



Fusarium in uien

Jaarverslag onderzoek 2020



rapport / publicatie

2021-04

Jaarverslag 2020
Uireka 2.0 - Werkgroep *Fusarium*



Uireka 2.0 is een uniek driejarig ketenproject met als doel het verbeteren van de kwaliteit en daarmee het versterken van de exportpositie van de Hollandse ui. Om dit te realiseren hebben ketenpartners de krachten gebundeld. Het project valt onder de Holland Onion Association wordt mede ondersteund door de Topsector Agrifood.

Uireka draait om innovatie en verbetering van de teelt en bewaring. Het project levert een pakket aan maatregelen op die ketenpartners in staat stellen om de kwaliteit nog beter te borgen.

De gezamenlijke organisaties hebben deze publicatie met de meeste zorg samengesteld. Zij zijn niet aansprakelijk voor schade die ontstaat door het uitvoeren van informatie uit deze publicatie.

Jaarverslag 2020

Uireka Werkgroep *Fusarium*

Uitgevoerd door: Anne D. van Diepeningen

Uireka rapportnummer: 2021-04

Datum: januari 2021

Inhoudsopgave

1	Inleiding en doel	7
2	Materiaal en methodes	8
2.1	Analyse pathogeniteit uien isolaten	8
2.2	Whole genome sequensen pathogenen en niet-pathogenen	8
2.3	Bioinformatica	8
2.4	Ontwikkeling diagnostische toets	9
2.5	Verzamelen praktijkmonsters	9
2.6	Overleving in vergister	10
3	Resultaten	11
3.1	Analyse pathogeniteit uien isolaten	11
3.2	Bioinformatica	12
3.3	Ontwikkeling diagnostische toets	14
3.4	Verzamelen en analyse praktijkmonsters	15
3.5	Overleving in vergister en tijdens compostering	16
3.6	Microbioom analyses	18
4	Discussie en interpretatie	20
5	Conclusies en aanbevelingen	21
6	Referenties	22
	Bijlage 1 - Monsterformulier	23

Samenvatting

Binnen het Uireka werkpakket *Fusarium* zijn in 2020 de volgende stappen gezet:

- Met een biotoets op uienbollen zijn isolaten van *Fusarium oxysporum*, *F. solani* en *F. proliferatum* getest op pathogeniteit: *F. oxysporum* forma *specialis cepae* is het sterkste pathogeen. Ook niet pathogene *F. oxysporum* komen voor
- Vergelijkingen van de genomen van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* en niet ui-pathogenen laat zien welke gen- en allelsequenties in het DNA uniek verantwoordelijk zijn voor de pathogeniteit van een schimmel isolaat.
- Op de specifieke sequenties zijn Taqman primers en probes ontwikkeld om een diagnostische toets te ontwikkelen waarmee het risico op fusarium rot gekwantificeerd kan worden.
- Een eerste test van de diagnostische toets op in 2020 geoogste uien met symptomen van fusarium rot laat zien dat 92% besmet is met *F. oxysporum* f.sp. *cepae*. De test wordt verder ontwikkeld.
- Tijdens vergisting gaat in de eerste 3 weken circa 99.99% van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* dood, maar bij zware besmetting is er dan nog steeds levend materiaal van het pathogeen aanwezig. De toets op overleving tijdens compostering is door Corona verschoven naar 2021.
- De microbiomen (bacteriën en schimmels) van in najaar 2020 verzamelde gronden van uienvelden zijn gesequencet en zullen in 2021 geanalyseerd worden.

1 Inleiding en doel

Verschillende Fusariumsoorten kunnen ‘Fusarium rot’ en verwelking veroorzaken in uienbollen en in uienplanten. De ziekte begint met het aantasten van de wortels van uienplanten. Langs die wortels groeit de schimmel naar de basale plaat van de plant. Vandaaruit kan de schimmel verder de plant (of bol) ingroeien. De aantasting van de wortels leidt ertoe dat minder water en voedingsstoffen getransporteerd kunnen worden naar de bladeren. Symptomen zijn dan onder andere het verwelken, vergelen en uiteindelijk afsterven van bladeren tijdens de ontwikkeling van de plant. In de uienbol zelf verspreidt de rot zich vanaf de basale plaat in de richting van de stengel/knop en de vlezige bolrokken. Aangetaste wortels verkleuren donker roze tot donkerbruin en soms is een wit myceliumpluis zichtbaar bij de bolstoel. Fusarium kan zowel tot problemen leiden in het veld als tijdens de opslag van uien.

Verschillende soorten Fusarium, waaronder *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, *F. solani* en *F. proliferatum* zijn volgens wetenschappelijke literatuur geassocieerd met de rot- en verwelkingsverschijnselen in ui (o.a. Haapalainen *et al.*, 2016; Kalman *et al.*, 2020; Klokočar-Šmit *et al.*, 2008). Binnen de PPS Uireka (1) zijn in 2017 en 2018 vanuit ziek plant materiaal van 186 bedrijven vanuit het Zuidwestelijk kleigebied en de IJsselmeerpolders 329 Fusarium isolaten verzameld en geïsoleerd met gebruik van Fusarium selectief medium (Scholten en Burger, 2020). *Fusarium oxysporum* werd in Nederland het meest aangetroffen in deze monsters en circa de helft daarvan bleek bepaalde SIX-genen (*secreted in xyleme*) te bevatten, wat een aanwijzing is voor pathogeniteit op ui (Taylor *et al.* 2016). Daarnaast werden isolaten van *F. solani* gevonden (vooral in het warme jaar 2018), *F. proliferatum*, *F. redolens*, *F. acuminatum* en *F. commune* (Scholten en Burger, 2020).

Binnen de PPS Uireka 2.0 is een apart werkpakket opgezet, dat zich concentreert op het beter beheersbaar krijgen van Fusarium in de teelt en opslag van uien. Volgens planning werden in 2020 de volgende onderwerpen aangepakt:

1. Analyse pathogeniteit uien isolaten verzameld tijdens Uireka (1).
2. *Whole Genome Sequencing* van pathogene en niet-pathogene isolaten
3. Bioinformatica: vergelijking pathogene en niet-pathogene Fusarium isolaten voor het identificeren van genetische markers die gebruikt kunnen worden bij het identificeren van pathogene isolaten.
4. Ontwikkeling diagnostische toets: specifiek voor ui-pathogenen
5. Verzamelen van praktijkmonsters uien en uiengrond voor het testen en voor de validatie diagnostische tests
6. Herhaling van experimenten voor afdoding van Fusarium in reststromen door vergisting of compostering.

2 Materiaal en methodes

2.1 Analyse pathogeniteit uien isolaten

De pathogeniteitstest op uienbollen is uitgevoerd zoals beschreven door Taylor et al. (2016): Van hele, onbespoten uien (van een ras dat geen fusarium tolerantie heeft) zijn de buitenste vellen afgepeld zodat er slechts een bruine rok overbleef als buitenste schil. Van de onderkant is een dunne laag afgesneden die eventuele wortelresten verwijderde. Het snijvlak is ontsmet met 70% alcohol. Inoculaties van de bollen vond plaats door een stukje voedingsmedium met daarop de groeiende schimmel (of ter controle zonder schimmel) aan te brengen op het ontsmette snijvlak. De bollen werden na twee dagen afgedekt met cellofaan en in vochtige bakken gehouden bij 20°C tot het moment van beoordeling. Voor elke getest isolaat zijn 10 bollen gebruikt.

Een virulent Engels isolaat, ter beschikking gesteld door Dr John Clarkson van Warwick University in de UK, is gebruikt als positieve controle. Wekelijks zijn de controle bollen met het Engelse controle isolaat beoordeeld op hun aantasting. Na 7 weken was de aantasting tussen 80-100% van het oppervlak van overlans doorsneden bollen van de positieve controle. Vervolgens zijn alle bollen beoordeeld. Het percentage oppervlak van de aantasting van de bol is met ImageJ software bepaald. Bij niet pathogene isolaten en in de negatieve controle zat de aantasting in de orde van 0-20% van het oppervlak, bij pathogene isolaten lag de aantasting tussen circa 60-85%.

2.2 Whole genome sequensen pathogenen en niet-pathogenen

Een selectie van isolaten uit de Uireka veld-isolaten van 2017 en 2018 is gebruikt voor *whole genome* sequensing. Pathogeniteit of niet-pathogeniteit is hierbij gebaseerd op de biotoets zoals beschreven in paragraaf 2.1. Uit de isolaten is het DNA geïsoleerd na een behandeling met een *bead beat* methode gekoeld met koudijs om het DNA beter te isoleren. Na een kwaliteitscontrole zijn er bibliotheken gemaakt van elke stam die daarna gesequenced zijn op een MiSeq platform bij GenomeScan B.V. (Leiden, NL). Per isolaat zijn er circa 10-17 Miljoen *reads* gegenereerd, wat betekent dat van elk stukje van het genoom de basevolgorde van het DNA ongeveer 50-100x bepaald is.

2.3 Bioinformatica

Voor iedere stam is uit alle sequentie data het genoom in elkaar gepuzzeld voor zover mogelijk (*assembly*) en zijn de genen erop geïdentificeerd (*annotation*). Naast de binnen Uireka 2.0 gesequencede uien-pathogene en niet-pathogene isolaten uit ui zijn er ter vergelijking pathogene en niet-pathogene stammen van andere waardplanten toegevoegd uit eerdere projecten en uit publieke databanken zodat uiteindelijk zo'n 900 isolaten van *F. oxysporum*, *F. proliferatum* en *F. solani* met elkaar vergeleken konden worden. Alle varianten van alle genen zijn vervolgens met elkaar vergeleken en de genen of varianten van genen die uniek zijn voor pathogenen op ui zijn geïdentificeerd.

2.4 Ontwikkeling diagnostische toets


Om pathogene en niet pathogene *Fusarium* soorten van elkaar te kunnen onderscheiden zijn diagnostische toetsen nodig. Deze toets wordt bij voorkeur gebaseerd op eigenschappen betrokken bij de pathogeniteit en dan vooral eigenschappen die uniek zijn voor de pathogenen op ui. De toetsen ontwikkelen we voor de Taqman-methode: een methode die gevoelig is, kwantitatief kan meten en die door de meeste (test)laboratoria uitgevoerd kan worden.

Een 7-tal genen/varianten van genen (ook wel allelen genoemd) bleek uniek voor het pathogeen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, het belangrijkste *Fusarium* pathogeen op ui in Nederland. Van deze genen, en genen met enige sequentiegelijkenis uit niet-ui pathogenen zijn vervolgens de sequenties vergeleken. Een zestal Taqman primers en probes, die specifiek zouden moeten zijn voor ui, zijn vervolgens ontworpen met de IDT Oligo Analyser software (IDT, Coralville IO, USA).

De verschillende primer/probe combinaties zijn vervolgens getest op specificiteit (zowel inclusiviteit: wel detectie van alle individuen in een set ui-pathogenen; exclusiviteit: geen signaal bij niet-pathogenen). Op grond van de lage hoeveelheid achtergrondsignaal wordt een tweetal sets nu verder bestudeerd voor hun sensitiviteit (welke hoeveelheden DNA (lees *Fusarium*) ze detecteren), herhaalbaarheid (overeenkomstige resultaten van replica's), reproduceerbaarheid (zelfde resultaten op verschillende apparatuur en uitvoerenden) en selectiviteit (testresultaten in verschillende matrices zoals in plant materiaal of in grond).

2.5 Verzamelen praktijkmonsters

Door de partners zijn in najaar 2020 op 32 door de partners gekozen locaties monsters verzameld. Per locatie werden tussen de 1 en 10 grondmonsters en/of één of meerdere aangetaste uien verzameld. Deze monsters waren afkomstig van 31 gangbare en 1 biologisch bedrijf. Daarvan waren 31 monsters afkomstig van velden met ui als staand of geogst gewas. Er was 1 veld waarop al 15 jaar geen uien meer geteeld waren in verband met eerdere problemen en waar afgelopen teeltseizoen tulpen hadden gestaan. Van de monsterpunten zijn metadata verzameld met behulp van het monsterformulier weergegeven in Figuur 1.

MONSTER	Monstercode ¹	Type monster ² <input type="checkbox"/> Plantmateriaal <input type="checkbox"/> Blad/bool/wortel <input type="checkbox"/> Grondmonster-enkel <input type="checkbox"/> Grondmonster-gemengd <input type="checkbox"/> Anders:	Opslag ³ <input type="checkbox"/> 4 à 5°C /100-200g (analyse levend materiaal) <input type="checkbox"/> -18 à -20°C /10-20g (DNA analyse)		Resultaten worden vertrouwelijk behandeld. Contactpersoon: Anne van Diepeningen, BU Biointeracties en plant gezondheid (Mo.Ce.031) Bornsesteeg 48A,6708 PE Wageningen. anne.vandiepeningen@wur.nl tel: 06-14614413.
	<input type="checkbox"/> Serie: ⁴ monster maakt deel uit van een serie	Datum Dag/maand/jaar	Locatie GPS coördinaten of adres ⁵		
TEELT	Huidig gewas/cultivar: Partijnummer:	Plantui/ Zaaiui/ Sjaai/ Anders	Zaaidatum: Biologisch/Gangbaar	Grondontsmetting, jaar Biologische GO: Inundatie:	Verklaringen codes: 1. Monstercode: 3 letters voor het bedrijf en een volgnummer voor het monster. Bijvoorbeeld DIE001 voor het eerste monster van van Diepeningen. 2. Type monster: (Deel van een) plant, grondmonster van een enkele steek, mengmonster van circa 10 verschillende stekken representatief voor een veld of anders bijvoorbeeld compost, reststroom of ander. Steken van een grondmonster: Steek een grondmonster met behulp van een grondboor, gutsboor of schopje op een standaard monsterdiepte van 0-20 cm. Als van een andere diepte wordt bemonsterd, dan de diepte vermelden. Voor een mengbemonstering van een veld, 30-40 stekken verspreid over het perceel nemen en de verkregen grond mengen in een emmer en kleiner deelmonster nemen. Monster verpakken en labelen met monstercode en datum en opslaan bij 4-5°C voor uitgroei van levende schimmels of -18 a -20°C voor DNA analyse. Monsterformulier invullen. Andere monsters: Monster verpakken en labelen met monstercode en datum en opslaan bij 4-5°C voor uitgroei van levende schimmels of -18 a -20°C voor DNA analyse. Monsterformulier invullen. 3. De opslagmethode bepaalt de type analyse(s) die mogelijk zijn: Voor analyse van schimmel op grond van DNA worden kleine hoeveelheden materiaal geanalyseerd: 10-20g opslag bij -18 à -20°C is voldoende en een monster kan meer dan een jaar worden opgeslagen. Voor analyse van levend materiaal worden monsters bij 4 à 5°C bewaard, deze monsters kunnen tot circa een jaar bewaard blijven waarbij er weinig groei of afsterven van Fusarium plaats vindt. Bij lagere temperaturen sterft een deel van de sporen af. 4. Noteer of monster deel uit maakt/gaat maken van een serie. Bijvoorbeeld meerdere monsters van een perceel op dezelfde dag of over jaar of jaren. 5. Locatie: geef bij voorkeur de GPS coördinaten van het monsterpunt of anders het adres. Bijvoorbeeld B 51.987431 x L 5.665395 voor Droevendaalsesteeg Wageningen. Coördinaten kunnen bijvoorbeeld worden bepaald met een GPS toestel of via de Google maps app: Open de Google Maps-app, tik op de kaart op een gebied dat geen label heeft en houd dit vast. Er wordt een rode speld geplaatst. U ziet de coördinaten in het zoekvak bovenaan. 6. Grondbewerking: doorhalen wat niet van toepassing is, eventueel aanvullen 7. Vragen over de opslag indien van toepassing op het monster. 8. Huidige en eerdere problemen: omschrijf huidige en eerdere problemen van de locatie, bij voorkeur als percentage.
	Rotatieschema Gewas(sen)/jaar:	Bemesting/ Groenbemester(s):	Grondbewerking: ⁶ Ploegen/eggen/rotorkoep /anders... Ploegdiepte: Niet/wel kerend Graag periode voor/najaar aangeven	Gewasbestrijding Bovengronds: Ondergronds: Pootgoed-/Gewas- voorbehandeling:	
BODIEM	Bodemtype: Grondanalyse/bodemvruchtbaarheidsanalyse -kopie bijsluiten waar mogelijk				
	Redox potentiaal (mV):	pH:	Organisch materiaal (%):	Stikstof (Nitraat/Ammonium):	
	Fe (mg/kg):	Ca (kg/ha):	K (mg/kg):	Na (mg/kg):	
	Mn (mg/kg):	Zn (µg/kg):	P (mg/kg):	Lutumgehalte:	
S (mg/kg):	Si (µg/kg):	B (µg/kg):	Verslemping:		
OPSLAG ⁷	Rooi datum: Inschuurdatum:	Geplande datum einde opslag: Opslag: Los/kisten/anders:	Opslag temperatuur: Opslag luchtvochtigheid:	Kiemremingsmiddelen: <input type="checkbox"/> MH <input type="checkbox"/> 1,4 sight <input type="checkbox"/> Biox-M <input type="checkbox"/> Neostain <input type="checkbox"/> Anders:	
	Huidige problemen ⁸ % Fusarium besmette planten op het veld % Fusarium besmette uien in opslag Eerdere problemen ⁸ % Fusarium besmette planten op het veld % Fusarium besmette uien in opslag Andere ziektes? Zo ja, welke en percentage aantasting				
EXTRA	Aanvullende informatie:				

Figuur 1. Monsterformulier 2020 (zie bijlage 1)

Uit het plantmateriaal is het totaal DNA geïsoleerd van plant, pathogeen en andere aanwezige organismen. Hiervoor werden twee extractiemethoden gebruikt. De Qiagen Gentra PureGene kit (Qiagen) en een ultra simpele en extractieprocedure op basis van onder andere Chelex (Prime Diagnostics, nog niet gepubliceerd) zijn gebruikt voor de DNA extractie vanuit weefsel uit de bol. Uit 10 g grond is DNA geïsoleerd met behulp van de DNeasy PowerSoil Prokit (Qiagen, Venlo, Nederland). Vanuit de grond is ook een 3-dagen verrijkingstap uitgevoerd met vloeibaar Fusarium selectief medium op basis van Komada medium (Komada, 1976), waarna DNA is geïsoleerd met de DNAeasy PowerSoil kit en/of de op Chelex gebaseerde eigen extractieprocedure.

2.6 Overleving in vergister

Voor de overlevingsexperimenten in een vergister is *F. oxysporum* f.sp. *cepae* stam Ui60.1.3 gekozen omdat dit een recent Nederlands isolaat is met grote pathogeniteit. Van deze stam zijn grote hoeveelheden sporen opgekweekt in vloeibaar Aardappel- Dextrose-medium (PDB). Het experiment is uitgevoerd in een vergister van ongeveer een kuub groot onder mesofiele omstandigheden (38°C). De overleving werd op twee manieren getest: (1) door directe toevoeging van sporen (3×10^5 sporen/ml) in het digestaat in de vergister en (2) door toevoegingen van hele uien met daarin een startconcentratie van circa 3×10^4 sporen/gram ui (waarin de schimmelsporen dus beschermd zijn door de verder nog intacte ui. De overleving werd bepaald door uitplaten op Komada medium (Komada, 1976) en tellen van de hoeveelheden kolonievormende eenheden na 0, 1, 3, 7, 14, 20, 35 en 56 dagen, bij 25°C in het donker.

3 Resultaten

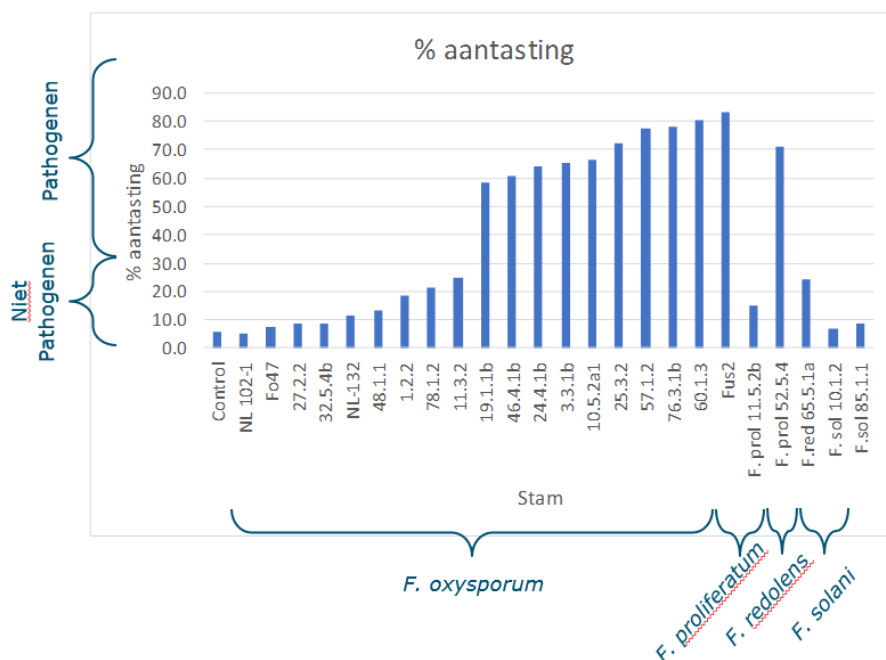
3.1 Analyse pathogeniteit uien isolaten

In de periode 2017-2018 zijn ruim honderd *Fusarium* isolaten verzameld afkomstig van uien met symptomen van Fusarium rot. Met PCR testen zijn deze gescreend op de aanwezigheid van een aantal genen die door Taylor *et al* (2016) aangemerkt zijn als belangrijk voor de pathogeniteit op ui. Vijfentwintig isolaten met verschillende sets van virulentie-genen of zonder de bekende genen zijn getest met een biotoets op hele uienbollen (Figuur 2). De mate van aantasting van de uienbollen blijkt een goede maat te zijn om pathogeniteit te kunnen meten en laat zien dat er op de ui zowel pathogene als niet-pathogene isolaten voorkomen.



Figuur 2: Biotoets op uienbollen. Na 7 weken incubatie heeft het linker-isolaat (Uireka isolaat 11.3.2) de ui nauwelijks aangetast, terwijl het virulente isolaat Fus 2 (Engelse controle isolaat) rechts de ui voor circa 90% heeft aangetast.

De mate van de aantasting van elke ui in de biotoets is gekwantificeerd met behulp van de ImageJ software (paragraaf 2.1). Vergelijkbaar aan de resultaten van de Engelse studie door Taylor en collega's (Taylor *et al.* 2016) tasten virulente isolaten in 7-9 weken circa 60-90% van het weefsel aan (Figuur 3). Bij niet-pathogene isolaten ligt de achtergrond aantasting tussen de 5 en 25%. De eerder in Engelse *F. oxysporum* f.sp. *cepae* geïdentificeerde virulentiegenen (SIX-genen) (Taylor *et al.* 2016) blijken in de Nederlandse isolaten niet altijd aan te tonen met de primers van Taylor *et al.*, wat dankzij het whole genome sequence werk blijkt te komen deels omdat sommige genen niet altijd aanwezig zijn en door variaties in de sequenties waardoor de genen niet altijd gedetecteerd kunnen worden.

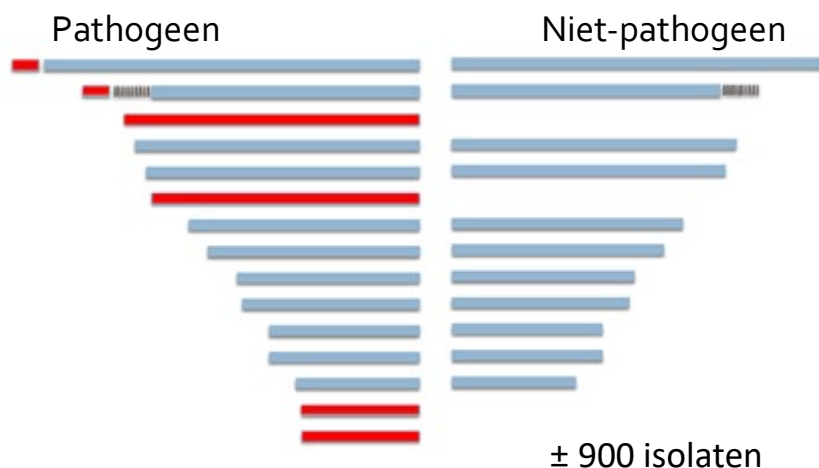


Figuur 3. *Fusarium* biotoets op ui: Gemeten aantasting van uienbollen in de biotoets is een maat voor pathogeniteit van de isolaten.

3.2 Bioinformatica

De bioinformatica vergelijkingen tussen de genomen van pathogenen en niet-pathogene stammen laat zien welke genen of vormen van genen (allelen) specifiek betrokken zijn bij de pathogeniteit op een bepaalde waardplant. In totaal zijn meer dan 900 genomen met elkaar vergeleken (Figuur 4). Uit de analyses komt naar voren dat er een grote groep genen is die met kleine variaties erin in alle *Fusarium oxysporum* stammen voorkomen. Dit zijn de zogenaamde huishoud-genen die de schimmel nodig heeft voor zijn basis metabolisme als schimmel.

Daarnaast is er een groep genen die vóórkomen in verschillende groepen *Fusarium oxysporum*. Een deel daarvan zijn algemene virulentiegenen die in meerdere groepen pathogenen voorkomen.



Figuur 4. Schematische vergelijking tussen het genoom van een pathogene stam en een niet pathogene stam. Voor de analyse voor ui-specifieke virulentiegenen zijn in totaal meer dan 900 genomen vergeleken. Rood = variabel deel van het genoom, betrokken bij virulentie, blauw = basis genoom met genen aanwezig in alle *F. oxysporum* stammen.

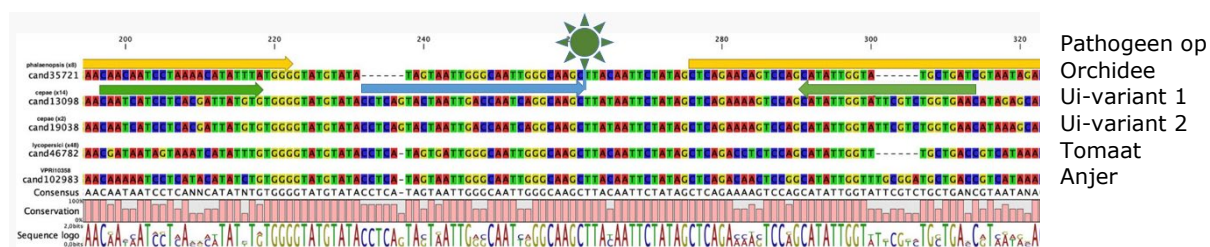
Er is een groep van zeven genen die specifiek zijn voor de isolaten die pathogeen zijn op ui en die een rol kunnen spelen in de infectie van de ui (Tabel 1). Deze genen komen voor in alle Nederlandse isolaten, maar ook in isolaten uit Engeland en andere delen van de wereld die meegenomen zijn in de analyse. Drie van deze genen hebben een onbekende functie in de interactie van pathogeen met de plant. Drie andere van die groep van zeven behoren tot de SIX genen-klasse. Dit zijn kleine moleculen die uitgescheiden worden in de plant. Een van die genen komt in twee vormen voor in Nederland waarbij het gen licht verschilt in nucleotidevolgorde, zonder dat dit voor de pathogeniteit een verschil uit lijkt te maken. Het zevende gen is een effector gen van de *LysM* effector familie, wat waarschijnlijk ook codeert voor een tijdens de infectie in de plant uitgescheiden eiwit.

Tabel 1. Genen of vormen van genen (allelen) specifiek betrokken bij de pathogeniteit op ui.

<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i>	
Gen-code in analyse	Functie
Cand13067	<i>Six3</i>
Cand13073	Onbekende functie
Cand13098/19038	<i>Six5</i>
Cand13102	<i>Six14</i>
Cand13103	Onbekende functie
Cand13111	Onbekende functie
Cand40478	<i>lysM</i> effector gen

3.3 Ontwikkeling diagnostische toets

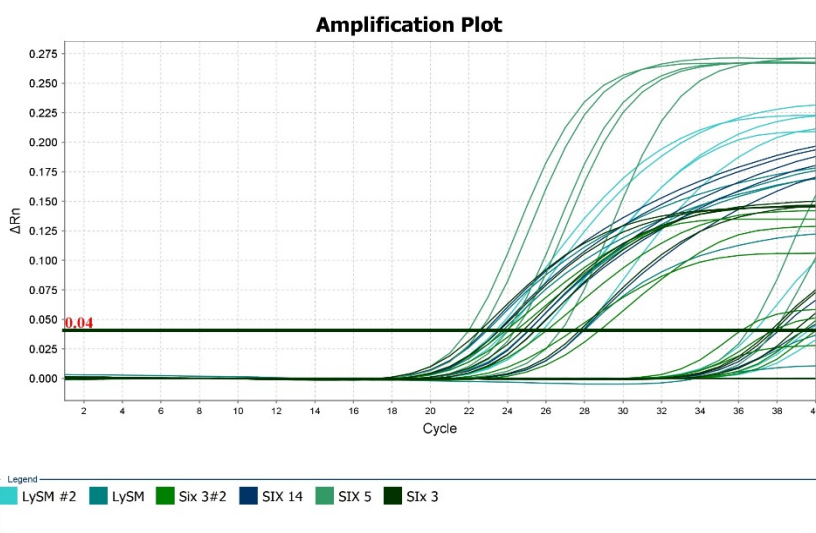
Met de gegevens uit onderdeel 3.3 zijn 7 genen/varianten van genen (ook wel allelen genoemd) geïdentificeerd die uniek zijn voor *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, het belangrijkste *Fusarium* pathogeen op ui in Nederland. Van deze genen en genen met enige sequentiegelijkenis met niet-ui pathogenen zijn vervolgens sequentie alignments gemaakt waarbij de verschillen tot op de nucleotide inzichtelijk gemaakt worden. Als eerste test zijn vervolgens is een zestal Taqman primers en probes ontworpen. De probe is gelabeld met een kleurstof die ervoor zorgt dat een succesvolle reactie direct kan worden waargenomen en gekwantificeerd (Voorbeeld voor het six5 gen in Figuur 5).



Figuur 5. Een vergelijking van varianten van het six5 gen uit orchidee, tomaat en anjer en de twee varianten die in Nederlandse ui-pathogenen voorkomt in *Fusarium oxysporum*. Forward en reverse primers op het six-5 gen (groene pijlen) zijn geplaatst in stukken coderend DNA (exonen; gele pijlen) de tussenliggende probe (blauwe pijl) is gelabeld met de FAM kleurstof (groene ster).

Het zestal verschillende primer/probe combinaties is vervolgens getest op specificiteit. Hierbij is zowel gekeken naar inclusiviteit: detectie van alle verschillende individuen in een set ui-pathogenen van verschillende herkomst als naar exclusiviteit (ofwel geen signaal bij niet-pathogenen). Alle sets gaven een totale in- en exclusiviteit in de testen, wat betekent dat ze specifiek zijn.

De Taqman methode is een kwantitatieve test, die 40 vermeerderingsronden kent. Door op eenzelfde DNA monster de verschillende primer/probe combinaties te testen is te zien welke daarvan het gevoeligst zijn (Figuur 6). Sommige primer/probe combinaties geven laat in de reacties een licht achtergrond signaal als er geen DNA materiaal in de reactieaanwezig is. De twee primer/probe combinaties die een goede gevoeligheid combineren met een laag achtergrondsignaal en die gebaseerd zijn op twee effector genen, *six5* en *lysM* worden nu verder getest om te bepalen hoe sensitief te zijn (welke hoeveelheden ze detecteren), hoe herhaalbaar de resultaten zijn (overeenkomstige resultaten van replica's), hoe reproduceerbaar de gegevens zijn (zelfde resultaten op verschillende apparatuur en uitvoerenden) en hoe hun selectiviteit is (testresultaten in verschillende matrices zoals in plant materiaal of in grond).



Figuur 6. Geschiktheid van primer / robe combinaties voor de detectie van LySM en Sis genen. Naarmate de curve eerder oploopt is de primer probe combinatie gevoeliger.

In Engeland was op basis van Engelse pathogenen van ui, een kwantitatieve qPCR ontwikkeld werkend op twee primers en een algemene kleurstof, SybrGreen. Deze methode is nog niet gepubliceerd, maar door een geheimhoudingsovereenkomst hebben we de methode wel tot onze beschikking gekregen. Door de grotere variatie van de sequenties in de Nederlandse isolaten blijkt de Engelse test niet alle pathogene Nederlandse isolaten te kunnen detecteren door variatie in de sequentie waar de primer op zou moeten passen. De methode wordt dus verder niet meegenomen in de testen.

3.4 Verzamelen en analyse praktijkmonsters

In het najaar van 2020 zijn op 32 locaties monsters verzameld, waarbij er per locatie tussen de 1 en 10 grondmonsters en/of een of meerdere aangetaste uien verzameld zijn. Deze monsters waren afkomstig van 31 gangbare en 1 biologisch bedrijf. Daarvan waren 31 monsters afkomstig van velden met ui als staand of geogst gewas. Een veld werd bemonsterd waarop al 15 jaar geen uien geteeld waren in verband met eerdere problemen en waar het afgelopen teeltseizoen tulpen hadden gestaan. Deze monsters gaan gebruikt worden om de diagnostische methode verder te testen en uit te werken en geven daarnaast een idee hoe het met *Fusarium* in de praktijk is gesteld.

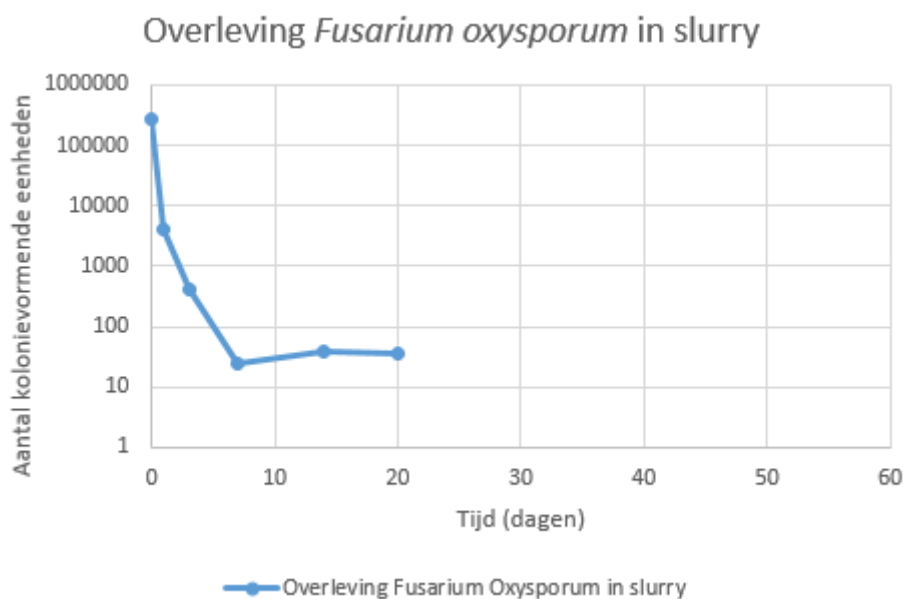
De eerste voorlopige analyses met de primer/probe sets op het *six5* en het *LysM* gen van 25 ingezonden uien (van die 32 locaties) van verschillende bedrijven laat bij de eerste screening zien dat in 92% (23) van de uien *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* aangetoond kan worden. Dit is een hoger percentage aan *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* dan in 2017 en 2018 door middel van uitplaten van rot materiaal werd gevonden. Dit komt omdat er nu gericht gezocht wordt naar een pathogeen en alle secundaire bacteriën en schimmels in de analyse geen probleem opleveren, terwijl zij bij uitplaten de pathogene kunnen verdringen. Door het gebruik van detectie op de pathogeniteits-genen weten we ook direct dat deze pathogene *Fusarium* aanwezig is of is geweest. De detectiemethode voor plantenmateriaal zal in 2021 verder uitgewerkt worden voor verschillende plantenonderdelen en reststromen met plantaardig materiaal en uitgebreid worden met een extractie-amplificatie controle gebaseerd op algemeen stukje planten DNA).

De aangeleverde grondmonsters worden in 2021 gebruikt om een geschikte, waar mogelijk kwantitatieve, methode te ontwikkelen waarmee de aanwezigheid van DNA van het pathogeen in de grond kan worden aangetoond. In grond waarvan door de telers aangegeven was dat de problemen op het veld met *Fusarium* te zien waren, kon vaak in de eerste test al direct *Fusarium* aangetoond worden, wat aangeeft dat de concentratie sporen in de grond hier uitzonderlijk hoog is. Door verder optimaliseren van de DNA extractie, de Taqman analyse en inzetten van een of meerdere verrijkingstappen, wordt in 2021 gewerkt om de detectie in grond te verbeteren.

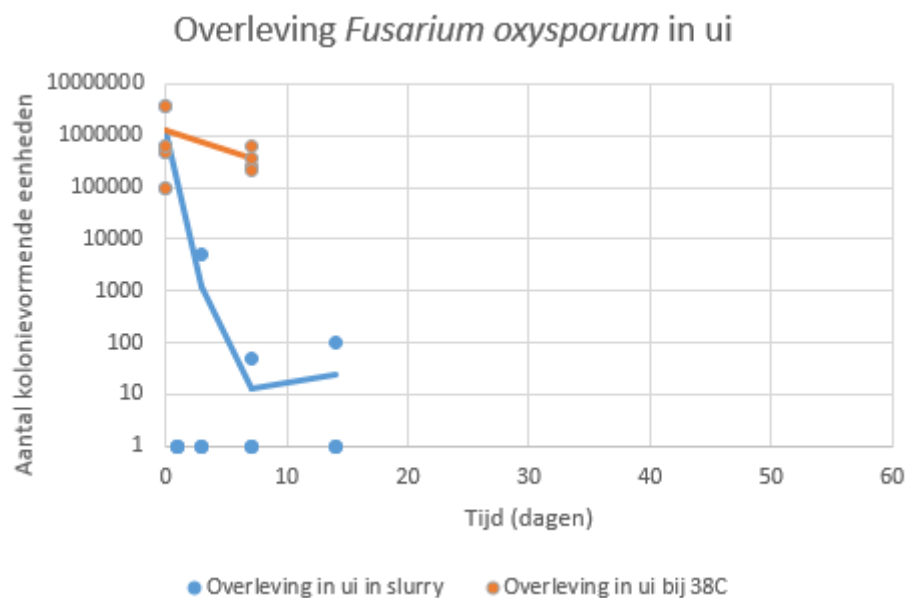
3.5 Overleving in vergister en tijdens compostering

Binnen Uireka (1) zijn er overlevingsexperimenten in een vergister en in compost uitgevoerd waarbij uien met een natuurlijke *Fusarium* besmetting zijn gebruikt. Deze besmetting was niet kwantificeerbaar door verschil in infectiedruk tussen gebruikte uien en de infectie bleek veroorzaakt door verschillende *Fusarium* soorten waarbij *Fusarium proliferatum* in de partij meer voorkwam dan *Fusarium oxysporum*.

De eerste resultaten laten zien dat in de digestaat een snelle afname van het aantal levensvatbare sporen plaatsvindt; zo'n 99.99% afname in de eerste week (Figuur 7). Echter na minstens 21 dagen zijn er van de oorspronkelijke 3×10^5 sporen/ml nog steeds aantallen van circa 30 sporen/ml in leven. Ook als de sporen in hele uien in de vergister terecht komen, vindt er een snelle afdoding plaats van circa 99.99% in de eerste week (Figuur 8). Dit afsterven in de vergister vindt sneller plaats dan in uien die opgeslagen worden bij een temperatuur van 38°C, de gemiddelde temperatuur in de vergister, wat aangeeft dat ook andere factoren dan alleen temperatuur een rol spelen in de afdoding.



Figuur 7. Overleving van *Fusarium oxysporum f.sp. cepae* in de slurry in de vergister. In de eerste dagen vindt een snelle afdding plaats van losse sporen, maar na drie weken tijd zijn er nog steeds levende sporen aanwezig (analyse laatste tijdstippen loopt nog).



Figuur 8. Overleving van *Fusarium oxysporum f.sp. cepae* in hele uien toegevoegd aan de vergister (blauw) en uien die bewaard worden bij 38°C in een incubator. In de eerste dagen vindt in de vergister een snelle afdding plaats van *Fusarium*, maar na drie weken zijn er nog steeds levende sporen aanwezig. Bij opslag bij 38°C is er in veel mindere mate sprake van afsterven van sporen (oranje lijn). Na 35 tot 56 dagen zijn de uien helemaal verteerd (analyse overleving laatste tijdstippen loopt nog).

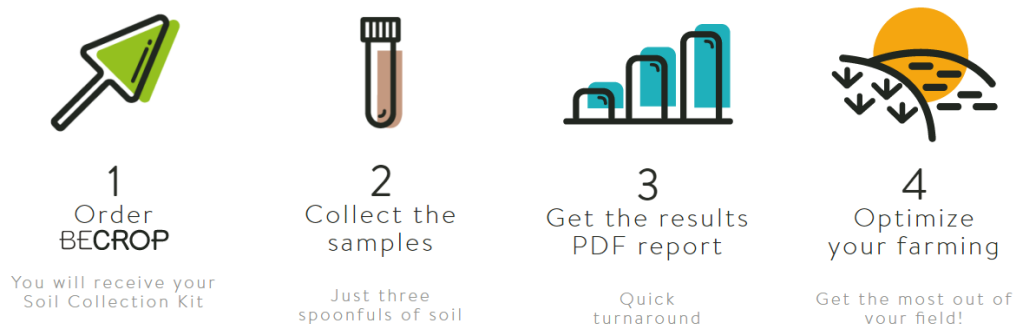
De geplande overlevingsexperimenten in compost bij een officieel composteringsbedrijf hebben we helaas door alle Covid-19 perikelen niet in 2020 kunnen uitvoeren. Hopelijk kunnen die in 2021 wel doorgang vinden.

3.6 Microbioom analyses

Geen officieel onderdeel van het oorspronkelijke werkplan, maar in 2020 is WUR met de firma Biomemakers een samenwerking gestart. Via EU-project Fields4Ever kunnen er aan een set grondisolaten kosteloos microbiom analyses gedaan worden. Daarbij krijgen we als groep de uitgewerkte 'BeCROP' gegevens zoals Biomemakers deze aanbiedt aan particulieren met informatie over onder andere biodiversiteit van de bodem (Figuur 9), maar ook de ruwe sequentiedata van aanwezige bacteriën en schimmels in de grondmonsters.

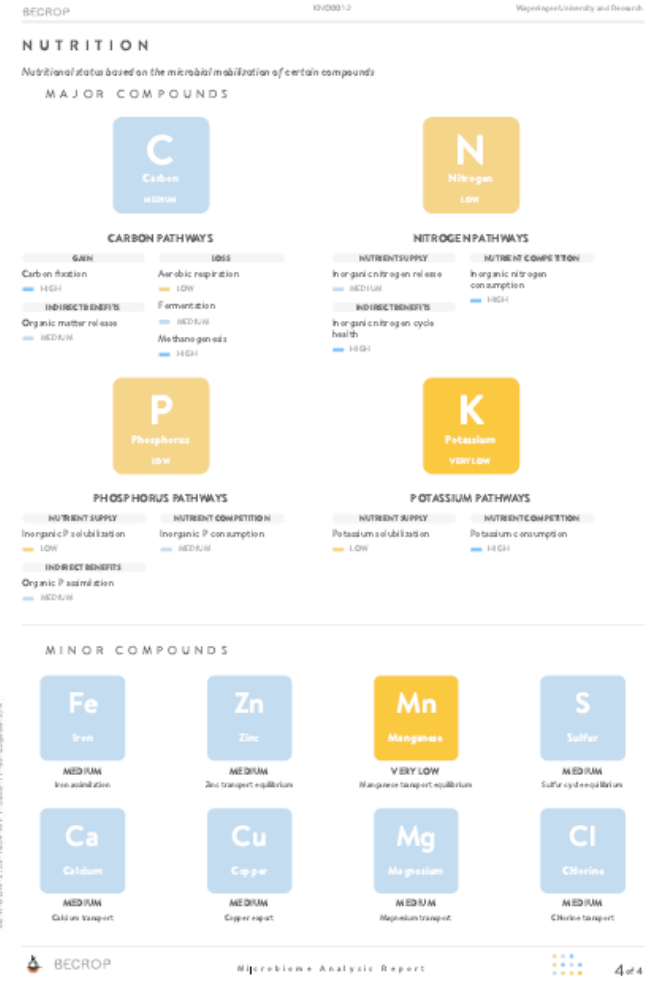
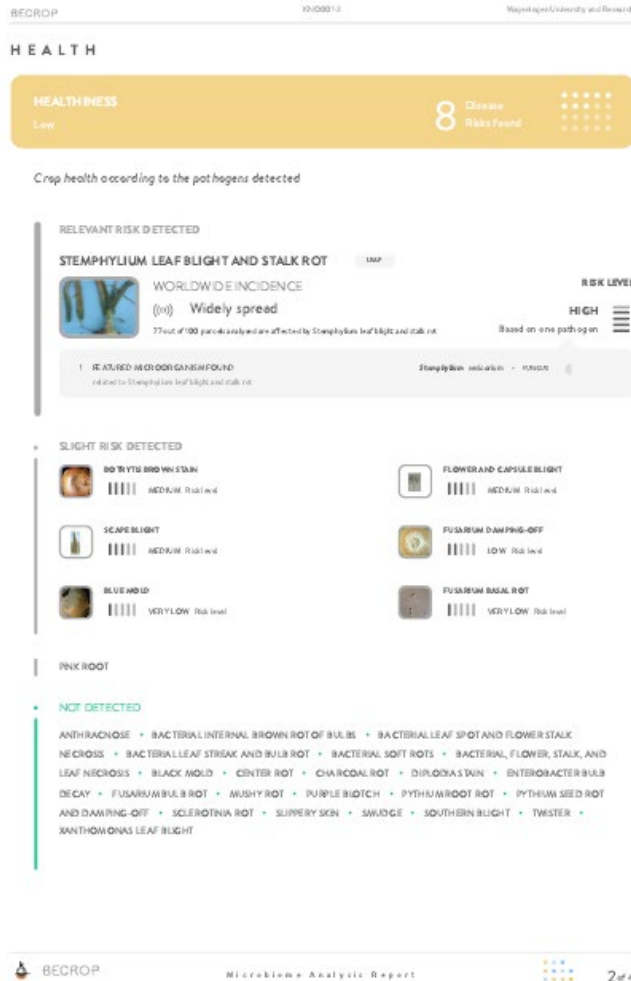
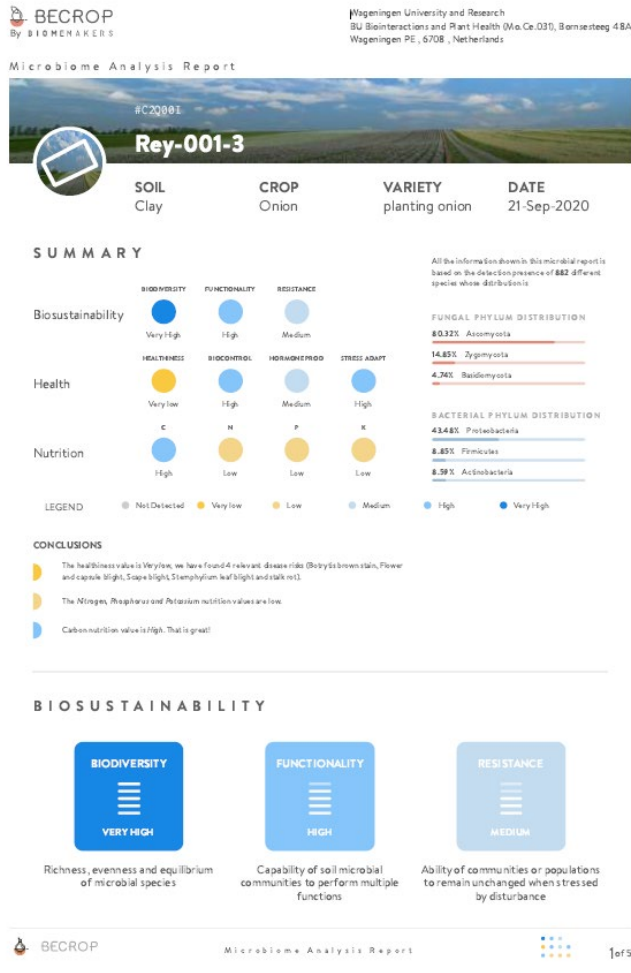
FOUR STEPS,

a complete crop status evaluation



Figuur 9. De procedure van de BeCrop analyse: (1) Via Biomemakers zijn kits te bestellen waarmee (2) grondmonsters te nemen zijn. Deze monsters zijn op te sturen naar de vestiging van het bedrijf in Spanje, waarna na circa 3 weken (3) een rapport met de analyse gegevens op te halen is op de website en naar eigen inzichten (4) te gebruiken zijn.

Van alle in het najaar verzamelde grondmonsters zijn in drievoud monsters opgestuurd naar Spanje waarna de BeCROP resultaten (Figuur 10) als ook sequentiedata van bacteriën en schimmels zijn ontvangen. Momenteel wordt een MSc student door de onderzoeksgroep opgeleid in bioinformatica/microbioomanalyses, die volgens planning in de periode april-juni 2021 de Uireka gegevens verder zal analyseren of de er groepen schimmels en bacteriën zijn in de grond die een positief of negatief effect lijken te hebben op de ontwikkeling van de ziekte.



Figuur 10. Voorbeeld van een deel van de Becrop-analyse aan een van de bodemmonsters.

4 Discussie en interpretatie

Met de biotoetsen uitgevoerd op hele uien is vast te stellen welke van de eerder geïsoleerde *Fusarium* stammen pathogeen zijn en welke niet. Volgens de Engelse onderzoekers geven de testen op hele uien en op zaailingen zelfde resultaten in het bepalen van de pathogeniciteit (Taylor *et al.*, 2016). Bij 20°C, de temperatuur waarbij onze proef is uitgevoerd, bleken de sterkste pathogenen te behoren tot *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*. De geteste *F. solani*, *F. proliferatum* en *F. redolens* isolaten bleken niet tot nauwelijks aantasting in de bollen te geven onder deze omstandigheden. Het isolaat van *F. proliferatum* dat de meeste infectie liet zien, bleek bij het testen met de nieuwe diagnostische toets een mengsel van *F. proliferatum* en de meer pathogene *F. oxysporum* f.sp. *cepae* te zijn.

Van de in najaar 2020 verzamelde symptomatische uien bleek met de in ontwikkeling zijnde diagnostische toets in de eerste ruwe test al minimaal 92% van de monsters positief voor de aanwezigheid van DNA van *F. oxysporum* f.sp. *cepae*, wat daarmee de meest pathogene, maar ook meest voorkomende *Fusarium* pathogeen op ui is. De overige uien moeten opnieuw en zo nodig verder getest worden, om vast te stellen welk pathogeen daar aanwezig was. De verschillen met de observaties binnen Uireka in 2017 en 2018 zijn dus groot: daar bleken slechts 94 van de 329 isolaten (29%) *F. oxysporum* f.sp. *cepae* te zijn op grond van de gebruikte Engelse PCR testen op *six* en andere genen. Dit komt omdat er met het uitplaten ook tal van secundaire infecties door bacteriën en schimmels en aanwezige niet-pathogenen, waaronder andere algemeen voorkomende *Fusarium* soorten, mee kunnen liften.

De bioinformatica studie van de genomen van de verschillende op ui voorkomende *Fusarium* soorten, pathogenen van andere waardplanten en niet-pathogene soorten laat zien dat het genoom in drie delen te classificeren is. Allereerst zijn er de eigenschappen die door alle *Fusarium* isolaten gedeeld worden en waarin nauwelijks tot geen variatie zit, de zogenaamde huishoudgenen. Daarnaast zijn er eigenschappen die niet door alle isolaten gedeeld worden. In pathogene soorten zitten bijvoorbeeld gedeelde eigenschappen die hun virulentie bepalen. Tenslotte zijn er genen die specifiek gelinkt zijn aan een bepaalde gastheersoort. Voor *F. oxysporum* f.sp. *cepae* bleken zeven genen/allelen (Tabel 1) specifiek te zijn en niet in andere pathogenen en niet-pathogenen voor te komen. Op deze eigenschappen worden nu moleculaire diagnostische tests ontwikkeld die specifiek uienpathogenen kunnen detecteren. Vier van deze zeven genen cq allelen zijn niet door Taylor et al (2016) geïdentificeerd als verantwoordelijk voor pathogeniciteit in de Engelse context.

De eerste sets van Taqman primers en probes die op de specifieke genen ontwikkeld zijn lieten inderdaad allemaal de verwachte specificiteit zien: zowel inclusiviteit (detectie van verschillende *F. oxysporum* f.sp. *cepae* isolaten uit Nederland, maar ook van daarbuiten) als ook exclusiviteit (geen detectie van pathogenen van andere waardplanten of niet pathogenen). De twee meest gevoelige diagnostische sets met het minste achtergrond signaal worden nu verder getest om tot een definitieve keus te komen voor een betrouwbare moleculaire diagnostische test. De eerste testen op plant materiaal zagen er veelbelovend uit en ook in een deel van de grondmonsters, bekend om de grote hoeveelheden stoffen die remmend kunnen werken op de detectie, werden bij de eerste test al direct DNA van pathogenen gedetecteerd. Dit waren allen monsters waarbij ook de grootste problemen gemeld werden. De methode wordt nu verder ontwikkeld en geoptimaliseerd in de hoop uiteindelijk schadedrempels in grond vast te kunnen stellen.

Tijdens vergisting van plantaardige materialen vindt er een snel afdoding plaats van circa 99.99% van de aanwezige sporen. Dit geldt zowel voor sporen die los in het vergistingsmengsel komen als ook voor sporen die zich inwendig in bollen bevinden. Toch kunnen er na drie weken nog altijd levende sporen in de vergister worden aangetroffen en is materiaal dan dus nog niet ziektekiem vrij te gebruiken. De experimenten met de vergister zijn nog niet afgerond en moeten nog verder geanalyseerd worden.

Microbioomdata van de verschillende grondmonsters zijn gegenereerd en zullen later in 2021 worden geanalyseerd. Daarbij zal gezocht worden naar verbanden tussen de bodempopulaties van bacteriën en schimmels en de waargenomen infectiedruk door *Fusarium*.

Ondanks de Corona/Covid-19 pandemie in 2020, konden de meeste werkzaamheden zonder al te veel problemen uitgevoerd worden. Alleen de overlevingsexperimenten van *Fusarium* in de compost zijn door het composteringsbedrijf tot 2021 uitgesteld. In eerste instantie is daarvoor een in principe afspraak gemaakt voor mei 2021, maar met de meer virulente Corona-varianten die nu in opmars zijn is het de vraag of deze plannen uitgevoerd kunnen gaan worden.

Waar in de laboratoria in 2020 weliswaar met minder mensen, maar wel gewoon gewerkt kon worden, beginnen we nu begin 2021 als gevolg van de covid-19 crisis met de eerste tekorten in labbenodigheden te kampen. Bij de toeleverende bedrijven ligt de aandacht vooral op de productie van materialen nodig voor het testen op infectie met het coronavirus en alle onderzoek naar en productie van vaccins. WUR doet zijn best om in het belang van het onderzoek naar plantenziektes ook voorrang te krijgen op leveringen en voor sommige producten worden alternatieven gezocht.

5 Conclusies en aanbevelingen


Fusarium oxysporum f.sp. *cepae* is het in Nederland meest gevonden *Fusarium* pathogeen op ui en ook in de biotoets was het de soort die de zwaarste aantasting in de ui veroorzaakte. Dankzij de genomanalyse van ui-pathogenen en niet-ui-pathogenen hebben we een set van genen/allelen gevonden waarmee kan worden vastgesteld dat we te maken hebben met een ui-pathogeen en kunnen daarop diagnostische toetsen ontwikkelen. Een tweetal Taqman primer/probe sets zijn daarin veel belovend: ze zijn specifiek en hebben niet te veel achtergrondsignaal. Ook bij de eerste screening op plant- en grondmonsters uit de praktijk zagen de resultaten van deze twee primer/probe sets er goed uit. In 2021 zal er verder gegaan worden met het optimaliseren van de detectie voor verschillende typen monsters (plant, bol, zaad, reststromen en grond).

Met de verbeterde detectie kan er ook verder gewerkt worden aan de analyse van grond- en plantmonsters uit verschillende vruchtwisselingsproeven en uit de praktijk om in kaart te brengen wat het verloop van de pathogenen onder verschillende teeltomstandigheden is. De overlevingsexperimenten van *Fusarium* in compost worden zodra mogelijk, in 2021 uitgevoerd.

6 Referenties

- Haapalainen, M., Latvala, S., Kuivainen, E., Qiu, Y., Segerstedt, M. and Hannukkala, A.O. (2016), *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. redolens* associated with basal rot of onion in Finland. *Plant Pathol*, 65: 1310-1320.
- Kalman, B., Abraham, D., Graph, S., Perl-Treves, R., Meller Harel, Y., & Degani, O. (2020). Isolation and Identification of *Fusarium* spp., the Causal Agents of Onion (*Allium cepa*) Basal Rot in Northeastern Israel. *Biology*, 9(4), 69. <https://doi.org/10.3390/biology9040069>
- Klokočar-Šmit, Z., Lević, J., Masirevic, S., Grozdanović-Varga, Je., Vasić, M. and Aleksić, S. (2008). Fusarium rot of onion and possible use of bioproduct. *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke*. 2008. 10.2298/ZMSPN0814135K.
- Komada, H. 1976. A new selective medium for isolating *Fusarium* from natural soil. *Proceedings of the American Phytopathological Society* 3:221
- Scholten, O. and Burger, K. (2020) *Fusarium*-onderzoek in de Nederlandse uienteelt. Uireka rapportnummer: 2019-04.
- Taylor, A., Vágány, V., Jackson, A.C., Harrison, R.J., Rainoni, A. and Clarkson, J.P. (2016), Identification of pathogenicity-related genes in *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*. *Molecular Plant Pathology*, 17: 1032-1047.

Bijlage 1 - Monsterformulier

MONSTER	Monstercode¹ 	Type monster² <input type="checkbox"/> Plantmateriaal Blad/bol/wortel <input type="checkbox"/> Grondmonster-enkel <input type="checkbox"/> Grondmonster-gemengd <input type="checkbox"/> Ander:	Opslag³ <input type="checkbox"/> 4 à 5°C /100-200g (analyse levend materiaal) <input type="checkbox"/> -18 à -20°C /10-20g (DNA analyse)	
	<input type="checkbox"/> Serie: ⁴ monster maakt deel uit van een serie	Datum Dag/maand/jaar/...../.....	Locatie GPS coördinaten of adres⁵	
TEELT	Huidig gewas/cultivar: Partijnummer:	Plantui/ Zaaiui/ Sjalot/ Anders	Zaaidatum: Biologisch/Gangbaar	Grondontsmetting, jaar Biologische GO: Inundatie:
	Rotatieschema Gewas(sen)/jaar:	Bemesting/ Groenbemester(s):	Grondbewerking:⁶ Ploegen/eggen/rotorkoep /anders.... Ploegdiepte: Niet/wel kerend Graag periode voor/najaar aangeven	Gewasbestrijding Bovengronds: Ondergronds: Pootgoed-/Gewas- voorbehandeling:
	Bodemtype: Grondanalyse/bodemvruchtbaarheidsanalyse -kopie bijsluiten waar mogelijk			
BODEM	Redox potentiaal (mV):	pH:	Organisch materiaal (%):	Stikstof (Nitraat/Ammonium):
	Fe (mg/kg):	Ca (kg/ha):	K (mg/kg):	Na (mg/kg):
	Mn (mg/kg):	Zn (µg/kg):	P (mg/kg):	Lutumgehalte:
	S (mg/kg):	Si (µg/kg):	B (µg/kg):	Verslemping:
OPSLAG ⁷	Rooidatum:	Geplande datum einde opslag:	Opslag temperatuur:	Kiemremmersmiddelen: <input type="checkbox"/> MH <input type="checkbox"/> 1,4 sight <input type="checkbox"/> Biox-M <input type="checkbox"/> Restrain <input type="checkbox"/> Anders:
	Inschuurdatum:	Opslag: Los/kisten/anders:	Opslag luchtvochtigheid:	
Fusarium	Huidige problemen:⁸ % Fusarium besmette planten op het veld % Fusarium besmette uien in opslag			
	Eerdere problemen:⁸ % Fusarium besmette planten op het veld % Fusarium besmette uien in opslag			
	Andere ziektes? Zo ja, welke en percentage aantasting			
EXTRA	Aanvullende informatie:			

Resultaten worden vertrouwelijk behandeld.

Contactpersoon: Anne van Diepeningen, BU Biointeracties en plant gezondheid (Mo.Ce.031)
Bornesteeg, 48A, 6708 PE Wageningen. anne.vandiepeningen@wur.nl. tel: 06-14614413.

Verklaringen codes:

1. Monstercode: 3 letters voor het bedrijf en een volgnummer voor het monster. Bijvoorbeeld DIE001 voor het eerste monster van ~~van~~ Diepeningen.

2. Type monster: (Deel van een) plant, grondmonster van een enkele steek, mengmonster van circa 10 verschillende steken representatief voor een veld of anders bijvoorbeeld compost, reststroom of ander.

Steken van een **grondmonster**: Steek een grondmonster met behulp van een grondboor, gutsboor of schopje op een standaard monsterdiepte van 0-20 cm. Als van een andere diepte wordt bemonsterd, dan de diepte vermelden. Voor een mengbemonstering van een veld, 30-40 steken verspreid over het perceel nemen en de verkregen grond mengen in een emmer en kleiner deelmonster nemen. Monster verpakken en labelen met monstercode en datum en opslaan bij 4-5°C voor uitgroei van levende schimmels of -18 a -20°C voor DNA analyse. Monsterformulier invullen.

Andere monsters: Monster verpakken en labelen met monstercode en datum en opslaan bij 4-5°C voor uitgroei van levende schimmels of -18 a -20°C voor DNA analyse. Monsterformulier invullen.

3. De opslagmethode bepaalt de type analyse(s) die mogelijk zijn: Voor analyse van schimmel op grond van DNA worden kleine hoeveelheden materiaal geanalyseerd: 10-20g opslag bij -18 à -20°C is voldoende en een monster kan meer dan een jaar worden opgeslagen. Voor analyse van levend materiaal worden monsters bij 4 à 5°C bewaard; deze monsters kunnen tot circa een jaar bewaard blijven waarbij er weinig groei of afsterven van *Fusarium* plaats vindt. Bij lagere temperaturen sterft een deel van de sporen af.

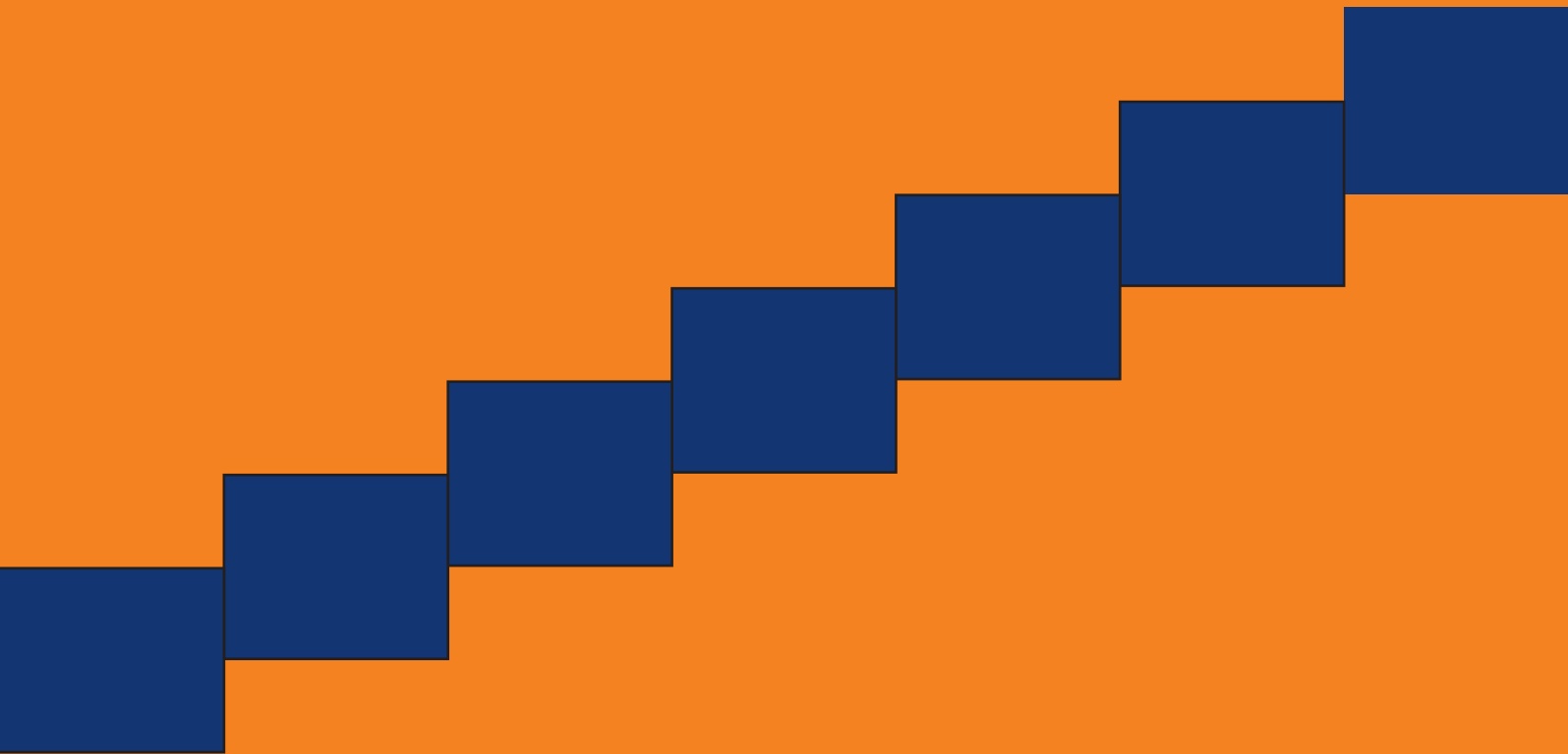
4. Noteer of monster deel uit maakt/gaat maken van een serie. Bijvoorbeeld meerdere monsters van een perceel op dezelfde dag of over jaar of jaren.

5. Locatie: geef bij voorkeur de GPS coördinaten van het monsterpunt of anders het adres. Bijvoorbeeld B 51.987431 x L 5.665395 voor ~~Droevendaalssteeg~~ Wageningen. Coördinaten kunnen bijvoorbeeld worden bepaald met een GPS toestel of via de Google ~~maps~~ app: Open de Google Maps-app, tik op de kaart op een gebied dat geen label heeft en houd dit vast. Er wordt een rode speld geplaatst. U ziet de coördinaten in het ~~zoekvak~~ bovenaan.

6. Grondbewerking: doorhalen wat niet van toepassing is, eventueel aanvullen

7. Vragen over de opslag indien van toepassing op het monster.

8. Huidige en eerdere problemen: omschrijf huidige en eerdere problemen van de locatie, bij voorkeur als percentage.



Dit is een uitgave van Uireka, een initiatief van de Holland Onion Association.

Holland Onion Association
Louis Pasteurlaan 6
2719 EE Zoetermeer
Tel. + 31 79 368 11 00



is part of



www.uireka.nl

Uireka wordt mede mogelijk gemaakt door:



+ meer dan 70 ketenpartners!

