (1950). *Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi* (pp. 215–232).

McMullen, M. P. & Stack, R. W. (1983). Effects of Isolation Techniques and Media on the Differential Isolation of Fusarium species. In *Phytopathology* (Vol. 73, Issue 3, p. 458). https://doi.org/10.1094/phyto-73-458

Morris, C. E., & Moury, B. (2019). Revisiting the Concept of Host Range of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *57*(1), 63–90. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100034

Nash, S. M., & Snyder, W. C. (1962). Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot Fusarium in field soils. *Phytopathology*, *52*(6).

Oyarzun, P. J. (1994). *Root Rot of Peas in the Netherlands; fungal pathogens, inoculum potential and soil receptivity* [Ponsen and Looijen BV]. http://edepot.wur.nl/206325

Parkinson, D., & Williams, S. T. (1960). A method for isolating fungi from soil microhabitats. *Plant and Soil*, *13*(4), 347–355. https://doi.org/10.1007/BF01394646

Straathof, T. P. (1994). *Studies on the Fusarium-lily interaction: a breeding approach*. Wageningen University & Research.

van Leeuwen, P., van Dam, M., Slootweg, C., & Vreeburg, P. (2018). *Ziekten en plagen bij Bloembollen* (1st ed.). Wageningen University & Research. http://beterebomen.nl/ziekten-en-plagen/

Vujanovic, V., Hamel, C., Jabaji-Hare, S., & St-Arnaud, M. (2002). Development of a selective myclobutanil agar (MBA) medium for the isolation of Fusarium species from asparagus fields. *Canadian Journal of Microbiology*, *48*(9), 841–847. https://doi.org/10.1139/w02-082

Warcup, J. H. (1955). Isolation of Fungi from Hyphae present in Soil. *Nature*, *175*, 953–954. https://doi.org/10.2307/3221963

Bijlage 1 Voorbeeldschema bemesting lelie

Meststof	Hoeveelheid (kg/ha)	Toepassingsmoment
Physiomax of DCM Zeewierkalk	300	Over bedjes voor planten
DCM Zeewierkalk	300	Ongeveer 4-6 weken later
Sulfammo 26%	150	Direct na planten
Sulfammo 26%	200	Direct direct na koppen
Kaliumsulfaat 50%		
Kaliumsulfaat 50%	200	Half augustus
Kaliumsulfaat 50%	200	Half september

Bijlage 2 Voorbeeldschema gewasbescherming lelie na opkomst

Toepassingsmoment		Hoeveelheid (L of kg/ha)	Middel	Hoeveelheid (L of kg/ha)	Middel	Hoeveelheid (L of kg/ha)	Middel	Hoeveelheid (L of kg/ha)	Middel	Hoeveelheid (L of kg/ha)	Middel	Hoeveelheid (L of kg/ha)	Middel	Hoeveelheid (L of kg/ha)	Middel	Hoeveelheid (L of kg/ha)	Middel	Hoeveelheid (L of kg/ha)	Middel
Maandag	5-4-2021		Planten																
Maandag	12-4-2021	4	ltr Stomp +	2	ltr Fresco +	2 ltr	Wing-P+	0,4	ltr Concrete										
Vrijdag	30-4-2021	5	ltr Olie Kompaan +			0,3	ltr Sumicidin Super +	0,4	kg Goltix WG +	1	ltr Asulam								
Woensdag	5-5-2021			5	ltr Olie H +	0,3	Ltr Sumi Alpha 2,5 EC +	0,7	ltr Goltix Queen +										
Maandag	10-5-2021	5	ltr Olie Kompaan +			0,3	ltr Sumicidin Super +	0,4	ltr Goltix SC +			1	kg Solofol						
Zaterdag	15-5-2021			5	ltr Olie H +	0,3	Ltr Sumi Alpha 2,5 EC +	0,4	ltr Bettix SC +				1,5	kg Tridex DG +	0		ltr Fireblocker		
Donderdag	20-5-2021	5	ltr Olie Kompaan +			0,3	ltr Sumicidin Super +	0,4	kg Goltix WG +	1	ltr Asulam +	1	kg Solofol					0,14	kg Tepekki
Dindag	25-5-2021			5	ltr Olie H +	0,3	Ltr Sumi Alpha 2,5 EC +	0,7	ltr Goltix Queen +			1,5	kg Milcozeb DG +		0,3		Ltr Luna Sensation		
Maandag	31-5-2021	6,25	ltr Olie Kompaan +			0,4	ltr Sumicidin Super +	0,5	ltr Goltix SC +			2	kg Penncozeb DG +						
Maandag	7-6-2021			6,25	ltr Olie H +	0,4	Ltr Sumi Alpha 2,5 EC +	0,5	ltr Bettix SC +			2	kg Dithane DG +					0,23	kg Gazelle
Maandag	14-6-2021	6,25	ltr Olie Kompaan +			0,4	ltr Sumicidin Super +	0,5	kg Goltix WG +	1	ltr Asulam +	2	kg Tridex DG +	0			ltr Fireblocker		
Maandag	21-6-2021			6,25	ltr Olie H +	0,4	Ltr Sumi Alpha 2,5 EC +	1	ltr Goltix Queen +			2	kg Milcozeb DG +						
Maandag	28-6-2021	6,25	ltr Olie Kompaan +			0,4	ltr Sumicidin Super +	0,5	ltr Goltix SC +			2	kg Penncozeb DG +						kg Antilop
Maandag	5-7-2021			6,25	ltr Olie H +	0,4	Ltr Sumi Alpha 2,5 EC +	0,5	ltr Bettix SC +			2	kg Dithane DG +		0,3		Ltr Luna Sensation		
Maandag	12-7-2021	6,25	ltr Olie Kompaan +			0,4	ltr Sumicidin Super +	0,5	kg Goltix WG +			2	kg Tridex DG +						
Maandag	19-7-2021			6,25	ltr Olie H +	0,4	Ltr Sumi Alpha 2,5 EC +	1	ltr Goltix Queen +			2	kg Milcozeb DG +					0,14	kg Tepekki
Maandag	26-7-2021	6,25	ltr Olie Kompaan +			0,4	ltr Sumicidin Super +	0,5	ltr Goltix SC +			2	kg Penncozeb DG +			1,5	ltr Spirit		
Maandag	2-8-2021			6,25	ltr Olie H +	0,4	Ltr Sumi Alpha 2,5 EC +	0,5	ltr Bettix SC +			2	kg Dithane DG +			0,6	ltr Luna Experience		
Maandag	9-8-2021	6,25	ltr Olie Kompaan +			0,4	ltr Sumicidin Super +	0,5	kg Goltix WG +			2	kg Tridex DG +			1,5	ltr Phantom	0,23	kg Gazelle
Maandag	16-8-2021			6,25	ltr Olie H +	0,4	Ltr Sumi Alpha 2,5 EC +	1	ltr Goltix Queen +			2	kg Milcozeb DG +						
Maandag	23-8-2021	6,25	ltr Olie Kompaan +			0,4	ltr Sumicidin Super +	0,5	ltr Goltix SC +			2	kg Penncozeb DG +	0			ltr Fireblocker		
Maandag	30-8-2021			6,25	ltr Olie H +	0,4	Ltr Sumi Alpha 2,5 EC +	0,5	ltr Bettix SC +									0,5	Sivanto Prime
Maandag	6-9-2021	6,25	ltr Olie Kompaan +			0,4	ltr Sumicidin Super +												
Maandag	13-9-2021			6,25	ltr Olie H +	0,4	Ltr Sumi Alpha 2,5 EC +												
Maandag	20-9-2021	6,25	ltr Olie Kompaan +			0,4	ltr Sumicidin Super +											0,75	ltr Batavia
Maandag	27-9-2021			6,25	ltr Olie H +	0,4	Ltr Sumi Alpha 2,5 EC +												
Maandag	4-10-2021	6,25	ltr Olie Kompaan +			0,4	ltr Sumicidin Super +												
Maandag	11-10-2021			6,25	ltr Olie H +	0,4	Ltr Sumi Alpha 2,5 EC +											0,14	kg Tepekki
Maandag	18-10-2021	6,25	ltr Olie Kompaan +			0,4	ltr Sumicidin Super +												
Maandag	25-10-2021			6,25	ltr Olie H +	0,4	Ltr Sumi Alpha 2,5 EC +												
Maandag	1-11-2021	6,25	ltr Olie Kompaan +			0,4	ltr Sumicidin Super +											0,23	kg Antilop

Bijlage 3 Snelkeuzetabel diagnostische technieken

	Kwalitatief / kwantitatief	**Niveau van specificatie:**	**Specificatie pathogeniciteit:**
Uitplaten plantendelen	Kwalitatief	Soortniveau (bij correct identificeren a.d.h.v. morfologische kenmerken)	Alleen bij aansluitende biotoets doelgewas
Uitplaten grond	Kwalitatief Semi-kwantitatief	Soortniveau (bij correct identificeren a.d.h.v. morfologische kenmerken)	Alleen bij aansluitende biotoets doelgewas
Uitplaten organische stof	Kwalitatief Semi-kwantitatief	Soortniveau (bij correct identificeren a.d.h.v. morfologische kenmerken)	Alleen bij aansluitende biotoets doelgewas
Uitplaten verdunnings-reeks grond	Kwalitatief Kwantitatief	Soortniveau (bij correct identificeren a.d.h.v. morfologische kenmerken)	Alleen bij aansluitende biotoets doelgewas
qPCR (standaard)	Kwalitatief Kwantitatief	*Formae speciales* niveau wanneer een voldoende specifieke primer bekend is	Alleen bij aansluitende biotoets doelgewas
Reverse Dot Blotting	Kwalitatief	*Formae speciales* niveau wanneer een voldoende specifieke primer bekend is	Alleen bij aansluitende biotoets doelgewas
qPCR (SIX-genen)	Kwalitatief Kwantitatief	*Formae speciales* niveau wanneer een voldoende specifieke primer bekend is	Pathogeniciteit gespecificeerd via SIX-virulentie genen voor meerdere gewassen

To explore the potential of nature to improve the quality of life

Wageningen University & Research
Open Teelten
Edelhertweg 1
Postbus 430
8200 AK Lelystad
T (+31)320 29 11 11

www.wur.nl/openteelten
Rapport WPR-884

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen 9 gespecialiseerde onderzoeksinstituten van stichting DLO en Wageningen University hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.500 medewerkers en 12.500 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.