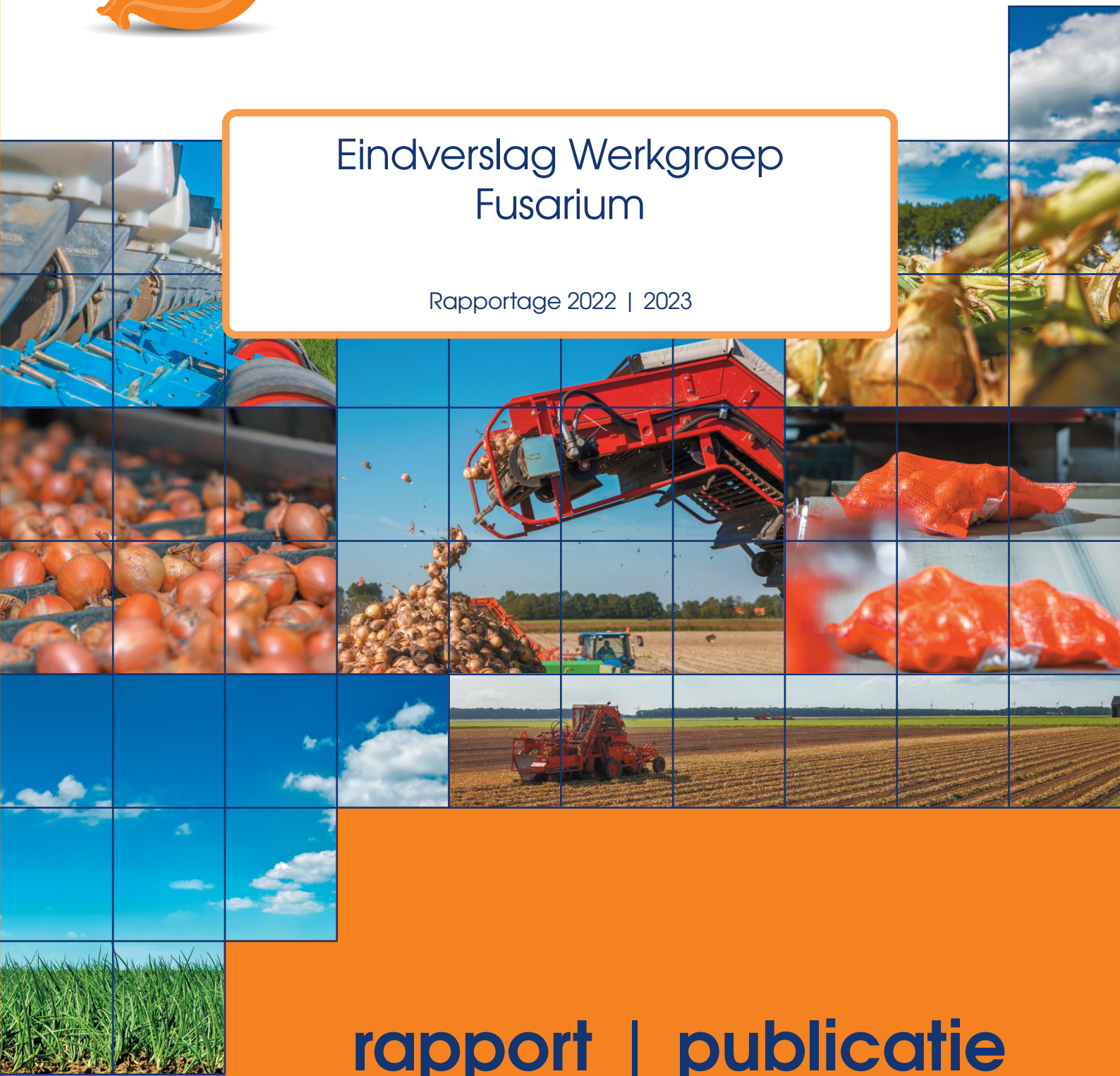




Rapportage 2022 | 2023

2023-06

Eindverslag Werkgroep *Fusarium* Uireka2 2020-2022



Uireka 2023-06

2023-06

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.

Eindverslag Werkgroep *Fusarium*

Uireka2 2020-2022

Uitgevoerd door: Anne D. van Diepeningen

Uireka rapport nummer: 2023-06

Datum: Oktober 2023

Inhoudsopgave

1	Inleiding en doel	9
2	Materiaal en methodes	11
2.1	Analyse pathogeniteit uien isolaten	11
2.2	Whole genome sequensen pathogenen en niet-pathogenen	11
2.3	Bioinformatica	11
2.4	Ontwikkeling diagnostische toets	12
2.5	Verzamelen praktijkmonsters	12
2.6	Overleving in vergister en tijdens compostering	13
2.7	Overleving tijdens inundatie	14
2.8	Microbioom analyse	14
2.9	Bakkenproef: Onderzoek naar drempelwaardes in de rotatie	15
2.10	Bemonstering in het veld	16
3	Resultaten	19
3.1	Analyse pathogeniteit uien isolaten	19
3.2	Bioinformatica	20
3.3	Ontwikkeling diagnostische toets	22
3.4	Verzamelen en analyse praktijkmonsters	24
3.5	Overleving in de vergister	26
3.6	Overleving tijdens compostering	28
3.7	Overleving tijdens inundatie	31
3.8	Microbioom analyses	33

3.9	Bakkenproef: Onderzoek naar drempelwaardes in de rotatie	38
3.9.1	Dosis-effecten van <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i>	38
3.9.2	Effecten van behandelingen	41
3.9.3	Andere gewassen en <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i> .	43
3.10	Bemonstering in het veld	45
4	Discussie en interpretatie	47
4.1	<i>Fusarium oxysorum</i> f.sp. <i>cepae</i> is belangrijkste pathogeen op ui in Nederland.	47
4.2	Specifieke detectiemethode voor <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i>	48
4.3	Reststromen en inundatie	48
4.4	Rotaties en microbiomen	49
5	Conclusies en aanbevelingen	51
6	Referenties	53
7	Bijlage 1 - Monsterformulier	55

Samenvatting

Binnen het Uireka2 werkpakket *Fusarium* zijn de volgende resultaten verkregen:

- ***F. oxysporum forma speciales cepae*** blijkt het sterkste en meest voorkomende pathogeen in Nederland dat Fusarium rot in uien veroorzaakt. Dit komt uit een biotoets op uienbollen met tijdens de in Uireka (1) verzamelde isolaten van *Fusarium oxysporum*, *F. solani* en *F. proliferatum*. Echter ook niet-pathogene *Fusarium* stammen komen voor als meeliftende infecties in een rottende bol.
- Vergelijkingen van de genomen van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* en niet ui-pathogenen heeft laten zien welke gen- en allelsequenties in het DNA uniek en verantwoordelijk zijn voor de pathogeniteit van een Fusarium-isolaat. Op deze specifieke sequenties is een **kwantitatieve** op TaqMan gebaseerde **pathogeen-specifieke diagnostische** toets ontwikkeld waarmee de aanwezigheid van het pathogeen gekwantificeerd kan worden. Door de test te combineren met een kweekstap op selectief medium, ontstaat een kwantitatieve Bio-TaqMan die de Fusarium dichtheid vanaf enkele sporen per gram grond of gewas kan vaststellen.
- De ontwikkelde Bio-TaqMan diagnostische toets is geschikt voor de detectie van *F. oxysporum* forma *speciales cepae* **in plantmateriaal en in grond**. In het overgrote deel van de in 2020 en 2021 verzamelde uien blijkt *F. oxysporum* f.sp. *cepae* aanwezig. In de grond bleek tijdens seizoen 2021 in de uienteelt het pathogeen gemiddeld in 50-voud toe te nemen in de periode van zaaien van de uien tot aan de oogst.
- Tijdens **vergisting** van uienresten duurt het 3 weken om circa 99.99% van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* te doden, maar bij continue doorstroom van materiaal in de vergister waarbij de verblijfsduur uiteen kan lopen, bestaat niettemin een kans dat levend schimmelmateriaal de vergister verlaat. Bij **compostering** is na 1 cyclus (8 a 10 dagen) meer dan 99.99% van de schimmel afgedood, na twee composteringscycli is er geen levend *Fusarium* materiaal meer aanwezig.
- In een bakkenproef met geïnoculeerde grond was een **dosis-effect** waar te nemen waarbij bij toenemende dichtheid van Fusarium sporen in de grond leidde tot een toename van ziektesymptomen als het niet opkomen van kiemend zaad, vergeling en verwelking van planten en rot in de uiteindelijke uien.
- Uit een bakkenproef met andere gewassen dan ui waaraan wel de uienpathogeen is toegevoegd komt de suggestie dat sommige van deze gewassen **reservoirplanten** zouden kunnen zijn: planten die geen ziektesymptomen vertonen, maar waar de schimmel wel in kan groeien. Deze experimenten moeten herhaald worden voor zekerheid welke planten een risico kunnen vormen voor de handhaving of zelfs vermeerdering van *F. oxysporum forma speciales cepae* in afwezigheid van uien.

1 Inleiding en doel

Verschillende *Fusarium*soorten 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 moeilijker 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 bol van de ui verspreidt de rot zich vanaf de basale plaat in de richting van de stengel/knop en de vlezige bolrokken. Aangetaste wortels verkleuren donkerroze tot donkerbruin en soms is een wit myceliumpluis zichtbaar bij de bolstoel. *Fusarium* kan zowel in het veld tot problemen leiden als tijdens de bewaring 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 plantmateriaal 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-genen*) 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 is een apart werkpakket opgezet, dat zich concentreert op het beter beheersbaar krijgen van *Fusarium* in de teelt en bewaring van uien. Volgens planning werden 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,
7. Ontsmetting via inundatie,
8. Verschillen in het microbiom tussen *Fusarium*- besmette en niet-besmette percelen,
9. Onderzoek naar drempelwaarden in de rotatieketen in een bakkenproef, en
10. Monsternamen in het veld

2 Materiaal en methodes

In dit hoofdstuk wordt beschreven hoe de verschillende experimenten zijn uitgevoerd. Alle resultaten en conclusies die daaraan verbonden kunnen worden staan in de volgende hoofdstukken.

2.1 Analyse pathogeniteit uien isolaten

De pathogeniteit-test 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 één bruine rok overbleef als buitenste schil. Van de onderkant is een dunne laag afgesneden en eventuele wortelresten zijn verwijderd. Het snijvlak is ontsmet met 70% alcohol. Inoculaties van de bollen vond plaats door een stukje voedingsmedium (ponsje van 5 mm diameter) 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 bollen met het Engelse controle isolaat beoordeeld op de mate van aantasting. Na 7 weken bleek bij de positieve controle dat 80-100% van het ui-oppervlakte van overlangs doorgesneden bollen aangetast was. Vervolgens zijn alle bollen beoordeeld. Het percentage oppervlakte van de aantasting van de bol is met ImageJ software bepaald. Bij niet pathogene isolaten en in de negatieve controle zat de mate van 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 24 isolaten uit de Uireka veld-isolaten van 2017 en 2018 is gebruikt voor *whole genome* sequencing. Pathogeniteit of niet-pathogeniteit is hierbij gebaseerd op de biotoets zoals beschreven in paragraaf 2.1. Uit de isolaten is DNA geïsoleerd met een op Chelex-gebaseerde extractiemethode, waarbij de cellen opengebroken zijn met een *bead beat* methode na bevroren 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 tussen de 10 en 17 Miljoen sequentie of *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 gesequencede stam is uit alle sequentiedata het genoom in elkaar gepuzzeld voor zover mogelijk (*assembly*) en zijn de genen erop geïdentificeerd en waar mogelijk geïdentificeerd (*annotation*). Naast de gesequencede uien-pathogene en niet-pathogene isolaten uit ui zijn ter vergelijking pathogene en niet-pathogene *Fusarium* stammen van andere waardplanten (variërend van lelie en chrysant tot tomaat en banaan) 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

Selectie van target-kenmerken. 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 uitsluitend 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-pathogene *Fusarium* isolaten; als exclusiviteit: geen signaal bij niet-pathogenen). Twee primer sets, gebaseerd op een tweetal effector genen, *six5* en *lysM*, gaven de beste specificiteit en werden verder gebuikt voor het uitwerken van een detectie methode voor plantmaterialen en bodemonsters.

Interne controles. Als interne controle voor extractie en amplificatie (om uit te sluiten dat een negatieve testreactie komt door een mislukte test, maar echt doordat er minder dan enkele sporen per gram monster aanwezig zijn) worden verschillende beschreven planten en algemene schimmel primer/probe sets toegevoegd aan de test. Als controle voor grond kan een andere schimmel, bijvoorbeeld *Trichoderma atroviride*, een biocontrole soort, worden toegevoegd in bekende hoeveelheid en een TaqMan op een *Trichoderma*-gen worden gedaan (e.g. Savazzini *et al.*, 2008).

Extractiemethoden. Detectie in grondmonsters is lastig omdat veel eiwitten en nucleïnezuren sterk binden aan kleideeltjes in de grond en zich slecht daarvan laten verwijderen. Verschillende grondextractiekits voor DNA en op Chelex-gebaseerde extractiemethodes werden daarom getest op extractie-efficiëntie.

Bio-TaqMan. Om ook lagere hoeveelheden (levend) schimmelmateriaal te kunnen detecteren werd er een verrijkingstap uitgetest met vloeibaar Komada-medium (Komada, 1976) waarin de schimmels 2 tot 3 dagen worden opgekweekt.

Voor een gedetailleerd protocol van de ontwikkelde *Bio-TaqMan* voor *F. oxysporum* f.sp. *cepae* kan men contact opnemen met de stuurgroep van het Uireka-project via Chris de Visser (chris.devisser@wur.nl).

2.5 Verzamelen praktijkmonsters

Najaar 2020. Door de partners zijn in najaar 2020 op 32 door de partners gekozen locaties, met en zonder *Fusarium* aantasting, 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 geoogst 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 (perceelsgegevens, teeltgegevens, monstergegevens) verzameld met behulp van het monsterformulier weergegeven in Figuur 2.1.

Veldseizoen 2021. In 2021 zijn in het voorjaar 85 grondmonsters verzameld van zowel praktijkvelden als van proefvelden. In het najaar is van een 50-tal velden uit dezelfde serie een tweede monster verzameld. Daarnaast is een tiental uien ontvangen behorend bij de grondmonsters.

MONSTER	Monstercode ¹		Type monster ² ☐ Plantmateriaal ☐ Blad/bol/wortel ☐ Grondmonster-enkel ☐ Grondmonster-gemengd ☐ Ander:	Opslag ³ ☐ 4 à 5°C /100-200g (analyse levend materiaal) ☐ -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.	
	☐ Serie: monster maakt deel uit van een serie		Datum Dag/maand/jaar:/...../.....	Locatie GPS coördinaten of adres ⁷			
TELT	Huidig gewas/cultivar: Partijnummer:	Plantui/ Zaaiui/ Sjaai/ Anders	Zaaidatum:	Grondontmetting, jaar	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 à -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 à -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(en)/jaar:	Bemesting/ Groenbemester(s):	Grondbewerking: ⁴ Ploegen/eggen/rotorkoep /anders... Ploegdiepte: Niet/wel kerend Graag periode voor/najaar aangeven	Biologisch/Gangbaar Inhoudsde: Biologische GO: Gewasbestrijding Bovengronds: Ondergronds: Pootgoed-/Gewas- voorbehandeling:			
BODIEM	Bodemtype:						
	Grondanalyse/bodemvruchtbaarheidsanalyse -kopie bijhouden waar mogelijk						
	Redox potentiaal (mV):	pH:	Organisch materiaal (%):				
	Fe (mg/kg):	Ca (kg/ha):	Stikstof (Nitraat/Ammonium):				
Mn (mg/kg):	Zn (µg/kg):	P (mg/kg):	Lutumgehalte:				
S (mg/kg):	Si (µg/kg):	B (µg/kg):	Verslemping:				
OPSLAG	Roodatum:	Geplande datum einde opslag:	Opslag temperatuur:	Kiemremmersmiddelen:			
	Inschuurdatum:	Opslag: Los/kisten/anders:	Opslag luchtvochtigheid:	☐ Mv ☐ 1,4 slight ☐ Biox-M ☐ Restrain ☐ Anders:			
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:						

Figuur 2.1. Monsterformulier 2020/21 (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, niet gepubliceerd).

Uit grond is direct DNA geïsoleerd met behulp van de DNeasy PowerSoil Prokit (Qiagen, Venlo, Nederland) om hoeveelheden van 10^3 à 10^4 sporen of meer per gram grond aan te tonen. Daarnaast is vanuit grond ook op een deelmonster een 3-dagen verrijkingssap uitgevoerd met vloeibaar Fusarium selectief medium op basis van Komada medium om lagere hoeveelheden pathogeen aan te tonen (Komada, 1976), zie paragraaf 2.4.

2.6 Overleving in vergister en tijdens compostering

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 hoeveelhedenconidiosporen 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 met een injectienaald ingespoten (waarin de schimmelsporen dus beschermd zijn door de verder nog intacte ui). De overleving werd bepaald door uitplaten van digestaat of fijn gemalen uienbollen op Komada medium (Komada, 1976). De monsters werden genomen na 0, 1, 3, 7, 14, 20, 35 en 56 dagen incubatie bij 25°C in het donker. Na 5 dagen werden de hoeveelheden kolonievormende eenheden geteld.

Overleving tijdens compostering: Voor de overlevingsexperimenten tijdens compostering zijn (1) microconidiën gebruikt van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* stam Ui60.1.3, (2) chlamydosporen van dezelfde *F. oxysporum* f.sp. *cepae* stam, (3) microconidiën van *F. solani* en (4) microconidiën van *F. proliferatum*. De microconidiën zijn gekweekt in vloeibaar mungbean medium (40g mungbean per liter), de chlamydosporen op grond-agar en daarna bewaard in grond. De sporen zijn op twee manieren toegevoegd aan de compost (1) direct gemengd met compostmateriaal van het compostbedrijf (concentratie 10^6 tot 10^7 sporen/gram) en (2) ingespoten in hele uien (alleen in het geval van microconidiën startconcentratie 10^4 - 10^5 sporen per gram).

Alle monsters zijn in roestvrijstalen staafvormige containers met perforaties ('punten'), ingegraven in de composthoop bij een professionele composteerder. Elke punt zat aan een metalen ketting waardoor de punten tussen verschillende cycli door verzameld konden worden en na omwerken van de compostberg opnieuw konden worden ingegraven. Dataloggers om de temperatuur te meten tijdens de compostering zijn op dezelfde wijze ingegraven. De helft van de monsters is na de eerste composteercyclus van 9 dagen uitgegraven en beoordeeld op overleving door uitplaten en op grond van DNA, de tweede helft na een tweede cyclus van 10 dagen.

2.7 Overleving tijdens inundatie

In 2019-2020 is door Corinna Topper in Lelystad als stageopdracht een overlevingsexperiment uitgevoerd waarin de overleving tijdens inundatie is uitgevoerd. Dit onderzoek maakte geen deel uit van de in het Uireka geplande onderzoek, maar wordt hier in het verslag opgenomen vanwege de relevantie van deze proeven voor de sector.

Aan klei- en zavelgrond werden verschillende hoeveelheden organische stoffen toegevoegd. De behandelingen waren 1) geen toevoeging van organische stof, 2) 10 ton stro/hectare, 3) 50 ton vers gras per hectare of 4) door *Fusarium* aangetaste uien). De inundatie werd uitgevoerd bij een constante temperatuur van 16.5 °C en bij een over 8 weken geleidelijk afnemende temperatuur van 16.5 naar 12°C. *Fusarium* is in deze proef toegevoegd als sporen aan de grond en als aangetaste uien. De sporen waren geproduceerd op graankorrels. De behandelingen werden beoordeeld op uitgroei van *Fusarium* op medium na zowel 8 als 14 weken inundatie.

In 2022 is de overleving van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* bepaald in twee geïnundeerde praktijkpercelen. Voor deze proef zijn zowel chlamydosporen als conidiosporen gebruikt. Overleving is bepaald na ingraven van zeer fijnmazige (kleiner dan de diameter van de sporen) zakjes met kleigrond waaraan 10^5 à 10^6 per gram chlamydosporen uit een grondkweek of 10^6 tot 10^7 per gram conidiosporen uit een mungbean kweek waren toegevoegd. Overleving van deze sporen is aan het einde van de 4 (perceel 1) tot 4.5 maanden (perceel 2) inundatieperiode door middel van het gebruik van de bio-TagMan methode vastgesteld.

2.8 Microbioom analyse

Van alle in 2019 verzamelde grondmonsters zijn minimaal drie monsters per perceel opgestuurd naar Biome Makers (www.biomemakers.com) in Spanje. Daar zijn uit alle monsters totaal DNA geëxtraheerd. Met eubacteriële en schimmelprimers zijn vervolgens de ribosomale regio's van bacteriën en schimmels geamplificeerd en gesequencet. Deze sequenties zijn ter plaatse volgens de BeCrop Methode geanalyseerd en bij WUR met een in-house pijplijn. De in-house pijplijn bevat de volgende stappen: kwaliteitscontrole en opschonen van de sequenties en vervolgens kwantificatie en identificatie van de verschillende sequenties naar herkenbare groepen bacteriën en schimmels.

Verzamelde teelt- en monstergegevens, gegevens over ziektedruk en hoeveelheden schimmelmateriaal gemeten in de monsters, Becrop analyse gegevens en eigen verwekingsgegevens zijn daarna allemaal tegen elkaar uitgezet. Met behulp van het softwarepakket *R* (softwarepakket en programmeertaal ontwikkeld voor statistiek en data-analysedoelinden) zijn daarna de gegevens beoordeeld op significante correlatie met ziektedruk en in het veld waargenomen hoeveelheden *F. oxysporum* f.sp. *cepae*.

2.9 Bakkenproef: Onderzoek naar drempelwaardes in de rotatie

In 2022 is bij de proefboerderij een bakkenproef aangelegd met 1 x 1,2 meter grote bakken, 20 cm diep. Deze bakken zijn gevuld met een mengsel van 75% volume kleigrond (zonder *F. oxysporum* f.sp. *cepae*), 15% zilverzand en 10% potgrond om te zorgen dat de grond niet dichtslaat bij grote hoeveelheden hemelwater in korte tijd. De bakken zijn tijdens het groeiseizoen van voldoende vocht voorzien met hulp van druppelslangen (3 slangen per bak) en op momenten dat dit nodig was of met een slang naar behoefte van de planten (Figuur 2.2.A). Voor alle behandelingen zijn drie replica-bakken gebruikt.

Om te kijken naar **dosis-effecten van *F. oxysporum* f.sp. *cepae*** op de groei van uien en de uiteindelijk geproduceerde en bewaarde uien, is in behandelingen A tot en met E een concentratiereeks van 0, 10, 100, 1000 en 10.000 conidiosporen per gram grond toegepast. Hierin zijn per bak 200 zaden van de cultivar Hypark gezaaid, die een standaard behandeling en zaadcoating hadden gekregen. In behandeling F is gekozen voor een concentratie van 1000 conidiosporen per gram grond en zijn onbehandelde zaden gebruikt. Alle uienzaden zijn vriendelijk ter beschikking gesteld door Bejo Zaden B.V.

Om te kijken of een dergelijke bakkenproef ook geschikt is voor het testen van de effecten van bepaalde **behandelingen**, zijn er verschillende behandelingen uitgevoerd. Dit zijn de behandelingen met Rudis (0.6l/ha; volvelds grondbehandeling voor zaai R), met Trianum (50kg/ha; behandeling S), met chitosan (10l/ha, behandeling T) en een behandeling met niet-pathogene Fusarium (10.000 sporen/g), behandeling U).

Tijdens het groeiseizoen zijn de bakken beoordeeld op de opkomst en het wegvallen van uienplanten (tellen aantal zaailingen/planten) en zijn ze beoordeeld op groei, verwelking en vergeling. Alle uien zijn aan het eind van het groeiseizoen geoogst en bewaard in een hotbox bij 25°C en hoge luchtvochtigheid en na 6 weken opengesneden en beoordeeld op fusariumrot. Een deel van de aangetaste uien is daarna getest met de bio-TaqMan om te verifiëren dat de geobserveerde fusariumrot door *F. oxysporum* f.sp. *cepae* werd veroorzaakt. Net voor de oogst zijn grondmonsters genomen en is met de bio-TaqMan methode de besmetting met *F. oxysporum* f.sp. *cepae* in de grond bepaald.

In een deel van de bakken zijn **andere gewassen** uit de rotatie getest op een startconcentratie van 1000 conidiosporen *F. oxysporum* f.sp. *cepae* per gram grond om te kijken of deze als reservoirplanten kunnen dienen of dat ze besmetting laten afnemen. Hierbij is tijdens het groeiseizoen geobserveerd of de planten tekenen van fusariumverwelking en -rot vertoonden. Net voor de oogst zijn grondmonsters genomen en is met de bio-TaqMan methode de besmetting met *F. oxysporum* f.sp. *cepae* bepaald. Na de oogst is in plantendelen gekeken of hierin met de bioTaQMan methode *F. oxysporum* f.sp. *cepae* aan te tonen was.

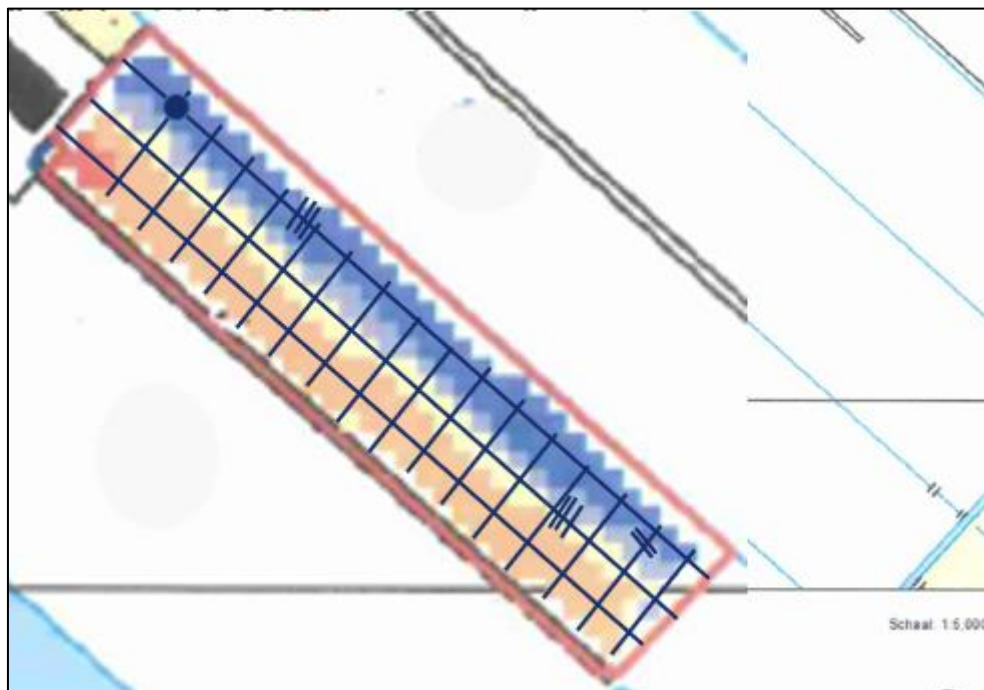
Voor de behandelingen met gewassen uit de rotatie is gekozen voor de volgende gewassen: aardappel, zomertarwe, mais, haver, Japanse haver, Engels raaigras, spinazie, bladrammenas en gele mosterd (voor zaaidichtheid zie Figuur 2.2B). Daarnaast zijn drie bakken braak toegevoegd aan de proef. Alle behandelingen zijn gerandomiseerd in het veld geplaatst, met uitzondering van de spinazie en de aardappelen met het oog op behandelingen tegen andere plagen en pathogenen tijdens de teelt (schema Figuur 2.2C).



Figuur 2.2. Data over de bakkenproef. A. foto van de opstelling in het veld. B. De 20 verschillende behandelingen. C. Randomisatie van de verschillende behandelingen over het veld. Voor de praktijk zijn alle uienvelden aan de rechterzijde van het veld geplaatst, aardappel en spinaziebakken zijn bij elkaar geplaatst in verband met de behandelingen van deze bakken tijdens het groeiseizoen.

2.10 Bemonstering in het veld

Een belangrijke vraag voor de bemonstering van een veld is hoe homogeen de pathogeen *F. oxysporum* f.sp. *cepae* verspreid is door het veld en hoeveel monsters er per hectare genomen moeten worden om een goed beeld te krijgen van het besmettingsniveau en om op grond daarvan voorspellingen te kunnen doen over de verwachte schade in gewas en in bewaring. Om hier een beter beeld van te krijgen is op 12 juli 2023 een veld van 100 x 400 meter met behoorlijke aantasting heel intensief bemonsterd en zijn alle grondmonsters afzonderlijk met de bio-TaqMan geanalyseerd (Figuur 2.3).



Figuur 2.3 Veldbemonsteringsschema van veld van circa 100x 400 meter. Op elk kruispunt van lijnen is een enkelvoudig monster gestoken met een grondboor van 0-20 cm diep (praktijkpercelen zijn doorgaans bemonsterd via een mengmonster). Op de plek van de dikke stip zijn monsters genomen op meerdere dieptes. Standaard afstand tussen monsters was 20 m in dit raster maar er zijn ook monsters op dichtere afstand van elkaar genomen.

3 Resultaten

In dit hoofdstuk staan de resultaten van de verschillende proeven beschreven. Hoe de proeven opgezet waren staat beschreven in het vorige hoofdstuk. Alle conclusies staan in het volgende hoofdstuk bij elkaar. Per paragraaf en per beschreven proef staat een korte samenvatting van de resultaten in enkele cursief gedrukte regels aan het begin van de paragraaf.

3.1 Analyse pathogeniteit uien isolaten

Fusarium oxysporum f.sp. cepae geeft in de biotoetsen het snelst en de zwaarste aantasting van de uienbollen (60-85%). Andere Fusarium soorten zoals isolaten van F. oxyporum, F. solani, F. proliferatum en F. redolens gaven niet tot nauwelijks aantasting. Van alle uit uien-geïsoleerde pathogenen is Fusarium oxysporum f.sp. cepae de meest voorkomende.

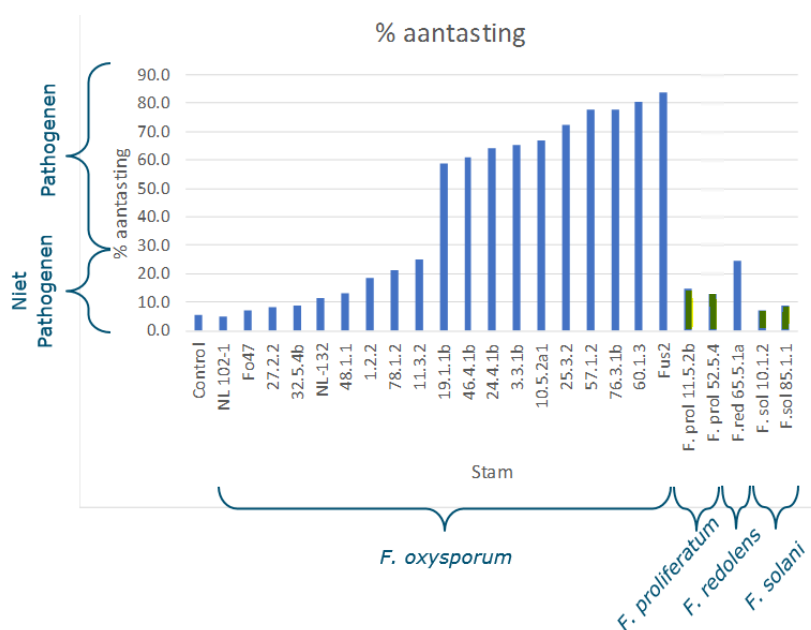
In de periode 2017-2018 zijn circa tweehonderd *Fusarium* isolaten verzameld afkomstig van uien met symptomen van Fusarium rot. Met PCR testen zijn deze gescreend op de aanwezigheid van een aantal genen die door Taylor *et al* (2016) aangemerkt zijn als belangrijk voor de pathogeniteit op ui. *F. oxysporum* Isolaten met verschillende sets van virulentie-genen of zonder de bekende genen zijn getest met een biotoets op hele uienbollen (Figuur 3.1). De mate van aantasting van de uienbollen bleek een goede maat te zijn om pathogeniteit te kunnen meten en is ook een maat voor de aantasting in de plant zelf (Taylor *et al.*, 2016). De testen lieten zien dat er op rottende ui zowel primaire pathogene als niet-pathogene, meeliftende *Fusarium*-isolaten voorkomen.



Figuur 3.1: 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 achtergrondaantasting 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 en collega's. Uit het latere *whole genome sequence* werk bleekt dit deels omdat sommige genen niet altijd aanwezig zijn en deels door variaties in de sequenties waardoor de genen niet altijd gedetecteerd kunnen worden.

Geteste *F. oxysporum* zonder de virulentiegenen, maar ook verzamelde *F. solani*, *F. proliferatum* en *F. redolens* isolaten gaven in deze biotoetsen op pathogeniciteit slechts een lage (tot maximaal 30%) aantasting van de bol te zien. De gemeten aantasting is nooit 0% omdat de uienbollen niet geheel steriel zijn en altijd iets achtergrond bacteriën en schimmels kunnen bevatten.



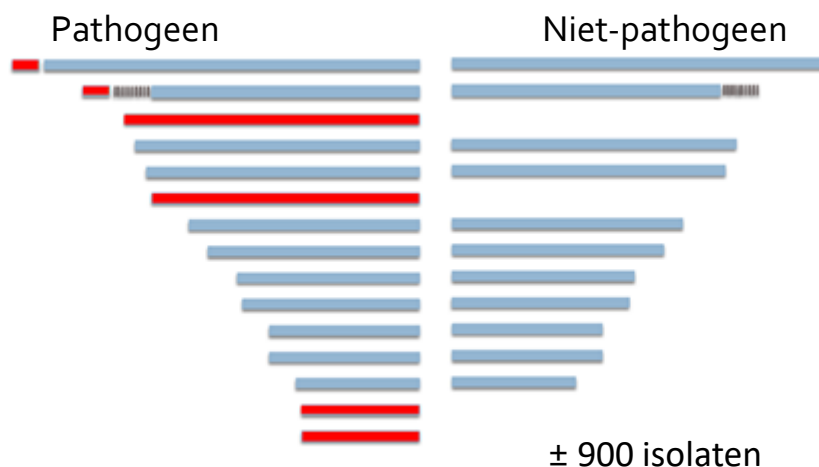
Figuur 3.2 Fusarium biotoets op ui: Gemeten aantasting van uienbollen in de biotoets is een maat voor pathogeniteit van de isolaten.

3.2 Bioinformatica

Vergelijking van ruim 900 *Fusarium*-genomen van verschillende waardplanten laat zien dat zeven genen/allelen specifiek zijn voor de uienpathogeen en niet voorkomen in pathogenen van andere waardplanten.

De bioinformatica vergelijkingen tussen de genomen van pathogene 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 in alle *Fusarium oxysporum* stammen voorkomen. Dit zijn de zogenaamde huishoud-genen die de schimmel nodig heeft voor zijn basismetabolisme 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 voor verschillende waardplanten voorkomen.



Figuur 3.3. Schematische vergelijking tussen het genoom van een pathogene *F. oxysporum* 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, met daarop verschillende genen betrokken bij virulentie, blauw = basis genoom met genen aanwezig in alle *F. oxysporum* stammen.

Er blijkt een groep van zeven genen, die specifiek zijn voor de pathogene *F. oxysporum* isolaten op ui en die waarschijnlijk een rol spelen bij de infectie van de ui (Tabel 1). Deze genen komen voor in alle Nederlandse isolaten, maar ook in de 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 genen behoren tot de SIX effector genen-klasse. Dit zijn kleine moleculen die uitgescheiden worden in de plant. Eén van die 3 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 codeert voor een tijdens de infectie in de plant uitgescheiden eiwit.

Tabel 3.1. Genen of vormen van genen (allelen) specifiek betrokken bij de pathogeniteit van *Fusarium* op ui. Vetgedrukt de genen waarop uiteindelijk de detectiemethode gebaseerd is.

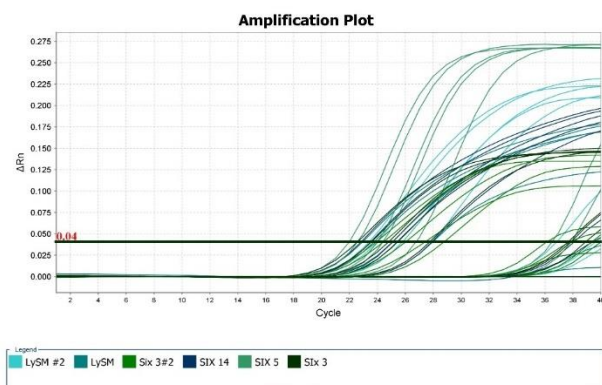
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i>	
Gen-code in analyse	Functie
Cand13067	<i>Six3 effector gen</i>
Cand13073	Onbekende functie
Cand13098/19038	<i>Six5 effector gen</i>
Cand13102	<i>Six14 effector gen</i>
Cand13103	Onbekende functie
Cand13111	Onbekende functie
Cand40478	<i>lysM effector gen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

3.3 Ontwikkeling diagnostische toets

Er is een kwantitatieve TaqMan ontwikkeld voor *Fusarium oxysporum f. sp. cepae* met primers en probes op twee van de genen/allelen specifiek voor ui. Om ook in gronden kwantitatief te kunnen meten is een kweekstap tussengevoegd op selectief medium voor *Fusarium*.

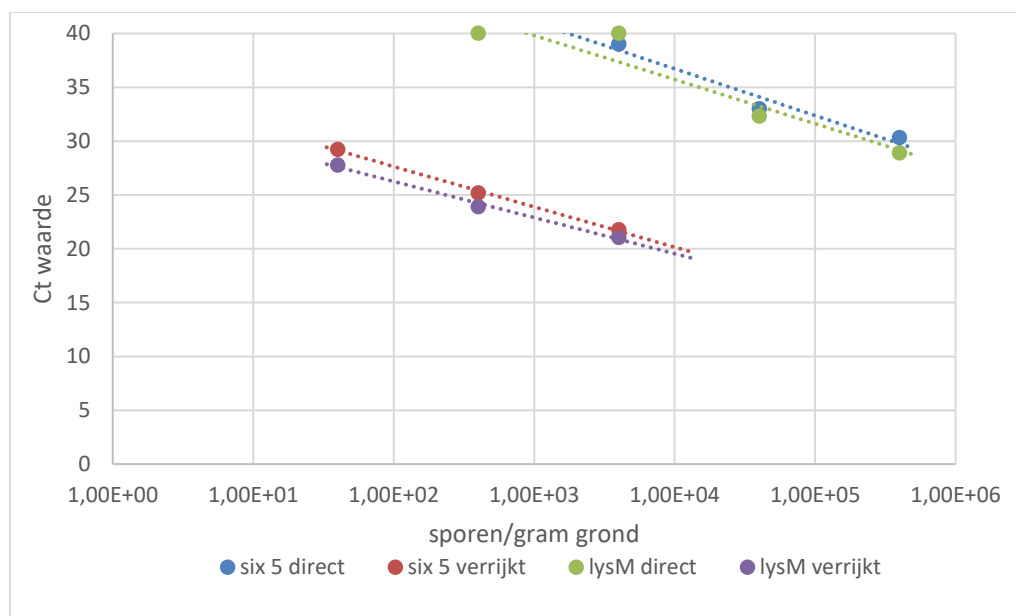
Met de gegevens uit onderdeel 3.2 zijn 7 genen/varianten van genen (ook wel allelen genoemd) geïdentificeerd die uniek zijn voor *Fusarium oxysporum f. sp. cepae*, het belangrijkste *Fusarium* pathogeen op ui in Nederland. Van deze genen en genen met enige sequentiegelijkenis met niet-ui pathogenen zijn vervolgens sequentie alignments gemaakt waarbij de verschillen tot op de nucleotide inzichtelijk gemaakt worden. Als eerste test zijn vervolgens 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.

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 *Fusarium* ui-pathogenen van verschillende herkomst als naar exclusiviteit (ofwel geen signaal bij niet-pathogenen). De test van het six5 gen is bijvoorbeeld getest op isolaten van orchidee en tomaat, die andere allelen van six5 bevatten, waarop ze geen signaal gaven. Alle sets gaven bij de testen een totale in- en exclusiviteit in de testen, wat betekent dat ze specifiek zijn.



Figuur 3.4. Geschiktheid van primer / probe combinaties voor de detectie van *F. oxysporum f.sp. cepae* specifieke genen. Naarmate de curve eerder oploopt is de primer probe combinatie gevoeliger. Een van de sets voor detectie van *LysM* en een voor het *Six5* gen waren hierbij de beste.

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, dus het eerst een signaal afgeven (Figuur 3.4). 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* zijn in 2021 verder getest om te bepalen hoe sensitief ze zijn (welke hoeveelheden ze detecteren; vanaf enkele sporen per gram materiaal na verrijking), 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). Een voorbeeld van de Taqman voor en na de verrijkingsstap staat in Figuur 3.5.



Figuur 3.5. (Bio)-Taqman van kleigronden met een bekende hoeveelheid sporen getest met en zonder verrijkingsstap, voor beide specifieke genen van *F. oxysporum* f.sp. *cepae*. De verrijkingsstap maakt de detectie ruim 1000x gevoeliger

In 2021 zijn er verschillende testen uitgevoerd om de beste interne extractie en amplificatiecontroles te selecteren. Deze controles kunnen worden toegevoegd in de reactiemix en/of het monster om vals negatieve monsters te beperken:

Schimmelisolaat: In het geval dat men van een geïsoleerd Schimmelisolaat wil testen of het *F. oxysporum* f.sp. *cepae* betreft, kan als controle een reactie met de fungiquant primers en probes worden uitgevoerd (Liu *et al.* 2012). Deze primers reageren met een groot deel van de bekende schimmels. Een positieve reactie met zowel de fungiquant primers en probe als met de *F. oxysporum* f.sp. *cepae* primers en probes geeft aan dat er zeker *F. oxysporum* f.sp. *cepae* aanwezig is. Alleen signaal met de fungiquant primers/probe geeft aan dat er geen detecteerbare hoeveelheid *F. oxysporum* f.sp. *cepae* aanwezig is, maar wel een andere schimmel. Afwezigheid van signaal met de fungiquant geeft aan dat de extractie/reactie niet gewerkt heeft of dat er geen schimmel aanwezig is of dat er sprake is van een ander micro-organisme.

Plantmateriaal: Als interne controle voor extractie uit plantmateriaal kan een op het *cox*-gen gebaseerde primer/probe set worden toegevoegd als extractie & amplificatiecontrole (Suarez *et al.*, 2005). Het *cox*-gen is een essentieel gen in de mitochondriën van planten en is aanwezig in veel verschillende plantensoorten. Een positief signaal van *cox*-gen en *F. oxysporum* f.sp. *cepae* primers & probes geeft aan dat *F. oxysporum* f.sp. *cepae* in het monster aanwezig was. Enkel een signaal van het *cox*-gen geeft aan dat *F. oxysporum* f.sp. *cepae* niet of beneden de detectielimiet aanwezig is. Geen signaal van het *cox*-gen geeft aan dat de reactie en/of de extractie mislukt zijn. Voor uienmaterialen gaf tijdens de tests in ons lab de Qiagen Gentre Puregene kit de betere resultaten dan andere commercieel verkrijgbare kits.

Grondmonsters: omdat grond heel wisselend van samenstelling is, wordt als interne extractie-en amplificatie controle bij voorkeur een bekende hoeveelheid van een andere schimmel toegevoegd. In dit geval voegen we een sporensuspensie van de schimmel *Trichoderma atroviride* toe (voor verrijkte monsters pas na de verrijkingsstap die specifiek is voor *Fusarium*). Het gen wat we vervolgens uit deze schimmel detecteren is het *tga3*-gen. Een positief signaal van de controle en van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* primers & probes, betekent dan positieve detectie van het pathogeen. Enkel een signaal van de controle geeft aan dat de pathogeen niet of onder de detectielimiet aanwezig is. Geen signaal van de interne controle geeft aan dat de reactie en/of de extractie mislukt zijn (*cut-off* waarde 35). Voor grond geeft tot nog toe de Qiagen MagAttract Powersoil kit de beste resultaten.

In grond, maar ook in de plant aan het begin van een infectie, kan de hoeveelheid *F. oxysporum* f.sp. *cepae* lager zijn dan de detectielimiet (voor onverrijkte grond tussen de 10^3 en 10^4 sporen per gram zand- of kleigrond). Door een 72-uur kweekstap in te voegen waarin 2.5 gram (grond) of 1 ml (plantextract) geïncubeerd wordt in 9 ml vloeibaar Komada medium, semi-selectief voor *Fusarium* schimmels, wordt deze detectie limiet vergroot tot enkele sporen per gram monster ongeacht de grondsoort, terwijl kwantitatief meten mogelijk blijft. Bij dergelijke metingen wordt ook een verdunningsreeks van sporen meegenomen als ijkreeks. Een dergelijke kweekstap tezamen met een Taqman, noemen we Bio-TaqMan.

3.4 Verzamelen en analyse praktijkmonsters

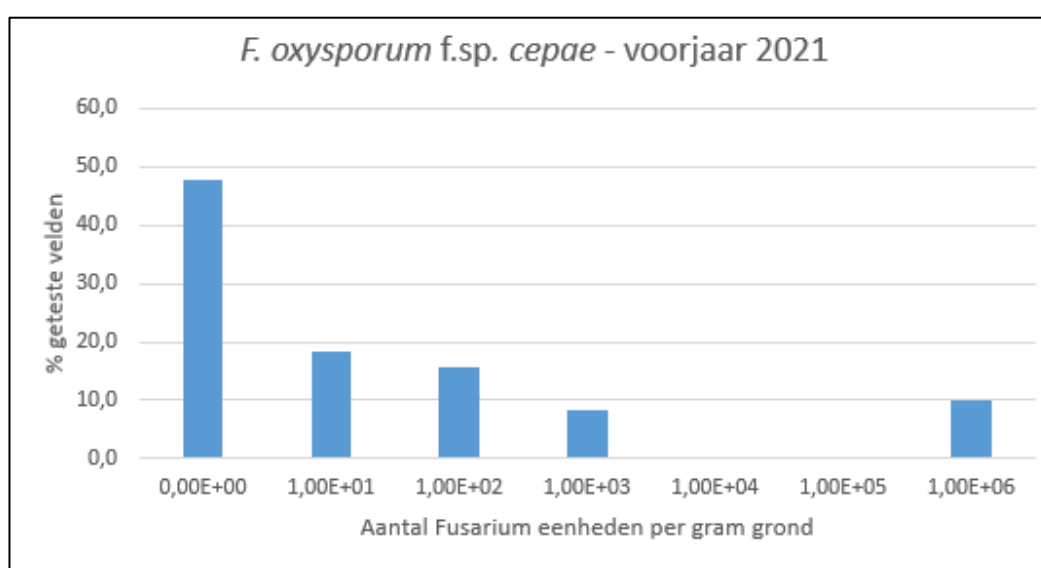
Meer dan 90% van de uienmonsters heeft een besmetting met F. oxysporum f.sp. cepae. Als ui geteeld wordt neemt de hoeveelheid pathogeen in het veld tussen de 5 en 50x toe in het veld. Hoe meer Fusarium gedetecteerd in de bodem, des te groter de kans op uitval in het veld en in de bewaring.

De analyses met de primer/probe sets op het *six5* en het *LysM* gen van 25 ingezonden **rotte uien** van verschillende locaties van verschillende bedrijven laat bij de eerste screening in 2020 zien dat in 92% (23) van de uien *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* aangetoond kon worden. Dit is een hoger percentage aan *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* dan de 50% die 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 pathogeen kunnen verdringen. Door het gebruik van detectie op de pathogeniteit-genen weten we ook direct dat deze pathogene *Fusarium* aanwezig is of is geweest.

In de gronden van najaar 2020 waarvan door de telers aangegeven was dat de problemen op het veld met *Fusarium* te zien waren, kon vaak in de onverdunde test al direct *Fusarium* aangetoond worden, wat aangeeft dat de concentratie sporen in de grond hier uitzonderlijk hoog is, meer dan 1.000 à 10.000 sporen / gram grond

(hoeveelheden bepaald in vergelijking met een ijkreeks met bekende hoeveelheden sporen). Gebruik van de bio-TaqMan naast de directe TaqMan, laat zien dat het hier om levend materiaal gaat.

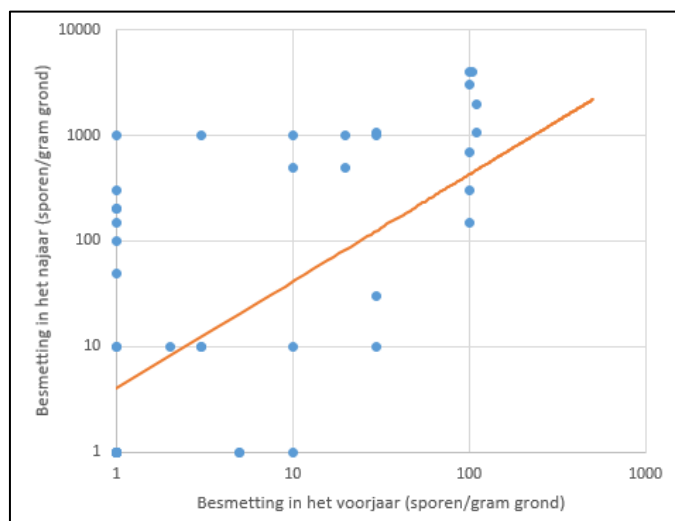
Omdat we een beter idee willen krijgen van schadedrempels in de praktijk, is in 2021 de vraag uitgegaan naar telers voor het aanleveren van grondmonsters waar in dat groeiseizoen uien kwamen te staan (Voorjaarsmonsters). Diezelfde telers zijn in het najaar opnieuw benaderd met de vraag om grondmonsters en om een inschatting van de schade door Fusarium in veld en later in de opslag door te geven (najaarsmonsters). Daarnaast zijn er verschillende proefvelden bemonsterd. In het voorjaar heeft dit 84 grondmonsters opgeleverd, waarvan er in het najaar van 50 velden een tweede monster ontvangen is. Bij navraag was de belangrijkste reden van telers en buitendienstmedewerkers om geen tweede monster in te leveren was dat er in hun ogen te weinig problemen zichtbaar waren.



Figuur 3.6. Relatieve aantal bemonsterde velden waar geen tot veel ($>10^6$ sporen/gram) grond aanwezig waren in de test in 2021.

In circa 47% van de bemonsterde velden kon in het voorjaar geen Fusarium worden aangetoond met de Bio-TaqMan methode (Figuur 3.6). In 18% en 15% respectievelijk werd tot 10 sporen of tussen de 10 en 100 sporen per gram grond waargenomen (bepaald in vergelijking met een ijkreeks met bekende hoeveelheden toegevoegde sporen). In een 10% van de monsters (inclusief verschillende bekende proefvelden) werden grote hoeveelheden meer dan 10^5 sporen per gram grond aangetroffen. Volgens ongepubliceerd Engels onderzoek zijn hoeveelheden van 10^5 - 10^6 sporen per gram grond goed voor een uitval van circa 40% van alle uienplanten binnen een tijdsbestek van 3 maanden (John Clarkson, pers. comm.).

Uiteindelijk hebben we in 2021 en in 2022 gecombineerde voor- en najaarsmonsters kunnen analyseren. Er is een enorme spreiding te zien in hoeveel het pathogeen toeneemt in het veld tijdens een groeiseizoen. Dit varieert per jaar (mogelijk door weersinvloeden), maar mogelijk ook door veldgesteldheid en de gevoeligheid of tolerantie van de geteelde uiencultivar. De gemiddelde toename van het pathogeen ligt tussen de 5 en 50-voud, met lokaal sterke uitschieters (Bijvoorbeeld Figuur 3.7). Terugkoppeling van de geconstateerde problemen in het veld geeft aan dat bij hoge besmettingsdichtheden in de grond bij 10^3 of meer de kansen op uitval in het veld en een slecht bewaarbare oogst toenemen.



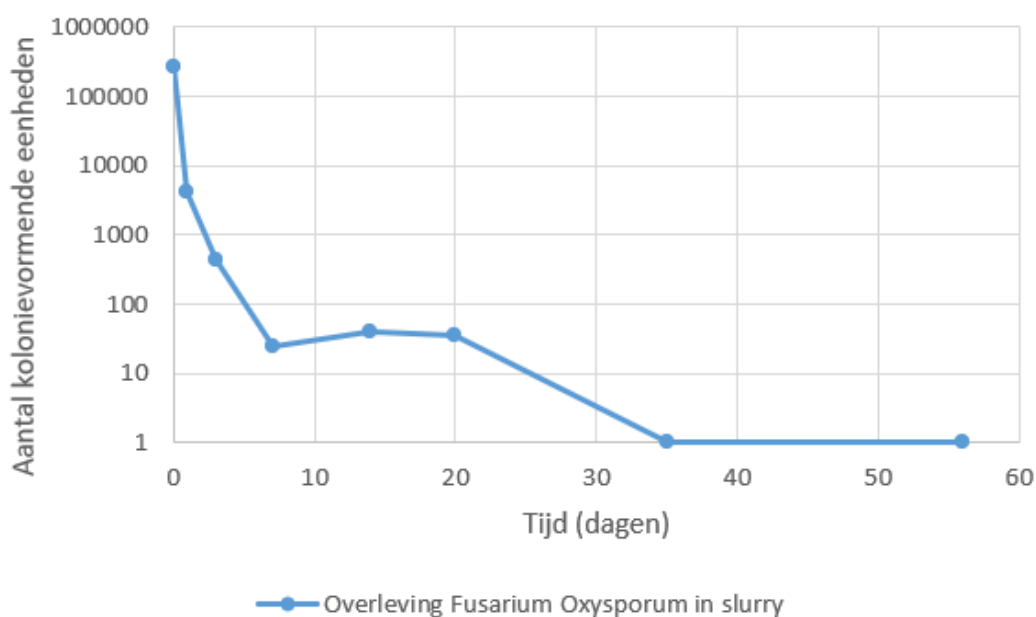
Figuur 3.7. Gemiddelde toename van het aantal sporen van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* in de grond tussen het begin en het einde van het groeiseizoen 2020 en trendlijn in de puntenwolk.

3.5 Overleving in de vergister

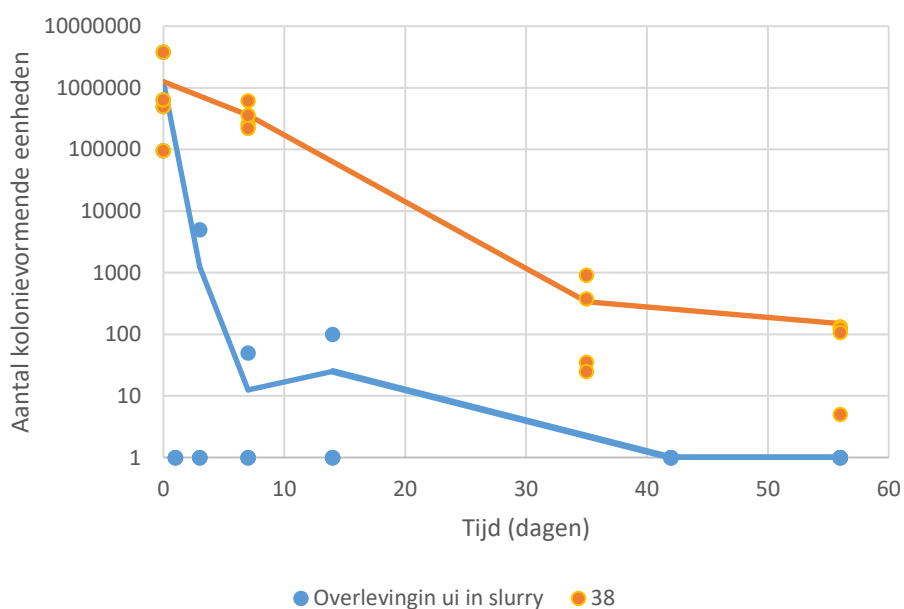
Een belangrijke vraag is welk rol reststromen kunnen spelen in de verspreiding van het *Fusarium* pathogeen. Daarom is gekeken naar overleving in een mesofiele vergister. Door de temperatuur, lagere zuurstofspanning en de zuurgraad neemt de hoeveelheid *F. oxysporum* af met een 99.99% afname in de eerste week, maar ook na 3-5 weken kan er nog levend materiaal worden aangetroffen. Met een gemiddelde verblijftijd in een vergister zo rond de 15 dagen, betekent dit dat met hoge besmettingsgraden er levend pathogenen in het effluent kan zitten.

Binnen Uireka (1) zijn 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* f.sp. *cepae*

De resultaten van Uireka 2 lieten zien dat in de digestaat een snelle afname van het aantal levensvatbare sporen plaatsvond; zo'n 99.99% afname in de eerste week (Figuur 3.8). Echter na minstens 21 dagen waren 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, vond er een snelle afdoding plaats van circa 99.99% in de eerste week (Figuur 3.9). Dit afsterven in de vergister (op ui en in slurry) vond sneller plaats dan bij sporen in uien die opgeslagen werden 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 3.8. Overleving van *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* in het digestaat (slurry) in de vergister. In de eerste dagen vindt een snelle afdoding plaats van losse sporen, maar na drie weken zijn er nog steeds levende sporen aanwezig (99.99% afdoding). Na 5 weken werden er geen levende sporen meer aangetoond.



Figuur 3.9. Overleving van *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* in hele uien toegevoegd aan de vergister (blauw) en uien die bewaard werden bij 38°C in een incubator. In de eerste dagen vond in de vergister een snelle afdoding 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). Tussen 35 tot 56 dagen zijn de uien helemaal verteerd in de vergister en kon er geen *Fo. cepae* meer aangetoond worden.

3.6 Overleving tijdens compostering

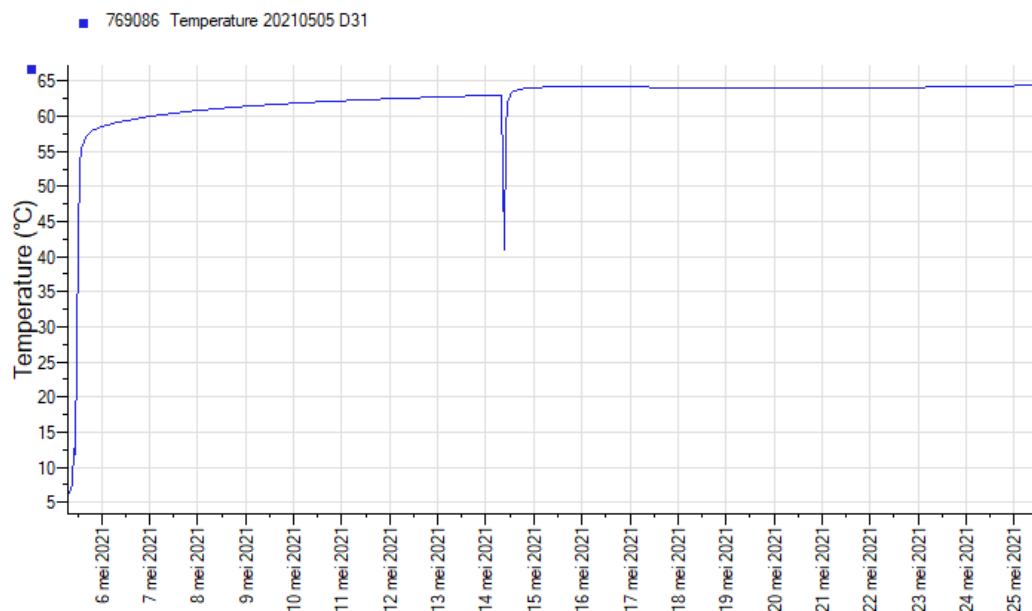
*De overlevingsexperimenten in compost zijn bij een commercieel compostbedrijf uitgevoerd. In de eerste compostronde van 9 dagen was er een afdoding van 99.99% te zien. Na de tweede composteringsronde werden er geen levende sporen (conidiosporen én chlamydosporen) meer aangetroffen van *F. oxysporum f.sp. cepae*, *F. solani* en *F. proliferatum*.*

De overlevingsexperimenten in compost zijn door alle Covid-19 perikelen niet in 2020 uitgevoerd maar moesten worden uitgesteld tot voorjaar 2021. De experimenten werden uitgevoerd onder praktijkomstandigheden uitgevoerd bij een commercieel compostbedrijf. Alle monsters met schimmelmateriaal zijn in speciale punten ingegraven in de composthoop (Figuur 3.10). Tijdens het composteren zijn in een deel van de punters ook dataloggers mee ingegraven, de temperatuur is tijdens het grootste deel van een composteringscyclus tussen de circa 60 en 65°C (Figuur 3.11).



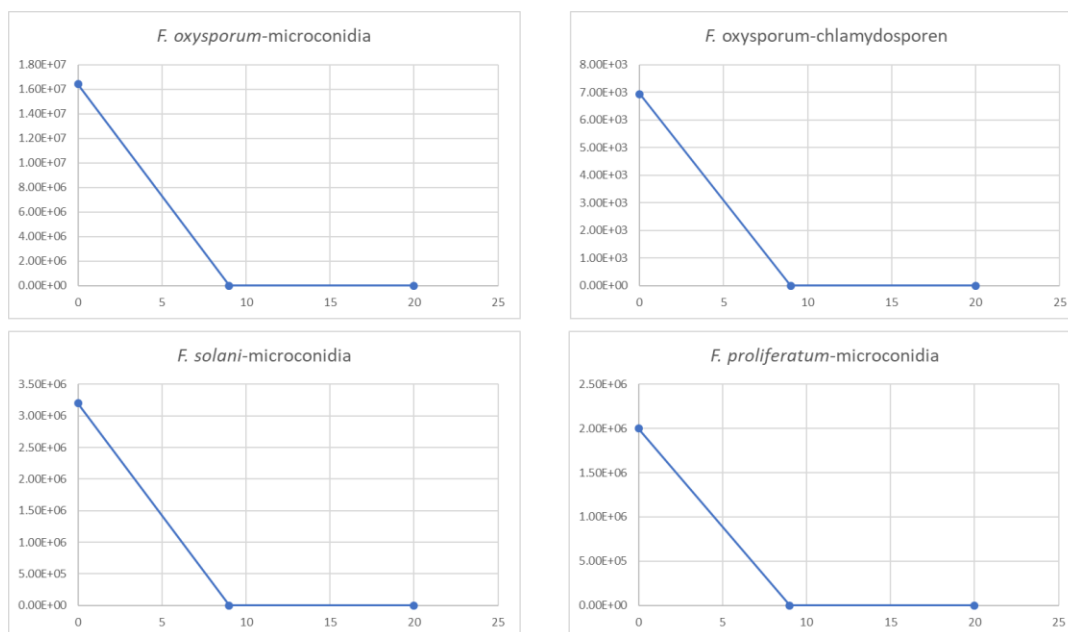
Figuur 3.10. Omstandigheden tijdens de compostering en uitvoering van de proef. Linksboven de circa 30 cm lange punten waarin de monsters zijn ingegraven. Rechtsboven hittevorming tijdens het composteren. Links-beneden de punten zoals ze in de verse composthoop worden gestopt. Rechts-beneden de punten worden met een graafmachine en speciale houder op circa 1 meter diepte ingegraven en er weer uitgetild.

20210505 D31

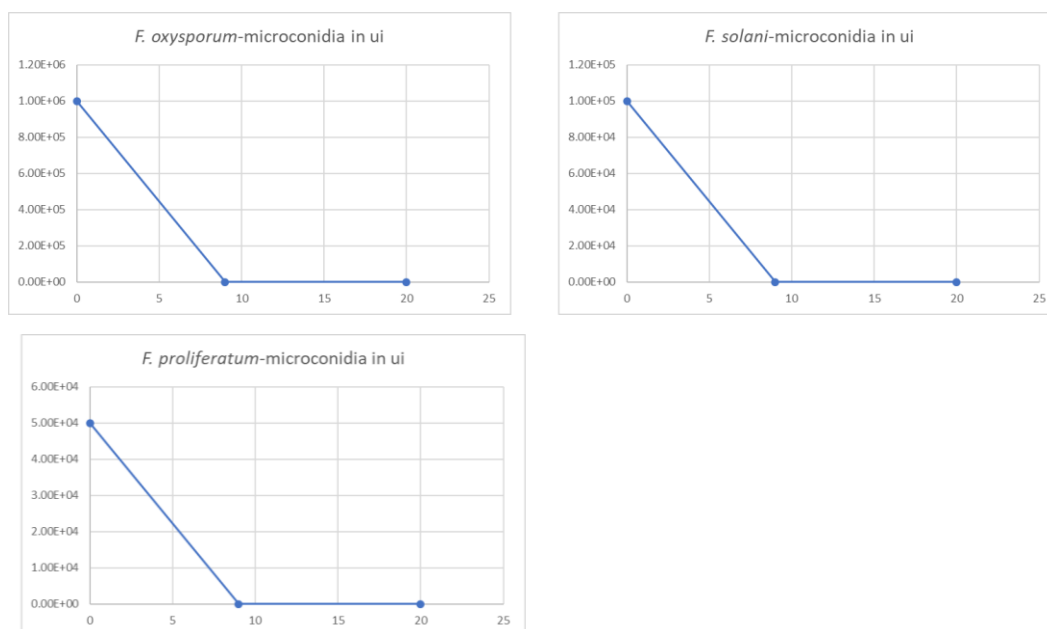


Figuur 3.11. Temperatuur in de composthoop tijdens de twee cycli waarin de *Fusarium* monsters in de composthoop zaten. De dip in de temperatuur werd veroorzaakt door het omzetten van de composthoop waarvoor de punten uit de hoop moesten worden gehaald en daarna weer terug geplaatst.

In de eerste fase van de compostering van 9 dagen vond er een afdoding plaats van meer dan 99.99% van alle sporen zowel in chlamydosporen als in conidiosporen als ook in sporen van alle drie verschillende geteste soorten (*F. oxysporum* f.sp. *cepae*, *F. solani* en *F. proliferatum*) die gemengd waren met ruwe compost (Figuur 3.12). Na een tweede composteringsronde werd geen levend materiaal meer aangetroffen (na uitgroeien en bio-TaqMan). Ook in het geval van microconidiën van de drie verschillende *Fusarium* soorten gecomposteerd in hele uien werd een zelfde afdoding waargenomen met meer dan 99.99% afdoding na de eerste composteringsperiode en geen aantoonbaar levend materiaal na een tweede composteringsronde (Figuur 3.13)



Figuur 3.12. Overleving van microconidiën en chlamydosporen van *F. oxysporum* f.sp. *cepa* (boven links en rechts) microconidiën van *F. solani* en *F. proliferatum* (onder links en rechts) direct gemengd in compost materiaal tijdens compostering (tijd in dagen).



Figuur 3.13. Overleving van microconidiën van *F. oxysporum* f.sp. *cepa*, *F. solani* en *F. proliferatum* in hele uien gemengd in het compostmengsel (tijd in dagen). Op de Y-as het aantal levende sporen, op de X-as de verstreken tijd in dagen.

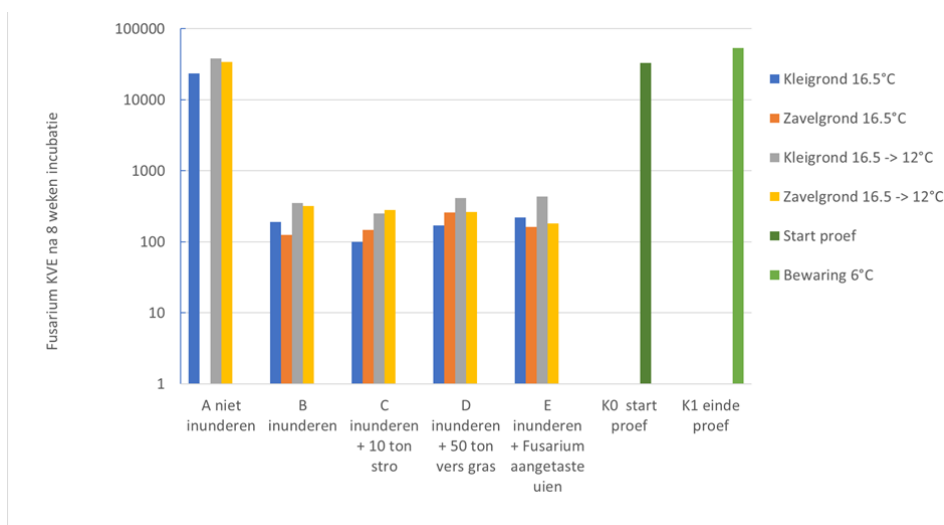
3.7 Overleving tijdens inundatie

*Een simulatie van inundatie heeft in 2021 plaats gevonden onder gecontroleerde omstandigheden. Hierbij werd na 8 weken een ongeveer 100-voudige afname van *Fusarium* waargenomen, na 14 weken was er geen verdere afdoding gevonden. In 2022 zijn er monsters met *F. oxysporum* f.sp. *cepae* ingegraven in praktijkpercelen die daarna minstens 4 maanden zijn geïnundeerd. Hier werd onder conidiosporen (de sporen die voor verspreiding zorgen tijdens een uitbraak) een totale afdoding waargenomen en onder chlamydosporen (de belangrijkste overlevingsstructuren in de bodem) een 5000 à 10.000x (99.99%) afdoding.*

Een simulatie van de effecten van inundatie op de overleving van *Fusarium* als sporen of in plantaardig materiaal in de grond is uitgevoerd in het kader van een afstudeeropdracht. De simulatie vond plaats in emmers (Figuur 3.14) bij een constante temperatuur van 16.5 °C of een regime waarbij de temperatuur daalde van 16.5 naar 12 °C. *Fusarium* is op verschillende manieren aan de grond toegevoegd direct als sporen of in plantaardig materiaal. Verschillende soorten grond zijn gebruikt als ook verschillende toevoegingen aan organisch materiaal. De proef is zowel na 8 weken als na 14 weken inundatie beoordeeld. Ondanks alle behandelingen waren de uitkomsten niet verschillend voor wat betreft de gronden die onder water hadden gestaan: Na 8 weken werd er een ongeveer 100-voudige afname aan *Fusarium* waargenomen (Figuur 3.15). Langer inunderen had geen verder afsterven tot gevolg (voor het volledige verslag zie Uireka rapportage 2022-01; Topper & Evenhuis, 2022).



Figuur 3.14. De emmers met verschillende grondsoorten en onder te werken organisch materiaal. Als simulatie voor de overleving zijn er onder andere natuurlijk *Fusarium* besmette uien gebruikt (rechts).



Figuur 3.15. Overleving van *Fusarium* in de grond na inundatie van verschillende soorten grond met en zonder toevoeging van extra organisch materiaal (na 8 weken inundatie). Let op de y-as is een logaritmische schaal gebruikt voor het aantal kolonievormende eenheden.

In 2022 zijn op twee praktijkpercelen monsters met kleigrond ingegraven met een bekende starthoeveelheid conidiosporen (de sporen die voor verspreiding zorgen tijdens een uitbraak) of chlamydosporen (de belangrijkste overlevingsstructuren in de bodem) van *F. oxysporum* f.sp. *cepae*. Deze monsters waren verpakt in zakjes met een zeer kleine gaaswijdte waardoor water en zuurstof hier wel in door kunnen dringen maar de sporen er niet uitkunnen. Deze zakjes zijn ingegraven in een emmer met een doorlatende bodem in het veld en waren met touwtjes vastgeknoopt aan de emmer zodat ze hier niet uitgespoeld konden worden. De emmers zijn ingegraven naast emmers met overlevingsexperimenten met plaaginsecten.

Na de inundatieperiode zijn de emmers uitgegraven en de monsters beoordeeld met de bio-TaqMan methode op de overleving van de verschillende sporen. In één perceel was het veld tussentijds droog komen te liggen en hadden vogels in de grond gewroet. Hier konden niet alle zakjes worden teruggevonden, waarschijnlijk losgewoeld door de vogels die in en rond emmers op zoek waren naar voedsel.

Van de conidiosporen, konden we van de uitgangconcentraties van tussen de 10^5 - 10^6 aan verse sporen per gram grond, konden we na de inundatieperiodes van 4 à 4,5 maand geen sporen terugvinden. De afdoding hier is dus zeker een 10^5 - 10^6 maal.

Bij de sterkere chlamydosporen vonden we een 5.000-10.000 x afname over de inundatieperiode. Van de chlamydosporen waren dus nog steeds een (klein) deel van de sporen in leven (in 5 van de 6 teruggevonden zakjes van de 8 originele zakjes werd er nog levend materiaal aangetoond).

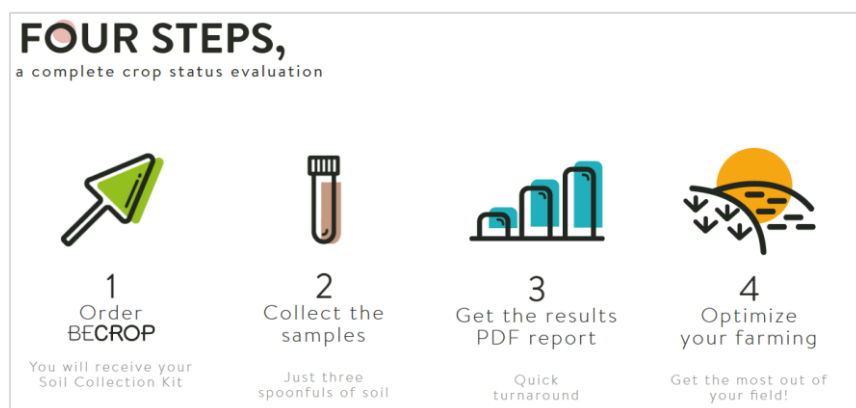
Ter controle zijn er ook zakjes met verschillende sporenmateriaal weggelegd in een klimaatcel om na te gaan of de afdoding wel door de omstandigheden tijdens de inundatie kwamen en niet algemeen door de tijd dat de sporen in de grond in zakjes hadden gezeten. In deze monsters was er zelfs onder de conidiosporen geen afdoding waar te nemen, evenmin onder chlamydosporen.

3.8 Microbioom analyses

*Microboom-analyses in 2020 en 2021 lieten zien dat de biodiversiteit van de bodem voor wat betreft bacteriën en schimmels over het algemeen als behoorlijk hoog beoordeeld werd. Dergelijke analyses maken gebruik van sequenties die in alle bacteriën en schimmels en kunnen daarom geen *F. oxysporum f.sp. cepae* detecteren.*

*In 2020 waren in de circa 30 geanalyseerde gronden een paar groepen micro-organismen met een negatieve correlatie met de geobserveerde *F. oxysporum f.sp. cepae* wat zou kunnen duiden op mogelijk antagonisme tegen *Fusarium*. Na het toevoegen van data van extra gronden in 2021 waren deze verbanden er niet meer. De in het eerste jaar geïdentificeerde groepen micro-organismen waren mogelijk het resultaat van een beperkte data set of de variatie over jaren en gronden is te groot om duidelijke antagonisten aan te wijzen die onder alle omstandigheden zullen werken. Statistische analyses van microbioom en andere data wijzen wel de bio-TaqMan data aan als de beste voorspeller van problemen op het land en in de bewaring van uien.*

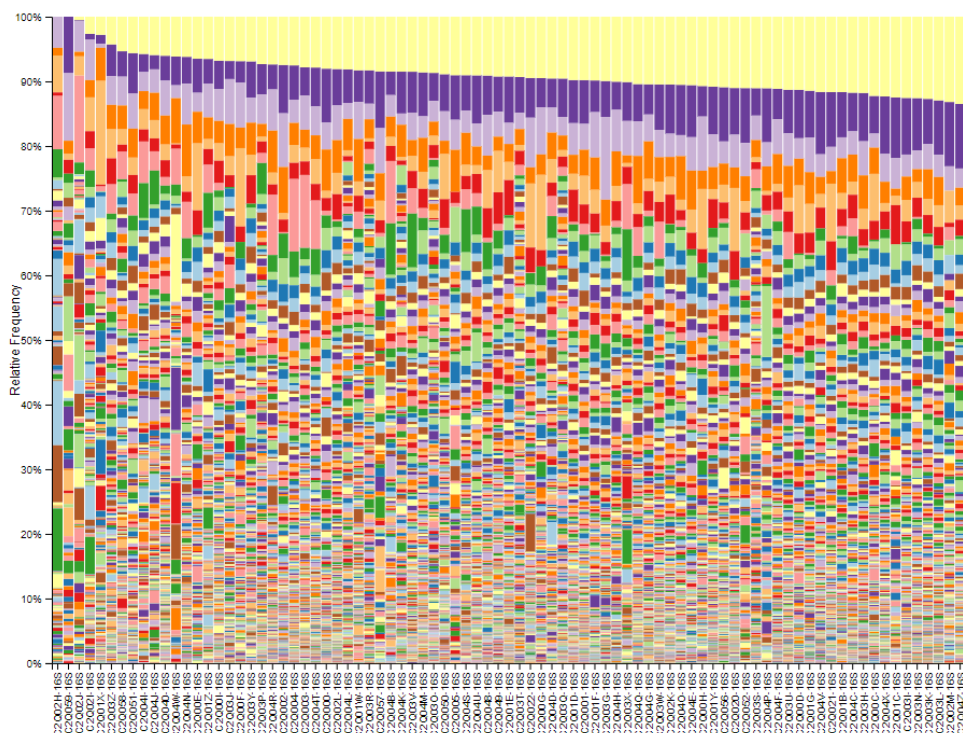
Geen officieel onderdeel van het oorspronkelijke werkplan, maar in 2020 is WUR met de firma Biome Makers een samenwerking gestart. Via EU-project Fields4Ever konden aan een set gronden kosteloos microbioom analyses gedaan worden. Daarbij kregen we als groep de uitgewerkte 'BeCROP' gegevens zoals Biome Makers deze aanbiedt aan particulieren met informatie over onder andere biodiversiteit van de bodem (Figuur 3.16), maar ook de ruwe sequentiedata van aanwezige bacteriën en schimmels in de grondmonsters.



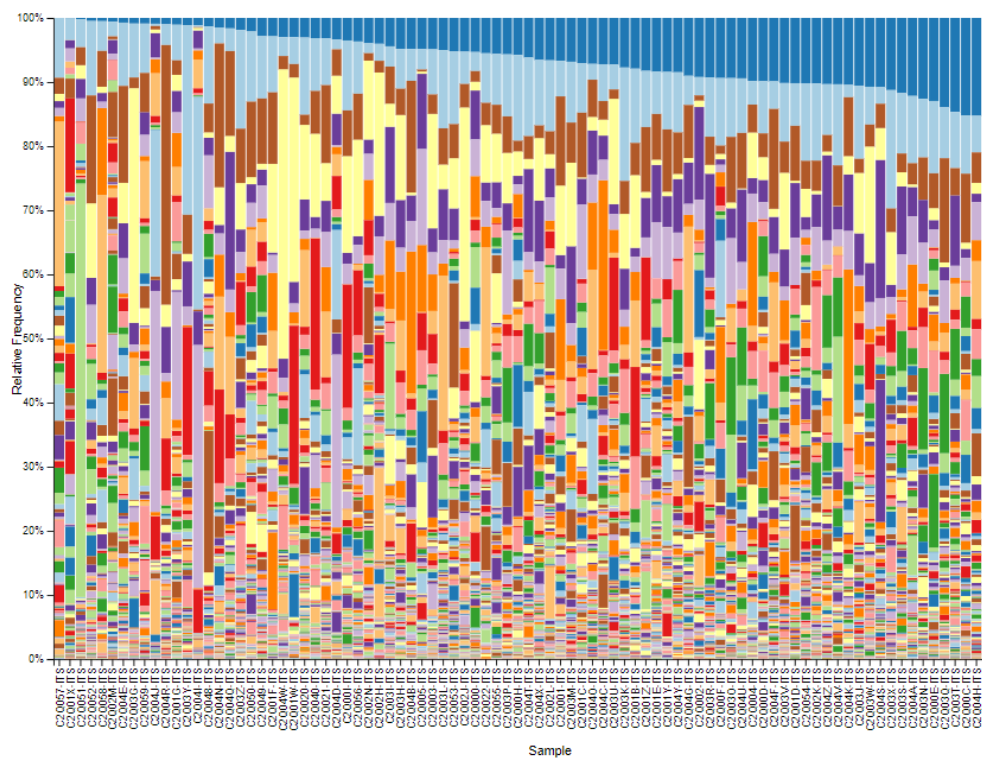
Figuur 3.16. De procedure van de BeCrop analyse: (1) Via Biomemakers zijn kits te bestellen waarmee (2) grondmonsters te nemen zijn. Deze monsters zijn op te sturen naar de vestiging van het bedrijf in Spanje, waarna na circa 3 weken (3) een rapport met de analyse gegevens op te halen is op de website en naar eigen inzichten (4) te gebruiken zijn.

Van alle in het najaar 2020 verzamelde grondmonsters zijn in drievoud monsters opgestuurd naar Spanje waarna de BeCROP resultaten (Figuur 10) als ook sequentiedata van bacteriën en schimmels zijn ontvangen. Deze gegevens zijn door Luc van den Beld geanalyseerd in het kader van een MSC thesis aan de WUR. Omdat de replica's van de 2020 gronden een overeenkomend beeld gaven, zijn in 2021 zijn een aantal voor- en najaarsmonsters in enkelvoud geanalyseerd binnen de ruimte die er in de samenwerkingsovereenkomst was.

De biodiversiteit in de geanalyseerde gronden bleek werd inde BeCrop analyse geïdentificeerd als behoorlijk hoog en tussen de 500 en 900 groepen bacteriën en schimmels konden op grond van de sequenties worden geïdentificeerd tot op het niveau van genus (bacteriële diversiteit 2020 Figuur 3.17, Schimmeldiversiteit 2020 Figuur 3.19). Monsters uit een zelfde perceel waren over het algemeen vergelijkbaar qua samenstelling. Omdat de sequentiedata van de bacteriën en schimmels gebaseerd zijn op een klein, essentieel stuk van het ribosomale DNA, is de hoeveelheid variatie beperkt. Voor *Fusarium* betekent dit dat we niet alle soorten afzonderlijk kunnen onderscheiden, maar ook een *forma specialis cepae* niet van andere *formae speciales* kunnen onderscheiden (Figuur 3.18).

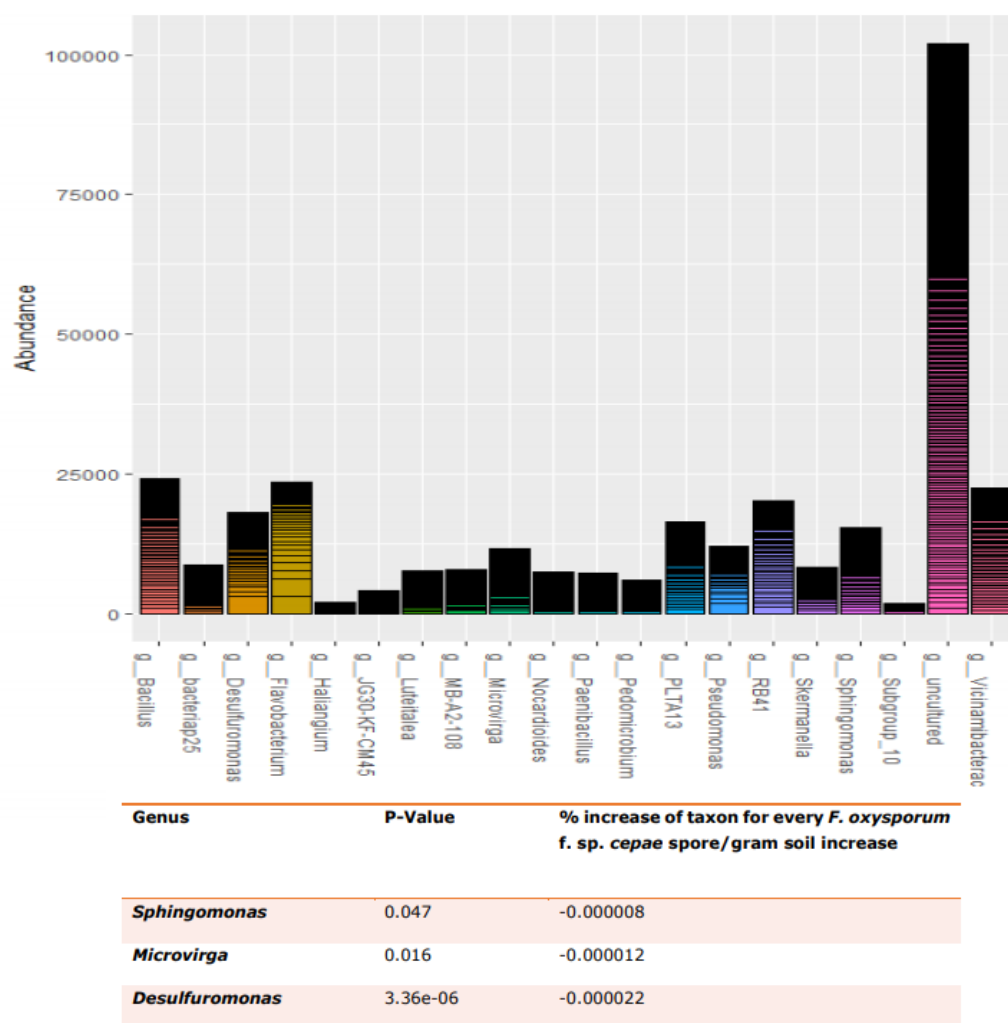


Figuur 3.17. Bacteriële diversiteit in alle 2020 monsters (Najaar). Elke kleur staat voor een bacterie genus.

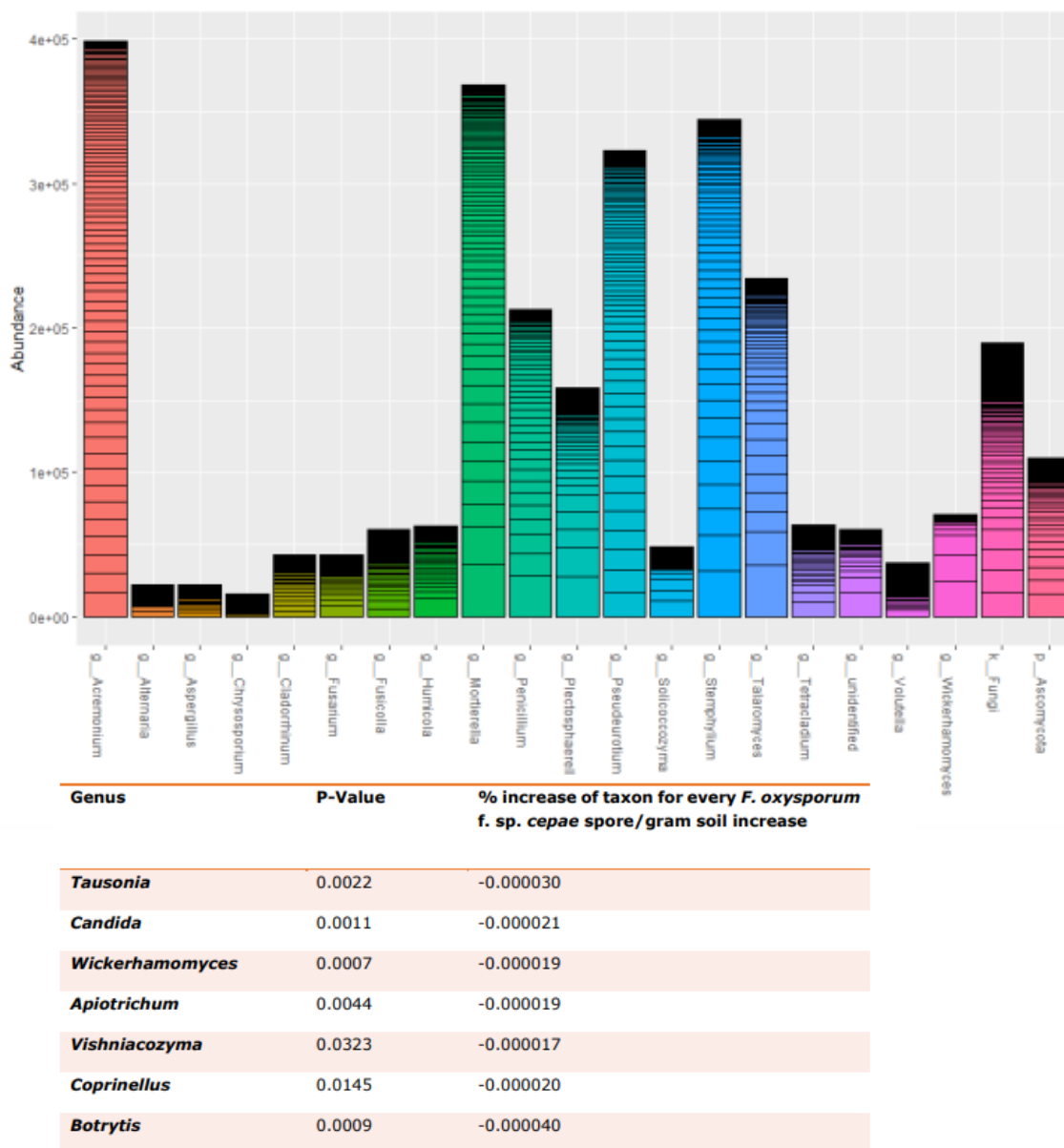


Figuur 3.18. Schimmel-diversiteit in alle 2020 monsters, de felrode balk in de kolommen zijn verschillende soorten van het genus *Fusarium* (Najaar).

Qua voorkomende bacterie-genera bleek in 2020 een drietal soorten een negatieve correlatie te hebben met *F. oxysporum* f.sp. *cepae*, dat wil zeggen dat als er minder van de een aanwezig was er meer van de ander was en andersom. Welk van de organismen daar de veroorzaker voor was, is op grond van deze data niet te zeggen (Figuur 3.19). In het geval van de schimmelgenera, bleken 7 genera een negatieve correlatie te hebben met *F. oxysporum* f.sp. *cepae*, waaronder een andere bekende plant pathogene schimmel, namelijk *Botrytis* (Figuur 3.20).

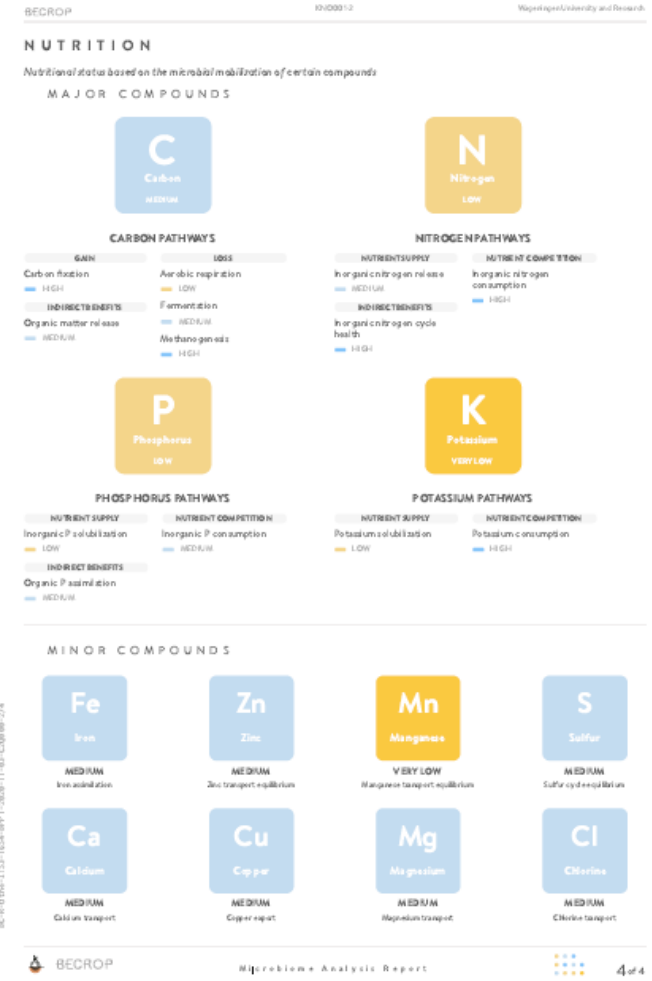
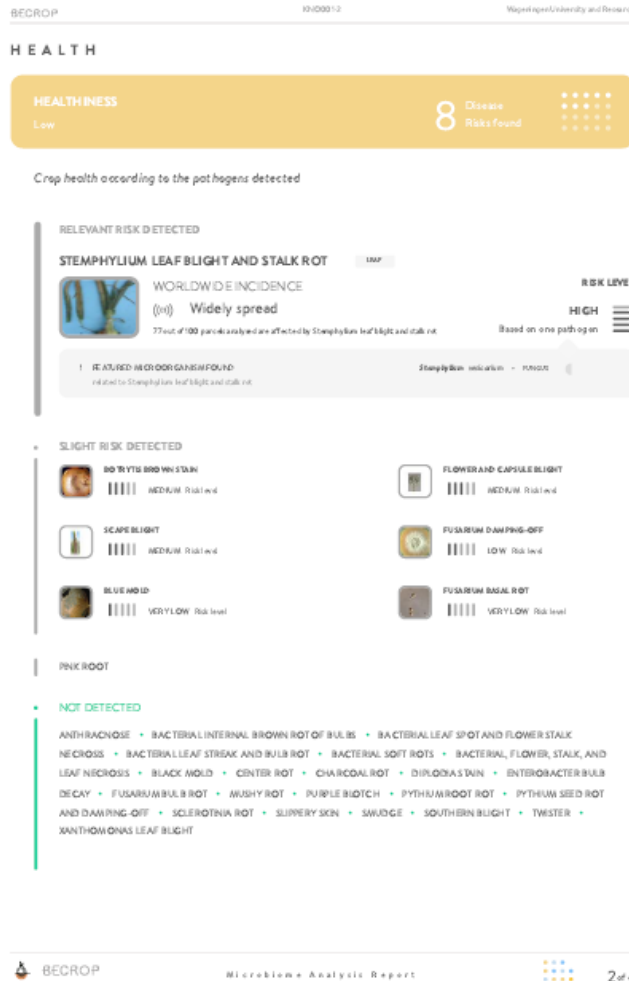
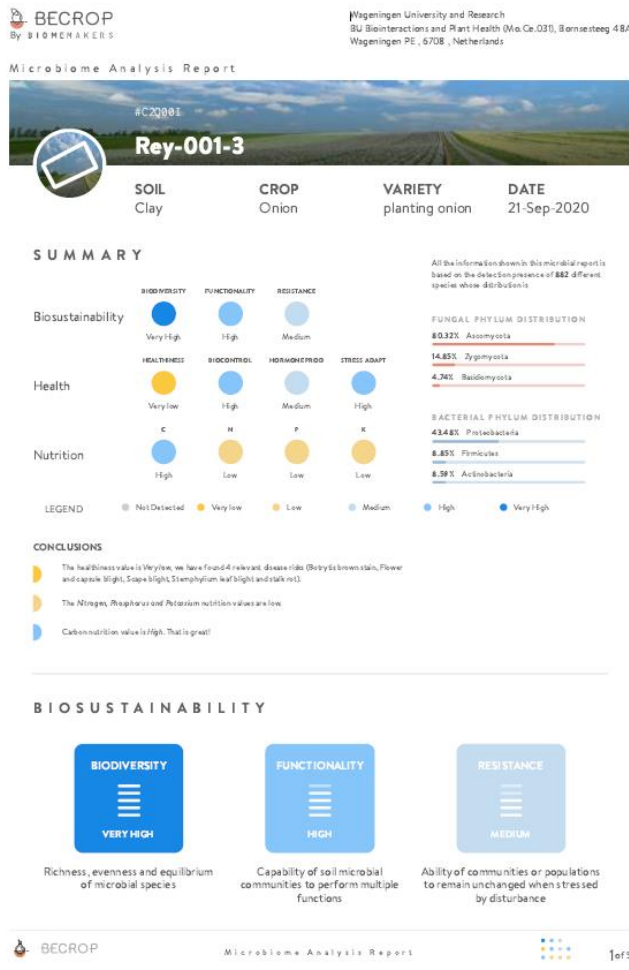


Figuur 3.19. De twintig belangrijkste bacteriegena en de drie genera die negatief gecorreleerd zijn met de hoeveelheid *F. oxysporum* f.sp. *cepae*.



Figuur 3.20. De 20 belangrijkste schimmelgenera, waaronder totale *Fusarium* als 6^e kolom en de zeven genera die negatief gecorreleerd zijn met de hoeveelheid *F. oxysporum* f.sp. *cepae*.

Ook van in het voor- en najaar van 2021 verzamelde grondmonsters uit praktijkpercelen zijn microbioomanalyses en be-crop data (voorbeeld Figuur 3.21) verzameld. In 2022 zijn deze data tezamen met eerder verzamelde data geanalyseerd. De eerder geïdentificeerde groepen van mogelijke antagonisten verdwenen in deze analyse met meer data. Die eerder geïdentificeerde groepen waren mogelijk dus het resultaat van een beperkte dataset of de variatie over jaren en gronden is te groot om duidelijke antagonisten aan te wijzen die onder alle omstandigheden zullen werken.



Figuur 3.21. Voorbeeld van een deel van de BeCrop-analyse aan een van de bodemonmonsters.

De statistische testen zijn gedaan op microbiomdata, maar ook op alle metingen van de besmettingen (bio-TaqMan data) en data verzameld met het inzamelen van de grondmonsters via het monsterformulier (zie bijlage 1). Van de verzamelde grondmonsters hebben we gedeeltelijk metadata over de grondsamenstelling en over de rotaties. Voor deze data is gekeken welke er gecorreleerd lijken te zijn met de met de Bio-TaqMan vastgestelde hoeveelheden *F. oxysporum* f.sp. *cepae*.

Alle analyses brachten weliswaar geen microbiële groepen aan het licht die typisch samen gaan met hetzij infectie of een gebrek daaraan, maar wel verschillende andere zaken:

- Van alle geteste metingen zijn de bio-TaqMan waarden (six5 en LysM) op het moment de beste voorspellers van de problemen op het veld en daarna in de bewaring.
- Welke gewassen gebruikt zijn op het veld, één en twee jaar voor de teelt van ui, heeft invloed op de mate van ziekteontwikkeling. Sommige voorgewassen lijken bevorderend te werken andere juist remmend. Dit kan te maken hebben met een direct effect op *F. oxysporum* f.sp. *cepae*, maar kan ook zijn door indirecte effecten via stimulering of remming van ander bodemleven.
- De hoeveelheid gemeten sporen in het voorjaar is gecorreleerd aan de hoeveelheid gemeten in het najaar (vergelijkbaar met figuur 3.7): in deze data is niet onverwacht een stijgende lijn waar te nemen in de hoeveelheid. Hoeveel de aantallen toenemen kan onder andere afhankelijk zijn van weers- en jaarinvloeden, gevoeligheid van een gebruikte cultivar en van de bodemomstandigheden.
- Ook organische stof gehalte, pH, N en K laten een correlatie met Fusarium en ziektedruk zien. De cultivar doet dat ook, al zien we daar dat op velden met problemen vaak al gekozen is voor fysiologisch sterkere cultivars (waarschijnlijk vanwege eerdere problemen).

Deze resultaten sluiten aan bij de hypothese dat andere gewassen in de cyclus een effect kunnen hebben op de ziektedruk. De Bio-TaqMan is momenteel de beste voorspeller van ziektedruk door *F. oxysporum* f.sp. *cepae*.

3.9 Bakkenproef: Onderzoek naar drempelwaardes in de rotatie

Er zijn duidelijke dosiseffecten waar te nemen van F. oxysporum f.sp. cepae op de groei en ontwikkeling van de ui. Al met kleine hoeveelheden pathogeen was sprake van verminderde opkomst van het zaad, van minder groen gewas en van meer ziekte in de resulterende uien na bewaring. De zaadcoating voor uien die gebruikt wordt in de conventionele landbouw, remt de effecten van de Fusarium infectie voor een groot deel. Onbehandeld zaad presteert duidelijk slechter.

Behandelingen tegen Fusarium kunnen ook in de bakkenproef getest worden. Helaas leverden de paar geteste behandelingen geen verbetering op in de teelt, soms zelfs het tegenovergestelde en was de aantasting veel groter in de bak en in de bewaring. Gewassen uit de rotatie laten geen typische Fusariumverwelking of -ziekteverschijnselen zien door F. oxysporum f.sp. cepae. Een aantal van de gewassen was in deze eerste test wel voor een deel reservoirplant voor F. oxysporum f.sp. cepae.

In een proef met bakken in het veld is gekeken naar (1) de effecten van de sporendichtheid in de grond op verschijnselen van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* op ui (paragraaf 3.9.1). (2) naar effecten van behandelingen op het voorkomen van schade in ui (paragraaf 3.9.2) en naar de effecten van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* op andere gewassen uit de rotatie (paragraaf 3.9.3).

3.9.1 Sporendichtheid-effecten van *F. oxysporum* f.sp. *cepae*

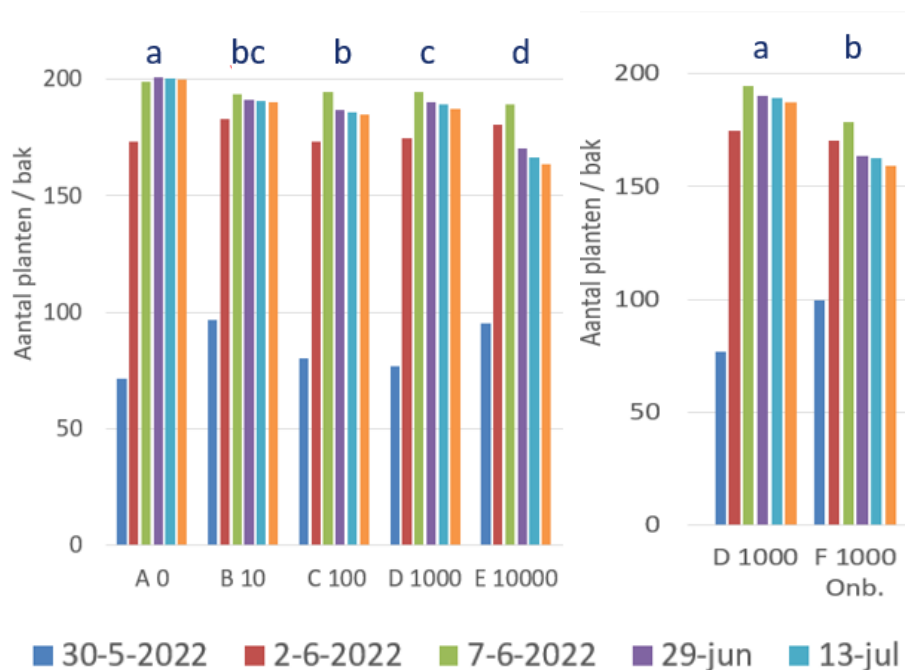
Om te kijken naar **dosis-effecten van *F. oxysporum* f.sp. *cepae*** op de groei van ui en de uiteindelijk geproduceerde en opgeslagen uien, is in vijf behandelingen, gemarkeerd van A tot en met E een dichtheidsreeks van 0, 1, 10, 100, 1000 en 10.000 conidiosporen per gram grond getest. Hierin zijn per bak 200 zaden van de cultivar Hypark gezaaid, die een standaard behandeling en zaadcoating hadden gekregen (Figuur 3.22). Elke behandeling is in drie verschillende bakken herhaald.



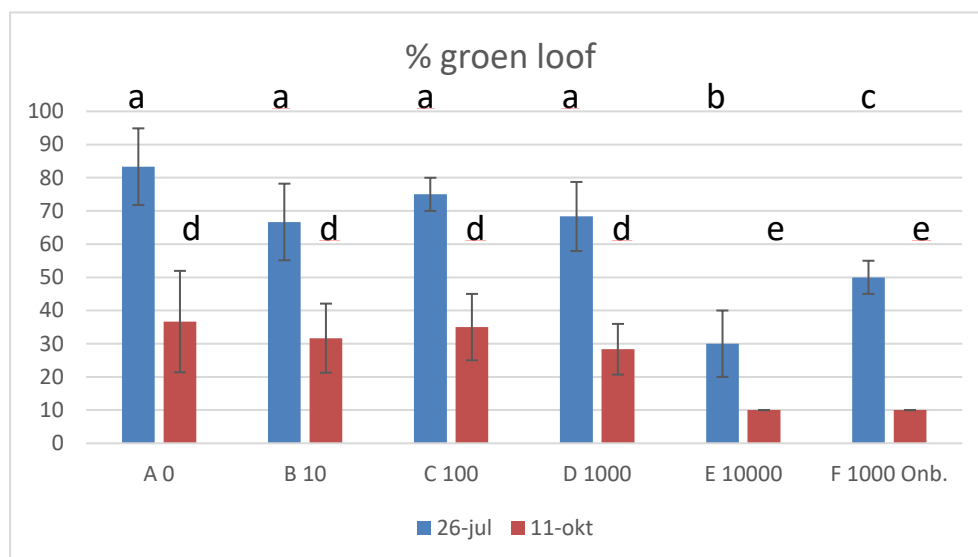
Figuur 3.22. Bakkenproef in augustus, september en net voor de oogst.

Opkomst en stand van planten is op verschillende momenten tijdens het groeiseizoen waargenomen (figuur 3.23). Zelfs bij lage dichtheden zoals bij 10 sporen per gram grond is in de relatief beschermde omgeving van de bakken al waar te nemen dat een aantal planten niet op kwam en er enkele tijdens het groeiseizoen wegvielen. Als er minder planten staan zien we tijdens de groei dat deze groter worden omdat er minder concurrentie tussen planten is. In het veld zien we dan vaak een gewas dat erg heterogeen is qua grootte, in de bakken viel dit nog mee.

In behandelingen D en F zijn bij beide behandelingen concentraties van 1000 conidiosporen per gram grond toegevoegd, bij D zijn zaden gebruikt met een standaard zaadcoating en bij F zijn onbehandelde zaden gebruikt. In de zaadcoating zit een middel wat standaard werkt 'tegen kiem- en bodemschimmel' en wat duidelijk ook een effect lijkt te hebben op de ziektedruk (vergelijking behandeling D en F) dit kan zijn door een direct effect op *Fusarium* maar ook door een indirect effect via het andere bodemleven. Figuur 3.24 laat zien dat het percentage groen loof met toenemende dichtheid *Fusarium* pathogenen geleidelijk aan afnam. Het sterkst lijkt deze afname bij het onbehandelde zaad (object F).



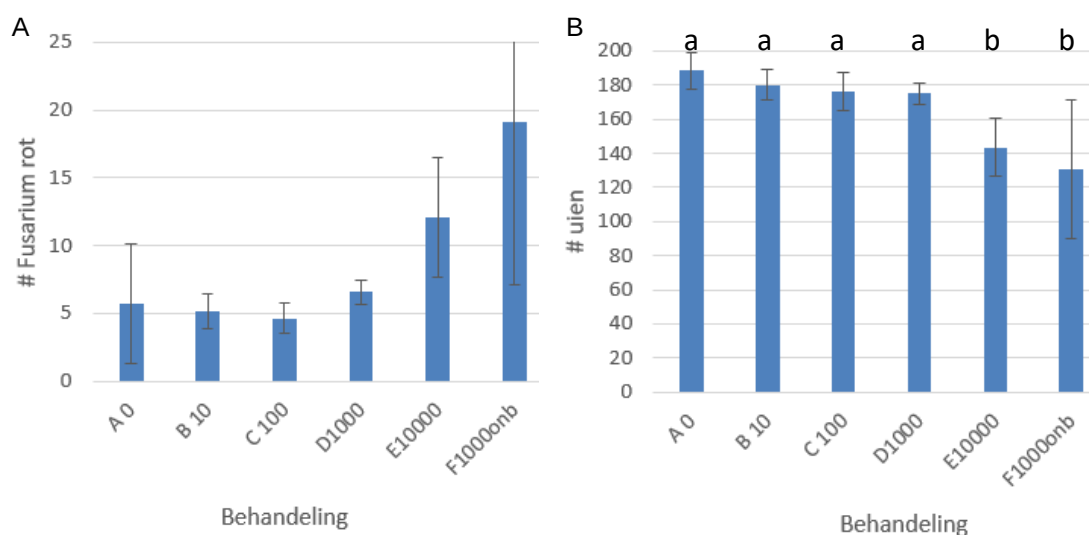
Figuur 3.23. Opkomst en overleving van gecoat uienzaad in een bakkenproef met een reeks van A 0, B 10, C 100, D 1000 en E 10.000 sporen van *F. oxysporum* f.sp. *cepa*e per gram grond. Behandelingen D en F zijn beide met een concentratie van 1000 sporen per gram, maar in D is gecoat zaad gebruikt en in F niet gecoat zaad. Zelfde letters boven de grafiek geeft aan dat behandelingen niet significant van elkaar verschillen.



Figuur 3.24. Het percentage planten met groen loof als mate voor de gezondheid van het gewas ten opzichte van vergelend en verwelkend gewas. Reeks A 0, B 10, C 100, D 1000 en E 10.000 sporen van *F. oxysporum* f.sp. *cepa*e per gram grond met gecoat zaad. Behandeling F niet gecoat zaad met 1000 sporen per gram grond. Zelfde letters boven de grafiek geeft aan dat behandelingen niet significant van elkaar verschillen.

De uiteindelijke geoogste uien zijn om een eventueel ziekteproces te versnellen opgeslagen onder hotbox omstandigheden met hogere temperatuur en luchtvochtigheidscondities. Tijdens de beoordelingen zijn de uien doorgesneden en visueel beoordeeld op verschillende rottingsverschijnselen. Een deel van de aangetaste uien is daarna getest om de aanwezigheid van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* te bevestigen. Met toenemende hoeveelheid start-inoculum in de bakken zagen we ook een toename van de uiteindelijk aangetaste uien (Figuur 3.25A). Als we deze percentages rot en uitval in het veld meenemen op de oorspronkelijk gezaaide hoeveelheid uien, kunnen we zien dat er een sterk dichtheid-effect te zien is van *F. oxysporum* f.sp. *cepae*. Zaad zonder zaadcoating liet de grootste hoeveelheid uitval en rot zien (Figuur 3.25).

Ook in behandeling A, waar geen *F. oxysporum* f.sp. *cepae* was toegevoegd, zagen we van één bak uiteindelijk 11% rotte uien uit de hotbox komen. Grondanalyse van deze bak liet zien dat er hier aan het eind van de teelt ook *F. oxysporum* f.sp. *cepae* in zat: blijkbaar heeft er tijdens het groeiseizoen een besmetting van deze bak plaats gevonden.



Figuur 3.25. A. % rot in de uien in de bewaring. B Aantal gezonde uien resulterend van de starthoeveelheid van 200 zaden per bak. Reeks A 0, B 10, C 100, D 1000 en E 10.000 sporen van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* per gram grond met gecoat zaad. Behandeling F niet gecoat zaad met 1000 sporen per gram grond; hierin zijn dus meegenomen zowel planten die in het veld zijn weggevallen als uien die in de opslag aangetast bleken.

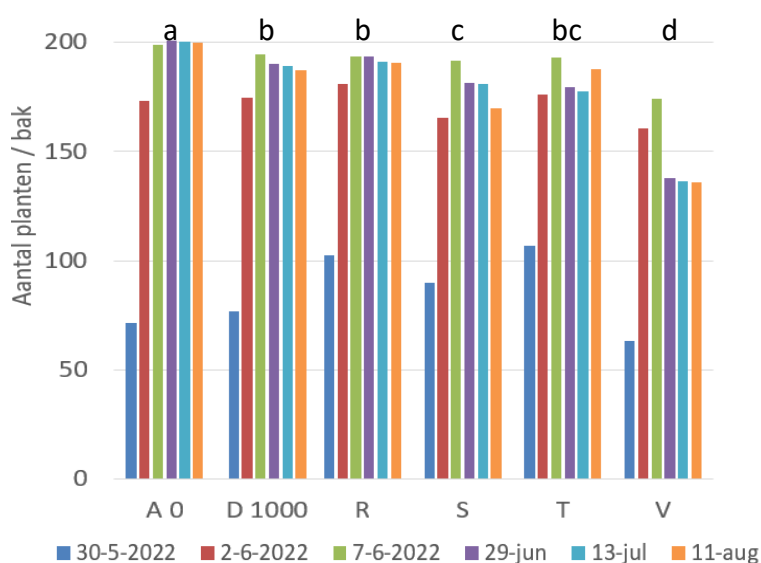
3.9.2 Effecten van behandelingen

Om te kijken of een dergelijke bakkenproef ook geschikt is voor het testen van de effecten van bepaalde behandelingen, zijn er verschillende behandelingen uitgevoerd. Dit zijn de behandelingen met Rudis op basis van prothioconazool (0.6l/ha; behandeling R), met Trium op basis van de bodemschimmel *Trichoderma harzianum* T-22 (50kg/ha; behandeling S), met chitosan gemaakt uit chitine (10l/ha, behandeling T) en een behandeling met niet-pathogene Fusarium (10.000 sporen/g), behandeling U).

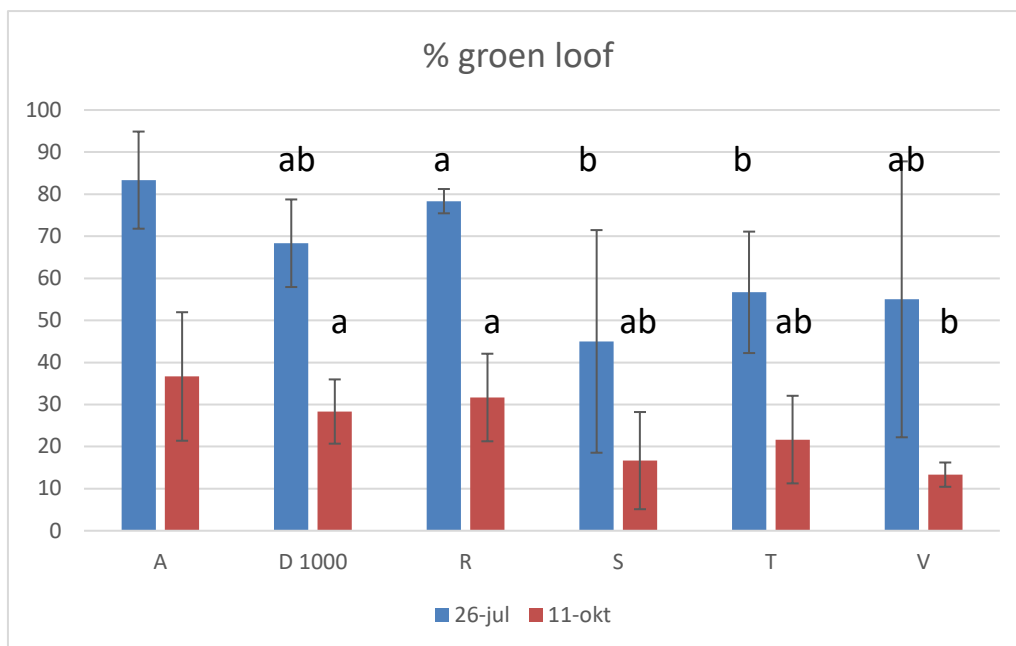
Ook deze behandelingen zijn tijdens het groeiseizoen beoordeeld op de opkomst en het wegvallen van uienplanten (tellen aantal zaailingen/planten; Figuur 3.26) en zijn beoordeeld op groei, verwelking en vergeling (figuur 3.27). Alle uien zijn aan het eind van het groeiseizoen geoogst en opgeslagen in een hotbox bij 25°C en hoge luchtvochtigheid en na 6 weken opengesneden en beoordeeld op fusariumrot (Figuur 3.28). Een deel van

de aangetaste uien is daarna getest met de bio-TaqMan om te verifiëren dat de geobserveerde fusariumrot door *F. oxysporum* f.sp. *cepae* werd veroorzaakt.

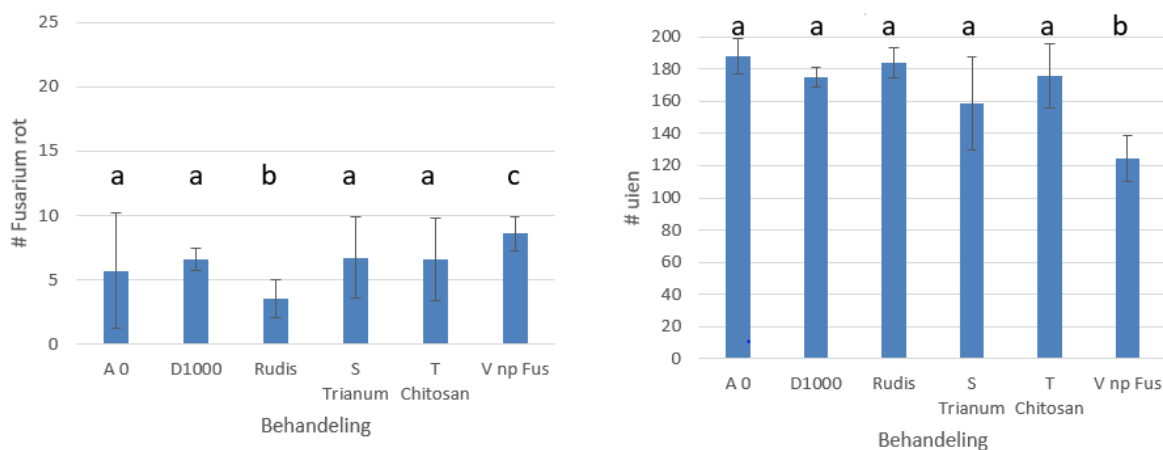
Van de behandelingen deed Rudis het tijdens opkomst en groei niet significant anders dan de andere behandelingen, echter het percentage uien dat in de bewaring wegroete was bij deze behandeling significant lager dan bij de onbehandelde controle (object D). Dit duidt op een lange nawerking van Rudis. De behandeling met niet-pathogene Fusarium – een behandeling die in de kas vaak erg goede resultaten geeft- blijkt in ui een verslechtering op te leveren zowel tijdens de groei in het veld als tijdens de bewaring. Chitosan en Trianum gaven in deze test geen of een lichte verslechtering in opkomst en stand van de uien in vergelijking met de onbehandelde controle (object D). Ze hadden geen effecten op de uiteindelijke Fusariumrot percentages in de bewaring.



Figuur 3.26. Opkomst en overleving van gecoat uienzaad met A 0 sporen *F. oxysporum* f.sp. *cepae* per gram grond; D-V 1000 sporen *F. oxysporum* f.sp. *cepae* per gram grond. A en D zonder behandeling, R=Rudis, S-Trianum, T= chitosan, V= niet-pathogene *Fusarium* behandeling.



Figuur 3.27. Het percentage planten met groen loof als mate voor de gezondheid van het gewas ten opzichte van vergelend en verwelkend gewas. Behandeling A 0 sporen *F. oxysporum* f.sp. *cepa* per gram grond; D-V 1000 sporen *F. oxysporum* f.sp. *cepa* per gram grond. A en D zonder behandeling, R=Rudis, S- Trianum, T= chitosan, V= niet-pathogene *Fusarium* behandeling.



Figuur 3.28. A. % rot in de uien in de bewaring. B Aantal gezonde uien resulterend van de starthoeveelheid van 200 zaden per bak. Behandeling A 0 sporen *F. oxysporum* f.sp. *cepa* per gram grond; D-V 1000 sporen *F. oxysporum* f.sp. *cepa* per gram grond. A en D zonder behandeling, R=Rudis, S- Trianum, T= chitosan, V= niet-pathogene *Fusarium* behandeling.

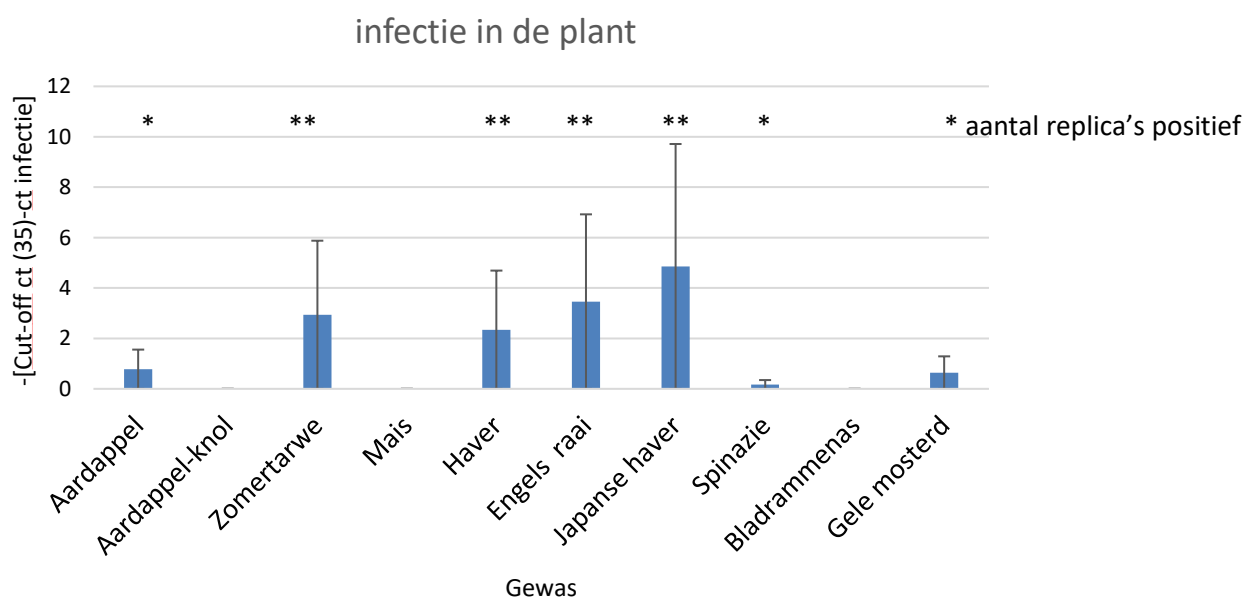
3.9.3 Andere gewassen en *F. oxysporum* f.sp. *cepa*.

In de derde parallelle serie bakken zijn andere gewassen uit de rotatie getest op een concentratie van 1000 conidiosporen *F. oxysporum* f.sp. *cepa* per gram grond om te kijken of deze als reservoir planten kunnen dienen of dat ze besmetting laten afnemen. Hierbij is gekeken tijdens het groeiseizoen geobserveerd of de planten tekenen van fusariumverwelking en -rot vertoonden. Net voor de oogst zijn grondmonsters genomen

en is met de bio-TaqMan methode de besmetting met *F. oxysporum* f.sp. *cepae* bepaald. Na de oogst is in plantendelen gekeken of hierin met de bioTaqMan methode *F. oxysporum* f.sp. *cepae* aan te tonen was.

Voor de behandelingen met gewassen uit de rotatie is gekozen voor de volgende gewassen: aardappel, zomertarwe, mais, haver, Japanse haver, Engels raaigras, spinazie, bladrammenas en gele mosterd (voor zaaidichtheid zie Figuur 2.2B). Daarnaast zijn drie bakken braak gehouden. Alle behandelingen zijn gerandomiseerd in het veld geplaatst, met uitzondering van de spinazie en de aardappelen met het oog op behandelingen tegen andere plagen en pathogenen tijdens de teelt.

Geen van deze gewassen liet tijdens de teelt verschijnselen zien van aantasting door Fusarium, maar met de bio-Taqman werd in een aantal van de gewassen wel *F. oxysporum* f.sp. *cepae* aangetoond (Figuur 3.29). In alle gevallen ging het bij aantasting erom dat 1 of 2 van de geteste plantensets besmet waren. De metingen in de grond waren duidelijk te vroeg genomen en gaven een zee wisselend beeld: deze hadden pas genomen moeten worden na de oogst nadat restmaterialen waren ingewerkt en deels verteerd. Nu waren ze genomen voor de oogst op ruime afstand van de planten omdat dat het makkelijkst was, maar dat geeft geen goed beeld van de totale gemiddelde besmetting



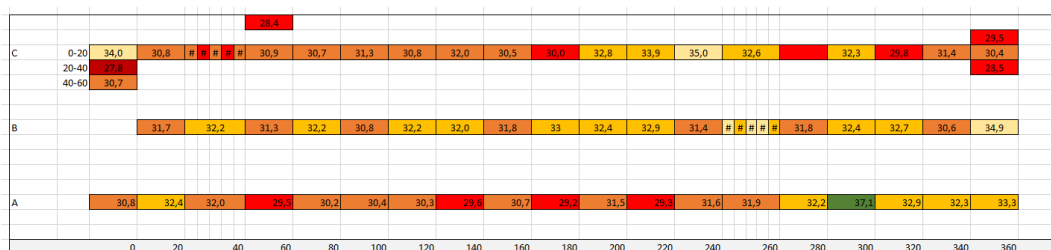
Figuur 3.29. Endofytisch voorkomen in andere gewassen. Per gewas en per bak is een aantal (sets van) planten bovengronds bemonsterd, aan de buitenzijde ontsmet met ethanol en daarna met de Bio-TaqMan getest. Het aantal asterisken boven de grafiek geeft het aantal van de replica's waarvan het geteste deelmonster positief testte was. De hoogte van de geeft de mate van besmetting weer. Ter vergelijking: een rotte ui scoort hier een waarde tussen de 10 en 12.

Een deel van de planten bleek duidelijk besmet: met de werkgroep is afgesproken dat deze gewassen opnieuw getest moeten worden in Uireka 3 om te kijken of deze ook bij herhaling tekenen van besmetting geven.

3.10 Bemonstering in het veld

Een belangrijke vraag voor de bemonstering van een veld is hoe homogeen de pathogene *F. oxysporum* f.sp. *cepae* verspreid is door het veld en hoeveel monsters er per hectare genomen moeten worden om een goed beeld te krijgen van het besmettingsniveau en om op grond daarvan voorspellingen te kunnen doen over de verwachte schade in gewas en in de bewaring. Op 12 juli 2023 is een veld van 100 x 400 meter met behoorlijke aantasting intensief bemonsterd en zijn alle grondmonsters afzonderlijk met de bio-TaqMan geanalyseerd (Figuur 3.30).

Van de 68 genomen grondmonsters scoorde slechts 1 monster negatief, alle andere scoorden positief, dat wil zeggen er werd pathogene *F. oxysporum* f.sp. *cepae* aangetoond. Dit suggereert een flink homogene besmetting door het hele veld heen. Ook in de diepere grondlagen werden flinke hoeveelheden sporen aangetroffen, wat suggereert dat ook rondom de wortels flinke hoeveelheden sporen gevormd zijn of deze mee de diepere grondlagen in kunnen spoelen.



Figuur 3.30. Uitslagen veldbemonstering. Codering: Groen: geen besmetting gemeten, licht geel-geel-oranje rood steeds zwaardere besmetting.

4 Discussie en interpretatie

4.1 *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* is het belangrijkste pathogeen op ui in Nederland.

Met de biotoetsen zoals in 2020 uitgevoerd op hele uien is vast te stellen welke van de eerder geïsoleerde *Fusarium* stammen primair pathogeen zijn en welke niet. Volgens de Engelse onderzoekers geven de testen op hele uien en op zaailingen dezelfde 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, zeker van *F. solani* is bekend dat deze vaak bij hogere temperaturen relatief agressiever wordt. 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 92% van de monsters positief voor de aanwezigheid van DNA van *F. oxysporum* f.sp. *cepae*, wat daarmee niet alleen de meest pathogene, maar ook meest voorkomende *Fusarium* pathogeen op ui was in 2020. De verschillen met de observaties binnen Uireka in 2017 en 2018 zijn groot omdat daar ook secundaire pathogenen en ‘partycrashers’ werden meegenomen die alleen dankzij de infectie door de primaire pathogeen kunnen groeien: uit die testen is in 29% van de monsters *F. oxysporum* f.sp. *cepae* geïsoleerd.

Een PCR-test toont ook DNA aan van overleden cellen, als dit DNA nog niet door andere organismen in de omgeving is afgebroken. In het geval van rottende uien geeft de hoeveelheid waargenomen signaal voor *F. oxysporum* f.sp. *cepae* meestal de indicatie dat er heel veel materiaal aanwezig is. Levend materiaal *F. oxysporum* f.sp. *cepae* en andere *Fusaria* kunnen geïsoleerd worden door uitplaten op groeimedia.

In 2021 en 2022 zijn percelen getest op de aanwezigheid van levende *F. oxysporum* f.sp. *cepae* aan het begin en het einde van de uienteelt door middel van de bio-TaqMan. In een deel van de percelen werd geen *F. oxysporum* f.sp. *cepae* aangetoond, ook niet in uien na de teelt. In besmette percelen werd tijdens het groeiseizoen een toename van het pathogeen tijdens de uienteelt waargenomen: Deze toename hing af van het groeiseizoen en groeiomstandigheden, alsook van de tolerantie van de gebruikte cultivar en varieerde van 5 tot 50x of soms meer. In gronden waar *F. oxysporum* f.sp. *cepae* werd aangetroffen, kon doorgaans ook in rotte uien het pathogeen worden aangetoond. Er is in de veldmonsters een dichtheids-effect waar te nemen: hoe groter de besmetting aan het begin van het groeiseizoen met *F. oxysporum* f.sp. *cepae* hoe groter de kans op problemen in het veld en na bewaring.

In een deel van de bakkenproef gekeken naar het dichtheids-effect van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* op problemen in de teelt. Al bij een concentratie van 10 sporen per gram grond kwamen er significant minder planten op dan in de schone grond en bleven er minder planten staan tijdens het groeiseizoen. Hoe hoger de dichtheid aan sporen in de grond, des te groter was deze uitval en waren de planten minder groen. Meer inoculum, resulteerde ook in een grotere hoeveelheid rotte uien tijdens de bewaring. Een zaadcoating met fungicide remde de ziekteverschijnselen in plant en in de bewaring. Behandeling met Rudis voor het zaaien remde de uiteindelijke rotting in de bewaring.

4.2 Specifieke detectiemethode voor *F. oxysporum* f.sp. *cepae*

De bioinformatica studie van de genomen van de verschillende op ui voorkomende *Fusarium* soorten, pathogenen van andere waardplanten en niet-pathogene soorten liet 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 3.1) specifiek te zijn en niet in andere pathogenen en niet-pathogenen voor te komen. Dit geeft aan dat deze genen specifiek betrokken zijn bij het infectieproces van *Fusarium* op ui. Op twee van deze eigenschappen is de (bio-)TaqMantest ontwikkeld die specifiek de uienpathogenen kunnen detecteren. Vier van deze zeven genen cq allelen zijn niet eerder geïdentificeerd als verantwoordelijk voor pathogeniteit.

De sets van bio-Taqman primers en probes die op de specifieke genen ontwikkeld zijn lieten in de uitgevoerde testen 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 *Fusarium* pathogenen van andere waardplanten of niet pathogenen) (data niet getoond). De test blijkt zowel op geïsoleerde schimmelstammen, op plantmaterialen en in grond gebruikt te kunnen worden voor de identificatie van de pathogeen. Voor deze drie materialen is voor elk een interne controle toe te voegen aan de detectiemethode.

Als werkmethode is uitgegaan bij veldbemonsteringen van een mengmonster van 30 à 40 stekende die verspreid over het veld genomen zijn. Een besmet perceel is in 2022 uitgebreid bemonsterd, slechts een van de enkele monsters die genomen zijn bleek in dit geval niet besmet en *F. oxysporum* f.sp. *cepae* bleek homogeen door het veld verspreid te zijn. De eerste analyses suggereren dat een mengmonster van 30 à 40 een redelijk goed beeld van een besmetting zal kunnen geven, verdere statistische tests op deze data worden in 2023 uitgevoerd.

4.3 Reststromen en inundatie

Tijdens mesofiele vergisting van plantaardige materialen vindt een afdoding plaats van circa 99.99% van de aanwezige sporen in 14 dagen tijd. 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 niet gegarandeerd ziektekiemvrij te gebruiken. De reden hiervan is dat de gemiddelde verblijfsduur weliswaar voldoende is, maar dat dat niet zegt dat elk deeltje in een vergister ook die verblijfsduur daadwerkelijk heeft. De schatting is dat om die reden 2-5% van de sporen levend in het digestaat aanwezig zal zijn.

Tijdens composteringsproeven bij een professionele compostering waarbij zowel losse sporen (conidiosporen en chlamydosporen) als sporen in bollen zijn gebruikt, blijkt de afdoding een stuk efficiënter dan bij mesofiele vergisting. Na een ronde compostering bij een temperatuur van 60-65° is meer dan 99.99% afgedood. Na een tweede ronde kon er helemaal geen levende *Fusarium* meer worden aangetoond.

Een simulatie van veldinundatie is uitgevoerd in bakken met verschillende soorten grond, verschillende toevoegingen aan de grond, waaronder aangetaste uien, bij temperaturen van 16.5°C en lager. De verschillende inundatie behandelingen varieerden niet significant van elkaar en lieten zien dat *Fusarium* besmetting in een

periode van 8-14 weken inundatie ongeveer 100x afnam, terwijl in niet geïnundeerde grond de *Fusarium* populatie niet of nauwelijks afnam (Topper & Evenhuis, 2022).

Inundatie in de praktijk: Bij twee praktijkvelden die vier tot vier-en-een-halve maand onder water zijn gezet, zijn conidiosporen en chlamydosporen ingegraven en na afloop van de inundatieperiode beoordeeld op levensvatbaarheid. Van de conidiosporen, konden we na de inundatieperiodes van 4 à 4,5 maand van de uitgangskonzentraties van tussen de 10^5 - 10^6 aan verse sporen per gram grond, geen sporen terugvinden. De afdoding van deze sporen is dus zeker een 10^5 - 10^6 maal. Bij de sterkere chlamydosporen vonden we een 5.000-10.000 x afname over de inundatieperiode. Van de chlamydosporen was dus nog steeds een (klein) deel van de sporen in leven (in 5 van de 6 teruggevonden zakjes van de 8 originele zakjes werd er nog levend materiaal aangetoond).

4.4 Rotaties en microbiomen

Microbioomdata van de verschillende grondmonsters uit 2020 en 2021 zijn gegenereerd en geanalyseerd. Analyse van de data in 2020 liet een verband zien tussen bepaalde bodempopulaties van bacteriën en schimmels die negatief gecorreleerd waren met *Fusarium*: deze organismen zijn meer aanwezig als *Fusarium* laag is en andersom. Echter de grondmonsters uit 2021 lieten deze verbanden niet zien en ook als we de data tezamen nemen bleek geen verband meer zichtbaar.

Soortgelijke statistische testen op de metingen van de besmettingen van de verzamelde gronden (bio-TaqMan data) en data verzameld met het inzamelen van de grondmonsters via het monsterformulier brachten aan het licht dat de gewassen die gebruikt zijn op het veld, één en twee jaar vóór de teelt van ui, invloed hebben op de mate van ziekteontwikkeling. Sommige lijken bevorderend te werken andere juist remmend. Dit kan te maken hebben met een direct effect op *F. oxysporum* f.sp. *cepae*, maar kan ook zijn door indirecte effecten via stimulering of remming van ander bodemleven. Ook organische stof gehalte, pH, N en K lieten een correlatie met *Fusarium* en ziektedruk zien. De cultivarkeuze deed dat ook, al zien we daar dat op velden met problemen vaak al gekozen is voor fysiologisch sterkere cultivars (waarschijnlijk vanwege eerdere problemen).

In de bakkenproef is een aantal gewassen getest op hun vermogen als gastheer, reservoirplant of als remmer van *F. oxysporum* f.sp. *cepae*. Geen van de gewassen was ook gastheer van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* en vertoonde ziektesymptomen. Verschillende gewassen in de proef en ook een aantal verzamelde akkeronkruiden leken als reservoirplant op te kunnen treden. Omdat de grondmonsters al voor de oogst genomen waren, was het niet te bepalen of gewassen remming gaven. Deze proeven worden in 2023 herhaald om duidelijkheid te krijgen welke gewassen in de rotatie welke rol spelen.

5 Conclusies en aanbevelingen

Fusarium oxysporum f.sp. *cepae* is het in de surveys in Nederland meest gevonden *Fusarium* pathogeen op ui. In biotoetsen op ui was het de soort die de zwaarste aantasting in de ui veroorzaakte. Dankzij de genomanalyse van ui-pathogenen en niet-ui-pathogenen is een set van zeven genen/allelen gevonden waarmee kan worden vastgesteld dat we te maken hebben met een ui-pathogeen. Op twee van deze 7 genen/allelen is een diagnostische toets ontwikkeld. Toepassing van de ontwikkelde (bio-)TaqMan op rotte uien uit de praktijk laat zien dat meer dan 90% van deze uien besmet is met *F. oxysporum* f.sp. *cepae*.

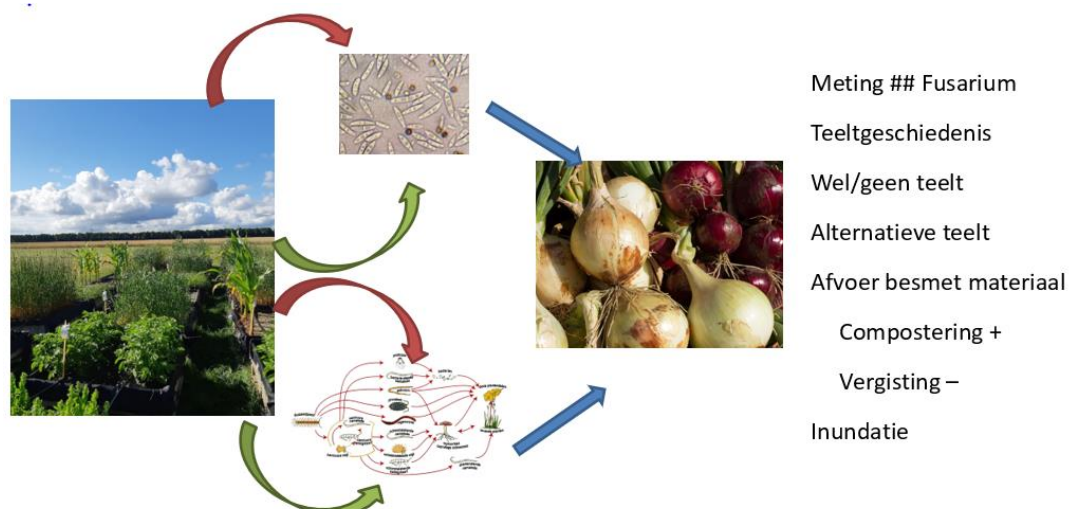
De (bio-)TaqMan is uitgebreid in het laboratorium en op praktijkmonsters getest en kan worden ingezet op geïsoleerd schimmel materiaal, op plantmateriaal en in grond om vast te stellen dat *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* aanwezig is. Voor alle drie deze typen monsters zijn controles ontwikkeld om uit te sluiten dat een negatieve reactie het resultaat zou zijn van een mislukte DNA extractie of amplificatie. Door het uitvoeren van een kweekstap waarmee selectief *Fusarium* kan worden vermenigvuldigd blijkt het bovendien mogelijk om kwantitatief in grondmonsters te kunnen meten vanaf enkele sporen per gram grond (Bio-TaqMan). Een dergelijke kweek stap laat ook zien dat het hier om levend materiaal gaat.

Met de verbeterde detectie kan er ook verder gewerkt worden aan de analyse van grond- en plantmonsters uit verschillende vruchtwisselingsproeven en uit de praktijk. Hiermee kan in kaart worden gebracht wat het verloop is van de pathogenen onder verschillende teeltomstandigheden maar er kan ook gekeken worden waar drempelwaardes liggen of wat de effecten zijn van gewasrotaties en andere teeltmaatregelen op het voorkomen van *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*. Analyse van grondmonsters van uienvelden, laat zien dat tijdens het groeiseizoen *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* fors kan toenemen.

Aan mesofiele vergisting kleeft het risico dat een klein percentage van *Fusarium* sporen de behandeling overleeft. Zeker als zwaar aangetast materiaal vergist wordt, bestaat dus een kans dat digestaat levende sporen bevat. Er is geen onderzoek verricht aan thermofiele vergisting. Bij goede compostering blijkt, na twee composteringsrondes waartussen de rijpende compost is omgezet, geen levend *Fusarium* meer aanwezig te zijn. Compostering is dus een veel effectievere methode om *Fusarium* uit de reststromen te verwijderen dan mesofiele vergisting.

Inundatie van een perceel- vooral toegepast op nematoden-populaties terug te dringen- zou volgens een simulatieproef en een veldproef met verschillende typen met *Fusarium* besmet materiaal geen totale afdoding van *Fusarium* geven, maar wel de druk van het pathogeen flink kunnen verlagen. Chlamydosporen zijn het meest resistent als overlevingsstructuur tijdens inundatie blijkt uit de metingen van geïnundeerde praktijkvelden.

Analyse van de verzamelde praktijkgegevens van veldmonsters en van een bakkenproef met verschillende andere gewassen uit de rotatie geeft aan dat voorgewassen een effect kunnen hebben op de hoeveelheid pathogeen en/of de mate van infectie tijdens de uienteelt. Experimenten om de risico's van bepaalde gewassen te achterhalen (veldmetingen en bakkenproeven) zullen in Uireka 3 herhaald worden.



Figuur 5.1 Synthese van de resultaten van Uireka 2-werkpakket Fusarium.

Als afsluiting een overzicht van de resultaten van 3 jaar Uireka 2-werkpakket Fusarium (Figuur 5.1). Om een infectie te kunnen krijgen met *F. oxysporum* f.sp. *cepae* zal dit pathogeen in het veld aanwezig moeten zijn (top Figuur 5.1). Het pathogeen laat een dosis-effect zien en hoe meer pathogeen er in het veld is, des te meer problemen zijn er in de teelt en tijdens de bewaring van de uien te verwachten. De hoeveelheid levende *F. oxysporum* f.sp. *cepae* is te meten in veldmonsters met behulp van de ontwikkelde Bio-TaqMan. De voortelten van de twee jaren voor de teelt van ui, kunnen zowel een positief als een negatief effect hebben op de problemen veroorzaakt door *F. oxysporum* f.sp. *cepae*. Besmette materialen kunnen het beste gecomposteerd worden aangezien vergisting geen 100% afdoding garandeert. Inundatie kan helpen de hoeveelheid *F. oxysporum* f.sp. *cepae* in een perceel te verminderen.

6 Referenties

- Haapalainen, M., Latvala, S., Kuivainen, E., Qiu, Y., Segerstedt, M. & Hannukkala, A.O. (2016). *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. redolens* associated with basal rot of onion in Finland. Plant Pathology, 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. & 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
- Liu, C.M., Kachur, S., Dwan, M.G. *et al.* (2012) FungiQuant: A broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. BMC Microbiology 12, 255 <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-255>
- Savazzini, F., Longa, C.M., Pertot, I. & Gessler, C. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* strain SC1 in soil. J Microbiol Methods. 73:185-94.
- Scholten, O. & Burger, K. (2020). *Fusarium*-onderzoek in de Nederlandse Uienteelt. Uireka-rapport 2019-04. [Rassenketen onderzoek bewaaruien \(uireka.nl\)](https://www.uireka.nl/rassenketen-onderzoek-bewaaruien)
- Suarez, M. B., Walsh, K., Boonham, N., O'Neill, T., Pearson, S. & Barker, I. (2005). Development of real-time PCR (TaqMan®) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. Plant Physiology and Biochemistry, 43(9), 890-899.
- Taylor, A., Vágány, V., Jackson, A.C., Harrison, R.J., Rainoni, A. & Clarkson, J.P. (2016). Identification of pathogenicity-related genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. Molecular Plant Pathology, 17: 1032-1047.
- Topper, C. & Evenhuis, B. (2022) Effectiviteit inundatie op de *Fusarium* populatie voor de teelt van ui. Uireka rapport nummer: 2022 – 01.

7 Bijlage 1 - Monsterformulier

MONSTER	Monstercode ¹	Type monster ² ☐ Plantmateriaal Blad/bol/wortel ☐ Grondmonster-enkel ☐ Grondmonster-gemengd ☐ Ander:	Opslag ³ ☐ 4 à 5°C /100-200g (analyse levend materiaal) ☐ -18 à -20°C /10-20g (DNA analyse)	
	☐ Serie: ⁴ monster maakt deel uit van een serie	Datum Dag/maand/jaar/...../.....	Locatie GPS coördinaten of adres ⁵	
TEELT	Huidig gewas/cultivar:	Plantui/ Zaaiui/ Sjalot/ Anders	Zaaidatum:	Grondontsmetting, jaar
	Partijnummer:		Biologisch/Gangbaar	
	Rotatieschema Gewas(sen)/jaar:	Bemesting/ Groenbemester(s):	Grondbewerking: ⁶ Ploegen/eggen/rotorkopeg /anders.... Ploegdiepte: Niet/wel kerend Graag periode voor/najaar aangeven	Gewasbestrijding Bovengronds: Ondergronds: Pootgoed-/Gewas- voorbehandeling:
BODEM	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	Rooidatum:	Geplande datum einde opslag:	Opslag temperatuur:	Kiemremmersmiddelen: ☐ MH ☐ 1,4 sight ☐ Biox-M ☐ Restrain ☐ 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: ⁹ % 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)
Bornsesteeg 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 schepje 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.

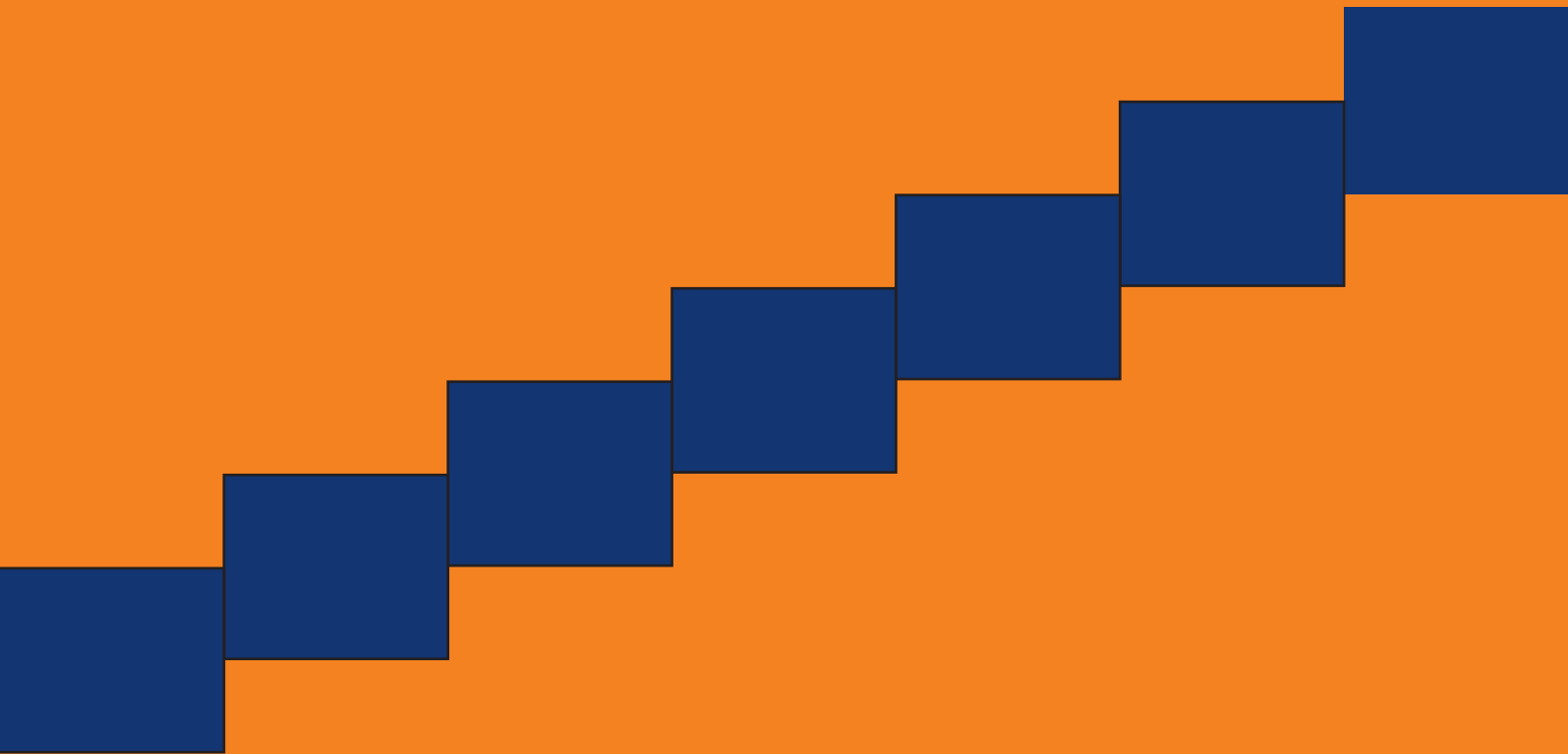
4. Noteer of monster deel uit maakt/gaat maken van een serie. Bijvoorbeeld meerdere monsters van een perceel op dezelfde dag of over jaar of jaren.

5. Locatie: geef bij voorkeur de GPS coördinaten van het monsterpunt of anders het adres. Bijvoorbeeld B 51.987431 x L 5.665395 voor 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.



Dit is een uitgave van Ulreka, 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

Ulreka 2.0 wordt mede mogelijk gemaakt door:



+ meer dan 70 ketenpartners!