



Fusarium in uien

Verslag onderzoek 2020-2021



rapport / publicatie

2022-07



Uireka is een uniek ketenproject waarin de gehele uienketen participeert. De eerste 3 jaar van het project (2017-2019) was het projectdoel met onderzoek de kwaliteit en daarmee het versterken van de exportpositie van de Nederlandse ui te verbeteren. Vanaf 2020 richt Uireka zich op het versterken van de duurzaamheid en weerbaarheid van de uienteelt. Het project is een initiatief van de Holland Onion Association en wordt mede ondersteund door Topsector Agri & Food, BO Akkerbouw en meer dan 70 ketenpartners.

Uireka draait om innovatie, verbetering en verduurzaming van de teelt, droogtechnieken en bewaring. Het project levert een pakket aan handvatten en oplossingen die ketenpartners in staat stelt de kwaliteit van de Nederlandse ui nog beter te borgen. Uiteindelijk zorgt dit voor een sterkere exportpositie en daarmee een versteviging van het verdienmodel van alle partners in de uienketen.

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.

Fusarium in uien

Verslag onderzoek 2020-2021

Uitgevoerd door:	Anne D. van Diepeningen Wageningen Plant Research Biointeractions and Plant Health
Uireka rapportnummer:	2022-07
Datum:	oktober 2022

Inhoudsopgave

Samenvatting	5
1 Inleiding en doel	6
2 Materiaal en methoden	7
2.1 Analyse pathogeniteit uien isolaten	7
2.2 Whole genome sequensen pathogenen en niet-pathogenen	7
2.3 Bioinformatica	7
2.4 Ontwikkeling diagnostische toets	8
2.5 Verzamelen praktijkmonsters	8
2.6 Overleving in vergister en tijdens compostering	9
2.7 Overleving tijdens inundatie	10
2.8 Microbioom analyse	10
3 Resultaten	11
3.1 Analyse pathogeniteit uien isolaten	11
3.2 Bioinformatica	12
3.3 Ontwikkeling diagnostische toets	14
3.4 Verzamelen en analyse praktijkmonsters	16
3.5 Overleving in de vergister	18
3.6 Overleving tijdens compostering	19
3.7 Overleving tijdens inundatie (simulatie)	23
3.8 Microbioom analyses	24
4 Discussie en interpretatie	29
5 Conclusies en aanbevelingen	31
6 Referenties	32
Bijlage I - Monsterformulier	33

Samenvatting

Binnen het Uireka werkpakket *Fusarium* zijn in 2020 en 2021 de volgende stappen gezet:

- Met een biotoets op uienbollen zijn in Uireka (1) verzamelde isolaten van *Fusarium oxysporum*, *F. solani* en *F. proliferatum* getest op pathogeniteit: *F. oxysporum* forma *speciales cepae* blijkt het sterkste pathogeen, maar ook niet pathogene *F. oxysporum* komen voor.
- 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 schimmel-isolaat. Op deze specifieke sequenties is een kwantitatieve op TaqMan gebaseerde diagnostische toets ontwikkeld waarmee het risico op fusarium rot 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 kan vaststellen.
- De 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 planten tot aan de oogst.
- Voor reststromen: Tijdens vergisting 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 is er dus een behoorlijke kans dat levend materiaal 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.

1 Inleiding en doel

Verschillende Fusariumsoorten kunnen Fusarium rot en verwelking veroorzaken in uienbollen en in uienplanten. De ziekte begint met het aantasten van de wortels van uienplanten. Langs die wortels groeit de schimmel naar de basale plaat van de plant. Vandaaruit kan de schimmel verder de plant (of bol) ingroeien. De aantasting van de wortels leidt ertoe dat minder water en voedingsstoffen getransporteerd kunnen worden naar de bladeren. Symptomen zijn dan onder andere het verwelken, vergelen en uiteindelijk afsterven van bladeren tijdens de ontwikkeling van de plant. In de 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 opslag van uien.

Verschillende soorten Fusarium, waaronder *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, *F. solani* en *F. proliferatum* zijn volgens wetenschappelijke literatuur geassocieerd met de rot- en verwelkingsverschijnselen in ui (o.a. Haapalainen *et al.*, 2016; Kalman *et al.*, 2020; Klokočar-Šmit *et al.*, 2008). Binnen de PPS Uireka (1) zijn in 2017 en 2018 vanuit ziek 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*) te bevatten, wat een aanwijzing is voor pathogeniteit op ui (Taylor *et al.* 2016). Daarnaast werden isolaten van *F. solani* gevonden (vooral in het warme jaar 2018), *F. proliferatum*, *F. redolens*, *F. acuminatum* en *F. commune* (Scholten en Burger, 2020). Binnen de PPS Uireka 2.0 is een apart werkpakket opgezet, dat zich concentreert op het beter beheersbaar krijgen van Fusarium in de teelt en opslag van uien. Volgens planning werden in 2020 en 2021 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.

Buiten het werkpakket om is onderzoek gedaan aan

7. Inundatie
8. Microbioomanalyse

2 Materiaal en methoden

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 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 was de aantasting tussen 80-100% van het ui-oppervlakte van overlans doorgesneden bollen van de positieve controle. 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* sequensing. Pathogeniteit of niet-pathogeniteit is hierbij gebaseerd op de biotoets zoals beschreven in paragraaf 2.1. Uit de isolaten is het DNA geïsoleerd na een behandeling met een *bead beat* methode gekoeld met koudijs om het DNA beter te isoleren. Na een kwaliteitscontrole zijn er bibliotheken gemaakt van elke stam die daarna gesequenced zijn op een MiSeq platform bij GenomeScan B.V. (Leiden, NL). Per isolaat zijn er circa 10-17 Miljoen *reads* gegenereerd, wat betekent dat van elk stukje van het genoom de basevolgorde van het DNA ongeveer 50-100x bepaald is.

2.3 Bioinformatica

Voor iedere gesequencede stam is uit alle sequentie data het genoom in elkaar gepuzzeld voor zover mogelijk (*assembly*) en zijn de genen erop geïdentificeerd (*annotation*). Naast de binnen Uireka 2.0 gesequencede uien-pathogene en niet-pathogene isolaten uit ui zijn er ter vergelijking pathogene en niet-pathogene stammen van andere waardplanten (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.

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 verrijkingsstap uitgetest met vloeibaar Komada-medium (Komada, 1976) waarin de schimmels 2 tot 3 dagen worden opgekweekt.

2.5 Verzamelen praktijkmonsters

Najaar 2020. Door de partners zijn in najaar 2020 op 32 door de partners gekozen locaties, met en zonder *Fusarium* aantastuing, 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 1.

Veldseizoen 2021. In 2021 zijn er in het voorjaar 85 grondmonsters verzameld van zowel praktijkvelden als van proefvelden. In het najaar zijn van een 50-tal velden uit dezelfde serie een tweede monster verzameld. Daarnaast zijn er een tiental uien ontvangen bij enkele van de grondmonsters. Dit betrof uienvelden waar in 2021 of in het jaar ervoor uien hadden gestaan.

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 ⁴ monster maakt deel uit van een serie	Datum Dag/maand/jaar	Locatie GPS coördinaten of adres ⁵		
TELT	Huidig gewas/cultivar: Partijnummer:	Plantul/ Zaaiul/ Sjalet/ Anders	Zaaidatum:	Grondontmetting, jaar Biologische GO: Inundatie: Gewasbestrijding Bovengronds: Ondergronds: Pootgoed-/Gewas- voorbehandeling:	
	Rotatieschema Gewas(en)/jaar:	Bemesting/ Groenbemester(s):	Grondbewerking: ⁶ Ploegen/eggen/rotorkoep /anders... Ploegdiepte: Niet/wel kerend Graag periode voor/najaar aangeven		
BODEN	Bodemtype: Grondanalyse/bodemvruchtbareheidsanalyse .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):	Verslumping:	
OPSLAG ⁷	Rooddatum:	Geplande datum einde opslag	Opslag temperatuur:	Kleinremmingsmiddelen: ☐ 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: ⁸ % Fusarium besmette planten op het veld % Fusarium besmette uien in opslag Andere ziektes? Zo ja, welke en percentage aantasting				
	Aanvullende informatie:				
	EXTRA				

Figuur 1. Monsterformulier 2020/21 (zie bijlage I)

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

2.6 Overleving in vergister 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 hoeveelheden sporen opgekweekt in vloeibaar Aardappel- Dextrose-medium (PDB). Het experiment is uitgevoerd in een vergister van ongeveer een kuub groot onder mesofiele omstandigheden (38°C). De overleving werd op twee manieren getest: (1) door directe toevoeging van sporen (3x10⁵ sporen/ml) in het digestaat in de vergister en (2) door toevoegingen van hele uien met daarin een startconcentratie van circa 3x10⁴ sporen/gram ui (waarin de schimmelsporen dus beschermd zijn door de verder nog intacte ui. De overleving werd bepaald door uitplaten van slurry en uienbollen op Komada medium (Komada, 1976). De monsters werden genomen na 0, 1, 3, 7, 14, 20, 35 en 56

dagen geïncubeerd 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 mungbean medium, 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 en (2) ingespoten in hele uien (alleen in het geval van microconidiën).

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, de tweede helft na een tweede cyclus van 10 dagen.

2.7 Overleving tijdens inundatie

In 2019-2020 is er als stageopdracht in Lelystad een overlevingsexperiment uitgevoerd waarin de overleving tijdens inundatie is uitgevoerd. Aan klei- en zavelgrond zijn er verschillende hoeveelheden organische stoffen toegevoegd (geen toevoeging; 10 ton stro/hectare; 50 ton vers gras per hectare / door *Fusarium* aangetaste uien). Daarnaast is de inundatie uitgevoerd bij een constante temperatuur van 16.5 °C of bij een geleidelijk afnemende temperatuur van 16.5 naar 12°C. *Fusarium* is toegevoegd als sporen aan de grond, gegroeid op graankorrels en als rotte uien en beoordeeld op uitgroei na zowel 8 als 14 weken inundatie.

2.8 Microbioom analyse

Van alle in 2019 verzamelde grondmonsters zijn minimaal drie monsters per perceel opgestuurd naar Biomemakers 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 BeCrop Methode geanalyseerd en bij WUR met een in-house pijplijn. Deze 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 programma R zijn daarna de gegevens beoordeeld op significante correlatie met ziektedruk en in het veld waargenomen hoeveelheden *F. oxysporum* f.sp. *cepae*.

3 Resultaten

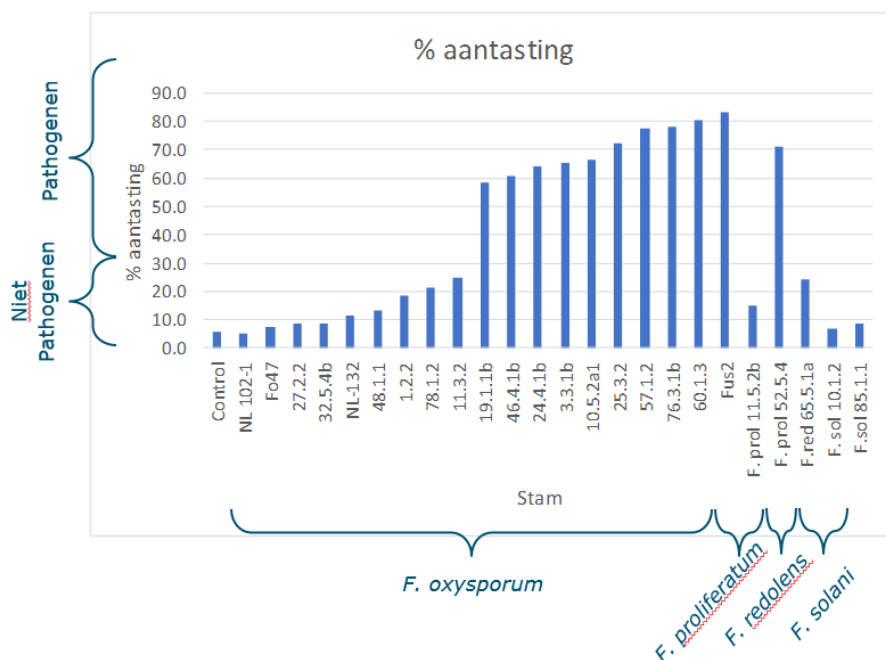
3.1 Analyse pathogeniteit uien isolaten

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



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

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

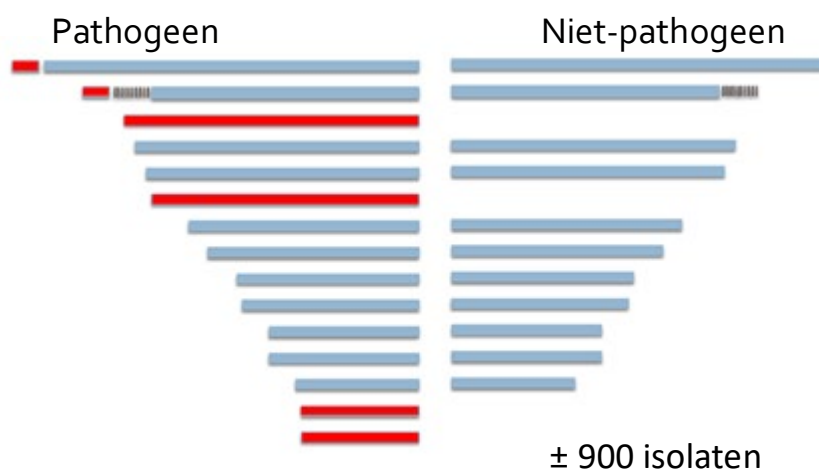


Figuur 3. *Fusarium* biotoets op ui: Gemeten aantasting van uienbollen in de biotoets is een maat voor pathogeniteit van de isolaten.

3.2 Bioinformatica

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

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



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

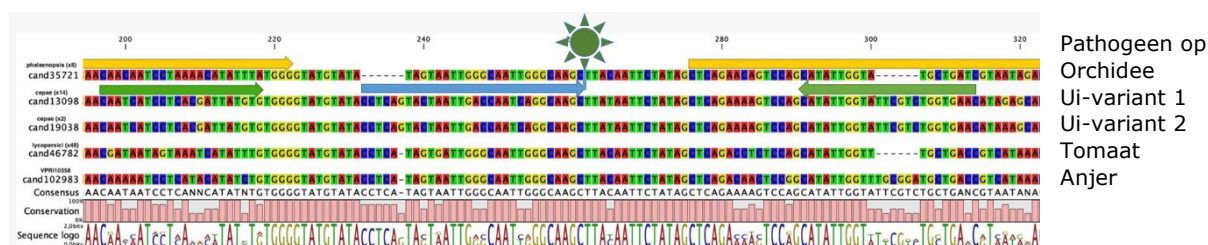
Er is een groep van zeven genen, die specifiek zijn voor de isolaten die pathogeen zijn op ui en die een rol kunnen spelen in de infectie van de ui (Tabel 1). Deze genen komen voor in alle Nederlandse isolaten, maar ook in isolaten uit Engeland en andere delen van de wereld die meegenomen zijn in de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

*Tabel 1. Genen of vormen van genen (allelen) specifiek betrokken bij de pathogeniteit van *Fusarium* op ui. Vetgedrukt de genen waarop gemaakte primer/probe combinaties de beste detectie gaven.*

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

3.3 Ontwikkeling diagnostische toets

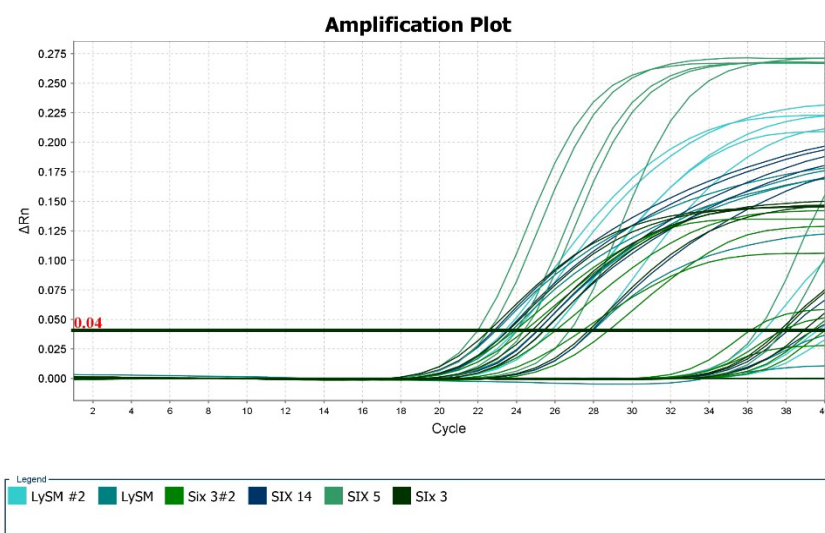
Met de gegevens uit onderdeel 2.3 zijn 7 genen/varianten van genen (ook wel allelen genoemd) geïdentificeerd die uniek zijn voor *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, het belangrijkste *Fusarium* pathogeen op ui in Nederland. Van deze genen en genen met enige sequentiegelijkenis met niet-ui pathogenen zijn vervolgens sequentie alignments gemaakt waarbij de verschillen tot op de nucleotide inzichtelijk gemaakt worden. Als eerste test zijn vervolgens een zestal Taqman primers en probes ontworpen. De probe is gelabeld met een kleurstof die ervoor zorgt dat een succesvolle reactie direct kan worden waargenomen en gekwantificeerd (Voorbeeld voor het six5 gen in Figuur 5).



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

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

De Taqman methode is een kwantitatieve test, die 40 vermeederingsronden 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 6). Sommige primer/probe combinaties geven laat in de reacties een licht achtergrond signaal als er geen DNA materiaal in de reactieaanwezig is. De twee primer/probe combinaties die een goede gevoeligheid combineren met een laag achtergrondsignaal en die gebaseerd zijn op twee effector genen, *six5* en *lysM* 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: prima), hoe reproduceerbaar de gegevens zijn (zelfde resultaten op verschillende apparatuur en uitvoerenden: prima) en hoe hun selectiviteit is (testresultaten in verschillende matrices zoals in plant materiaal of in grond: goed).



Figuur 6. Geschiktheid van primer / probe combinaties voor de detectie van *LysM* en *Six5* genen. Naarmate de curve eerder oploopt is de primer probe combinatie gevoeliger.

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

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.

In het geval dat men een 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 fungiquant als *F.oxysporum* f.sp. *cepae* primers en probes geeft dan de uitslag 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 sprake is van een schimmel; maar mogelijk een oömyceet, een bacterie of een ander organisme.

Als interne controle voor extractie uit plantmateriaal kan een op het *cox*-gen gebaseerde primer/probe set worden toegevoegd als extractie & amplificatiecontrole. Het *cox*-gen is een essentieel gen in de mitochondriën van planten en werkt op veel verschillende plantensoorten. 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 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 plantmaterialen geeft tot nog toe de Qiagen Gentre Puregene kit de beste resultaten.

Omdat grond heel wisselend van samenstelling is, voegen we als interne extractie-en amplificatie controle bij voorkeur een bekende hoeveelheid van een andere schimmel toe. In dit geval voegen we een sporensuspensie van de schimmel *Trichoderma atroviride* toe. Het gen wat we vervolgens uit deze schimmel detecteren is het *tga3*-gen. Positief signaal van controle en van *F.oxysporum* f.sp. *cepae* primers & probes, betekent dan positieve detectie van het pathogeen. Enkel 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. Voor grond geeft tot nog toe de Qiagen Magattract Powersoil kit de beste resultaten.

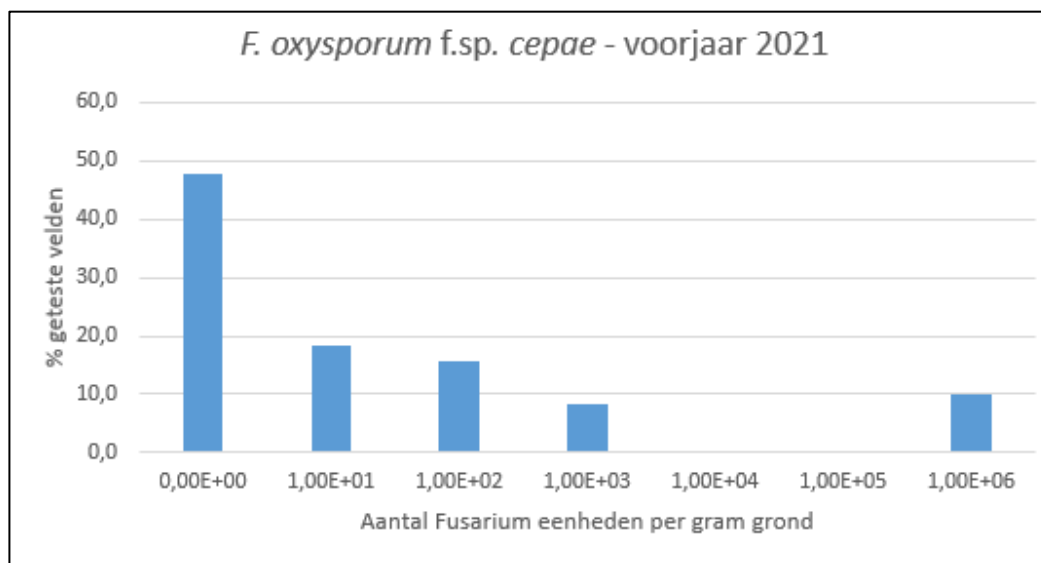
In grond, maar ook in de plant aan het begin van een infectie, kan de hoeveelheid *F.oxysporum* f.sp. *cepae* lager zijn dan de detectielimiet. Door een 72-uur kweekstap in te voegen waarin 2.5 gram (grond) of 1 ml (plantextract) geïncubeerd wordt in 9 ml vloeibaar Komada medium, semi-selectief voor *Fusarium* schimmels, wordt deze detectie limiet vergroot tot enkele sporen per gram monster, 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

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

In 2020 gronden 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 1000 a 10.000 sporen / gram grond.

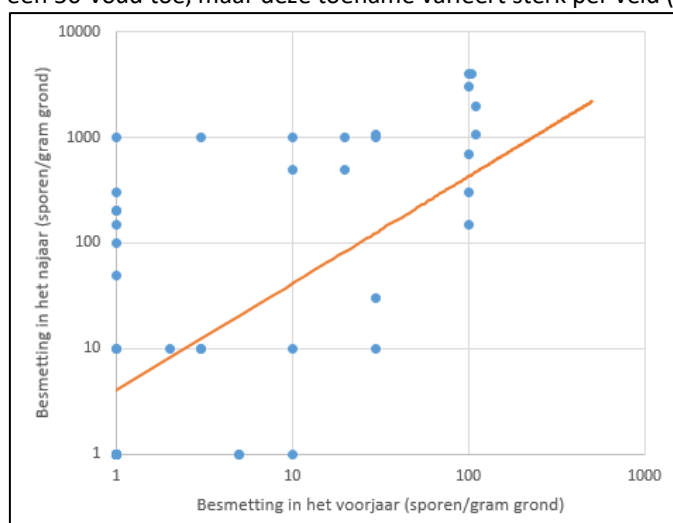
Omdat we een beter idee willen krijgen van schadedrempels in de praktijk, is in 2021 de vraag uitgegaan naar telers voor het aanleveren van grondmonsters waar in dat groeiseizoen uien kwamen te staan. Diezelfde telers zijn in het najaar opnieuw benaderd met de vraag om grondmonsters en om een inschatting van de schade door *Fusarium*. Daarnaast zijn er verschillende proefvelden bemonsterd. In het voorjaar heeft dit 84 grondmonsters opgeleverd, waarvan er in het najaar van 50 een tweede monster ontvangen is. 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 7. 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 7). In 18% en 15% respectievelijk werd tot 10 sporen of tussen de 10 en 100 sporen per gram grond waargenomen. 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.).

Helaas was de hoeveelheid respons om in het najaar een monster in te sturen een stuk lager en hebben we daardoor minder seizoensdata verzameld: Van het begin tot het einde van het groeiseizoen in 2020 nam de hoeveelheid *F. oxysporum* f.sp. *cepae* sporen in de grond gemiddeld een 50-voud toe, maar deze toename varieert sterk per veld (Figuur 8).



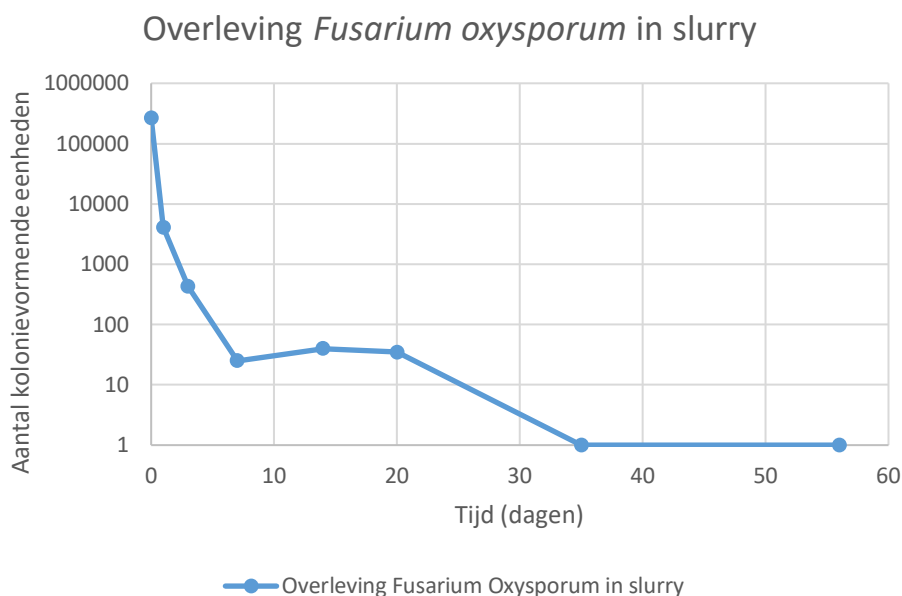
Figuur 8. Gemiddelde toename van het aantal sporen van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* in de grond tussen het begin en het einde van het groeiseizoen.

De data van de hoeveelheid uitval door *Fusarium* in de opslag gecorreleerd aan de hoeveelheden sporen in de bodem, wordt in 2022 geanalyseerd als alle uien uit de opslag beoordeeld zijn.

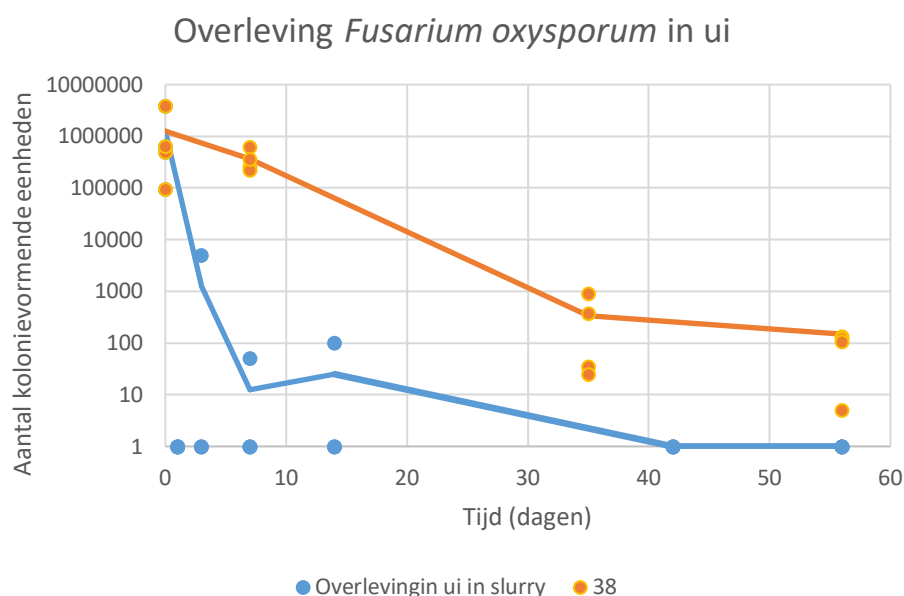
3.5 Overleving in de vergister

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

De eerste resultaten laten zien dat in de digestaat een snelle afname van het aantal levensvatbare sporen plaatsvindt; zo'n 99.99% afname in de eerste week (Figuur 9). Echter na minstens 21 dagen zijn er van de oorspronkelijke 3×10^5 sporen/ml nog steeds aantallen van circa 30 sporen/ml in leven. Ook als de sporen in hele uien in de vergister terecht komen, vindt er een snelle afdoding plaats van circa 99.99% in de eerste week (Figuur 10). Dit afsterven in de vergister vindt sneller plaats dan in uien die opgeslagen worden bij een temperatuur van 38°C, de gemiddelde temperatuur in de vergister, wat aangeeft dat ook andere factoren dan alleen temperatuur een rol spelen in de afdoding.



*Figuur 9. Overleving van *Fusarium oxysporum* f.sp. cepae in de slurry in de vergister. In de eerste dagen vindt een snelle afdoding plaats van losse sporen, maar na drie weken tijd zijn er nog steeds levende sporen aanwezig (99.99% afdoding). Na 5 weken zijn er geen levende sporen meer aanwezig*



*Figuur 10. Overleving van *Fusarium oxysporum* f.sp. cepae in hele uien toegevoegd aan de vergister (blauw) en uien die bewaard worden bij 38°C in een incubator. In de eerste dagen vindt in de vergister een snelle 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 overleving meer aangetoond worden.*

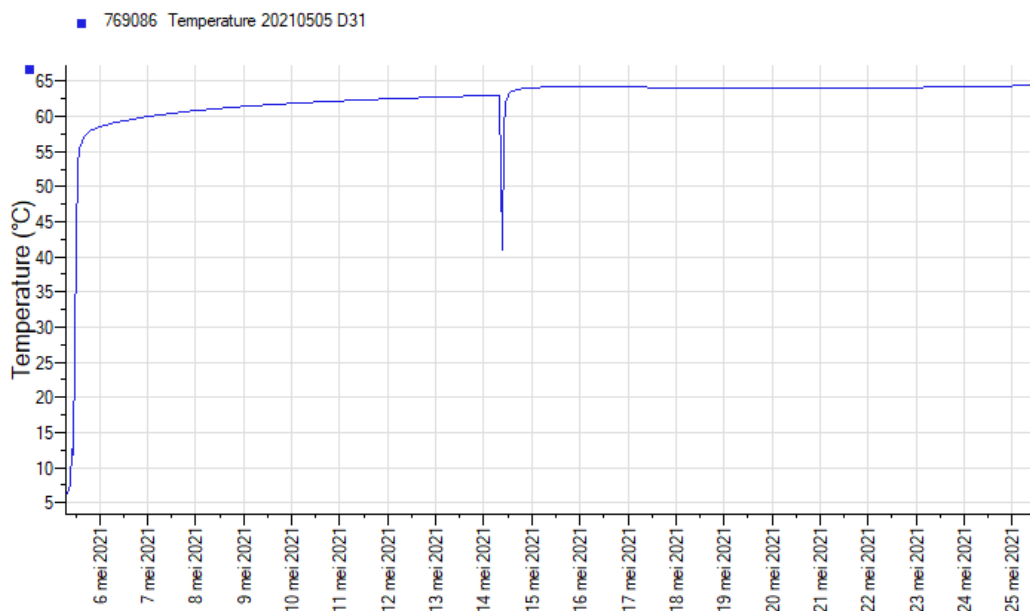
3.6 Overleving tijdens compostering

De overlevingsexperimenten in compost zijn door alle Covid-19 perikelen niet in 2020 uitgevoerd maar moesten worden uitgesteld tot voorjaar 2021. De experimenten zijn uitgevoerd bij een commercieel compostbedrijf. Alle monsters met schimmelmateriaal zijn in speciale punten ingegraven in de composthoop (Figuur 11). Tijdens het composteren is de temperatuur gedurende meerdere dagen tussen de circa 60 en 65°C (Figuur 12).



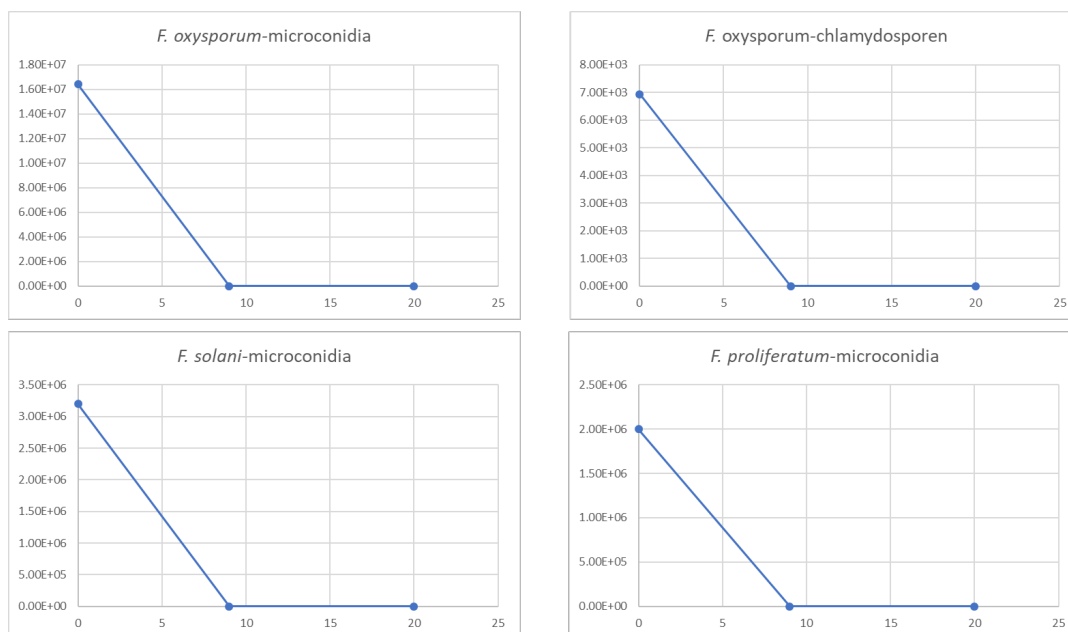
Figuur 11. Sfeerimpressie overlevingsexperimenten compost. Linksboven de circa 30 cm lange punten waarin de monsters zijn ingegraven. Rechtsboven hittevorming tijdens het composteren. Links-beneden de punten zoals ze in de verse composthoop worden gestopt. Rechts-beneden de punten worden met een graafmachine en speciale houder op circa 1 meter diepte ingegraven.

20210505 D31

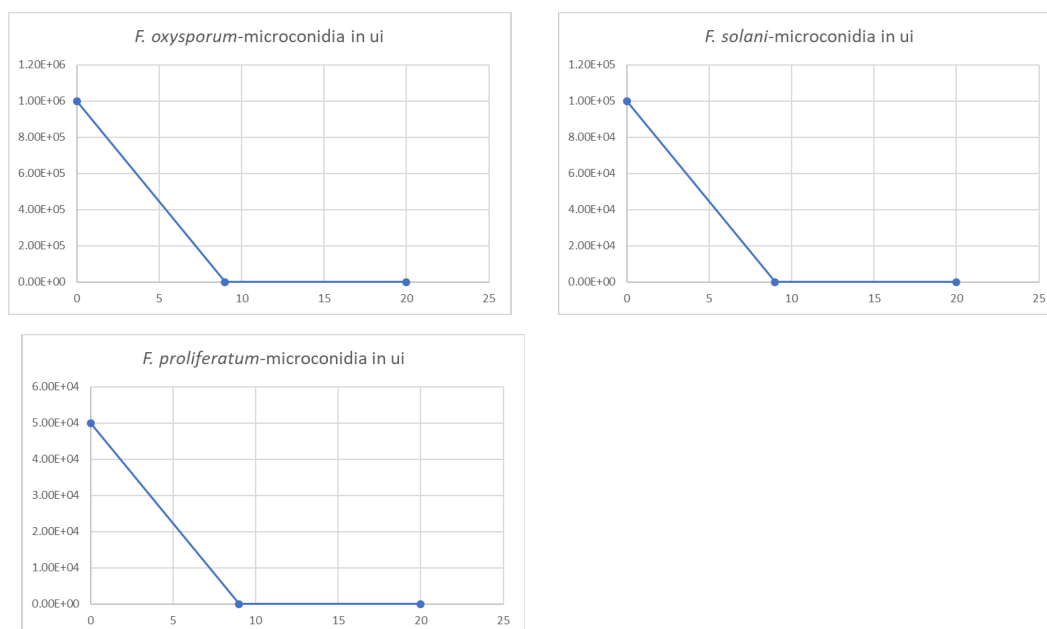


Figuur 12. Temperatuur in de composthoop tijdens de twee cycli waarin de *Fusarium* monsters in de composthoop zaten. De dip in de temperatuur wordt veroorzaakt door het omzetten van de composthoop waarvoor de punten uit de hoop moesten worden gehaald en daarna weer terug geplaatst.

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 13). Na een tweede composteringsronde werd er geen levend materiaal meer aangetroffen. 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 14)



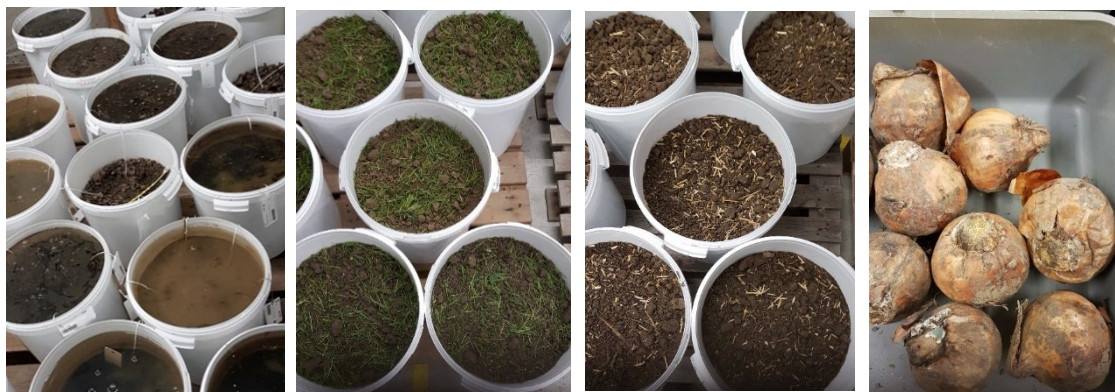
Figuur 13. Overleving van microconidiën en chlamydosporen van *F. oxysporum* f.sp. *cepae* (boven links en rechts) microconidien van *F. solani* en *F. proliferatum* (onder links en rechts) direct gemengd in compost materiaal tijdens compostering (tijd in dagen).



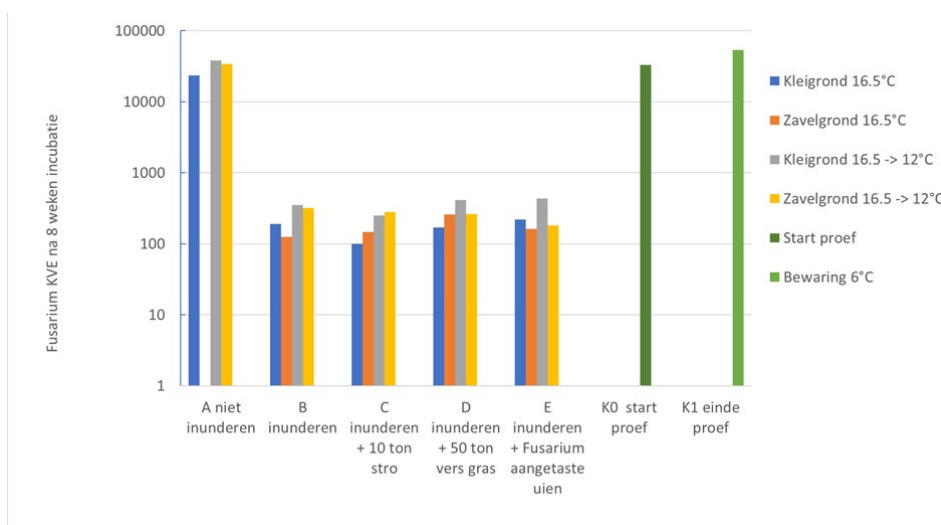
Figuur 14. Overleving van microconidiën van *F. oxysporum* f.sp. *cepae*, *F. solani* en *F. proliferatum* in hele uien gemengd in het compostmengsel (tijd in dagen).

3.7 Overleving tijdens inundatie (simulatie)

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 15) bij een constant temperatuurregime 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 significant 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 16). Langer inunderen had geen verder afsterven tot gevolg. Voor een volledig verslag zie Uireka rapportage Topper & Evenhuis, 2022.



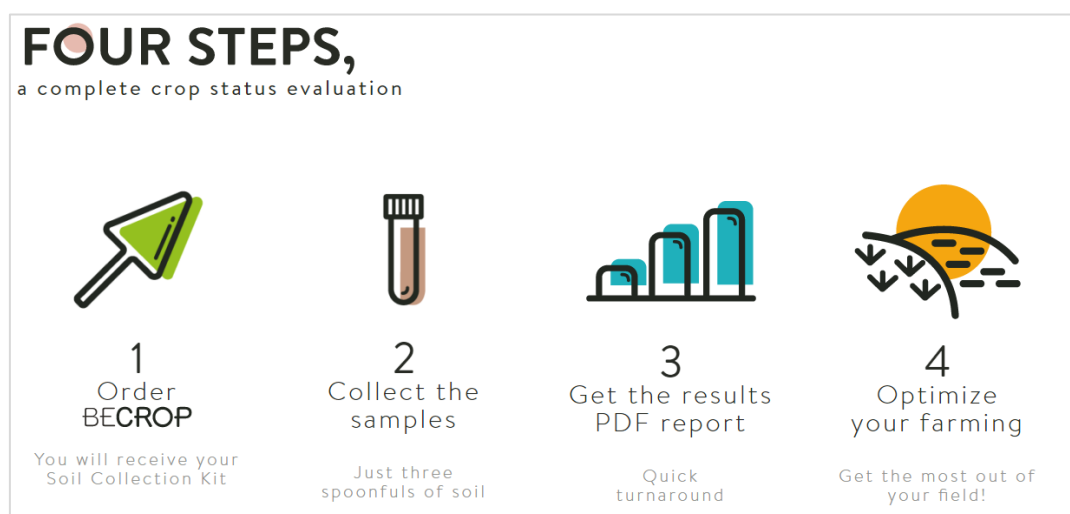
Figuur 15. De emmers met verschillende grondsoorten en onder te werken organisch materiaal. Als simulatie voor de overleving zijn er onder andere natuurlijk *Fusarium* besmette uien gebruikt (rechts).



Figuur 16. 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 schaal is logistisch.

3.8 Microbioom analyses

Geen officieel onderdeel van het oorspronkelijke werkplan, maar in 2020 is WUR met de firma Biome Makers een samenwerking gestart. Via EU-project Fields4Ever kunnen er aan een set gronden kosteloos microbioom analyses gedaan worden. Daarbij krijgen we als groep de uitgewerkte 'BeCROP' gegevens zoals Biome Makers deze aanbiedt aan particulieren met informatie over onder andere biodiversiteit van de bodem (Figuur 17), maar ook de ruwe sequentiedata van aanwezige bacteriën en schimmels in de grondmonsters.

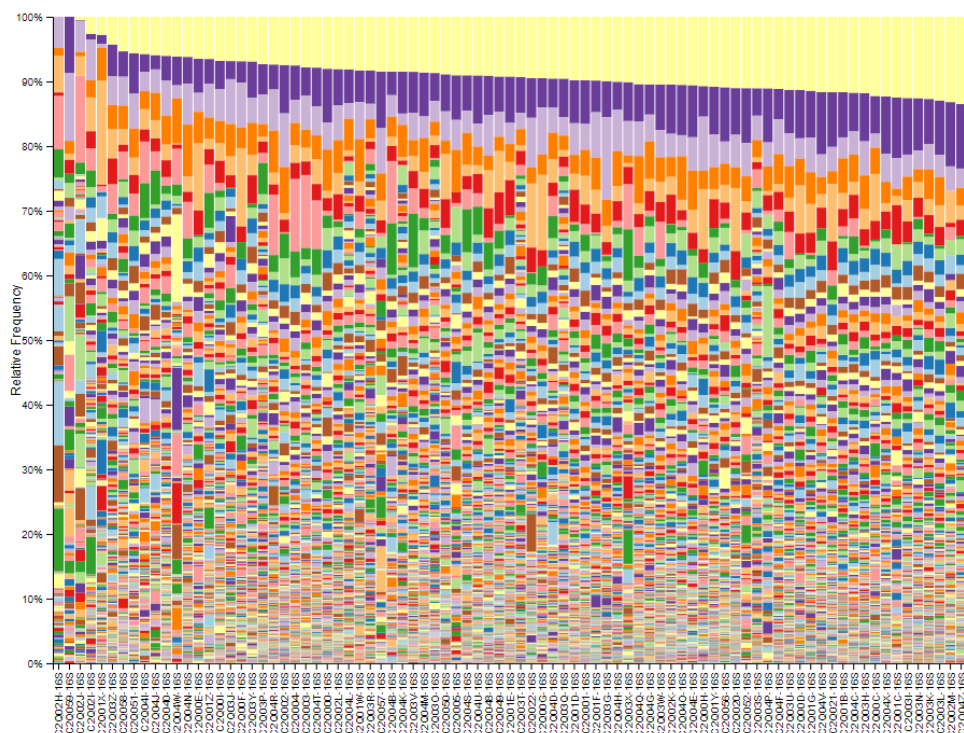


Figuur 17. De procedure van de BeCrop analyse: (1) Via Biomemakers zijn kits te bestellen waarmee (2) grondmonsters te nemen zijn. Deze monsters zijn op te sturen naar de vestiging van het bedrijf in Spanje, waarna na circa 3 weken (3) een rapport met de analyse gegevens op te halen is op de website en naar eigen inzichten (4) te gebruiken zijn.

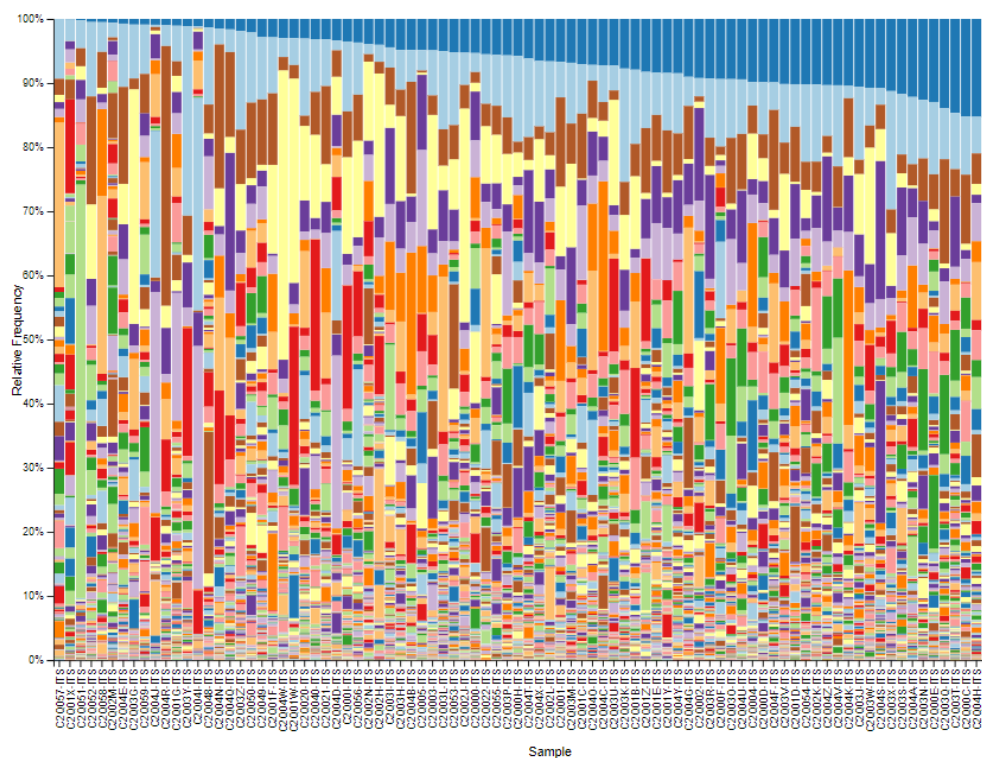
Van alle in het najaar 2020 verzamelde grondmonsters zijn in drievoud monsters opgestuurd naar Spanje waarna de BeCROP resultaten (Figuur 10) als ook sequentiedata van bacteriën en schimmels zijn ontvangen. Deze gegevens zijn door Luc van den Beld geanalyseerd in het kader van een MSC thesis aan de WUR.

De biodiversiteit in de geanalyseerde gronden bleek behoorlijk hoog en honderden groepen bacteriën en schimmels konden op grond van de sequenties worden geïdentificeerd tot op het niveau van genus (bacteriële diversiteit Figuur 18, Schimmeldiversiteit Figuur 19). Monsters uit een zelfde perceel waren meestal 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 19).



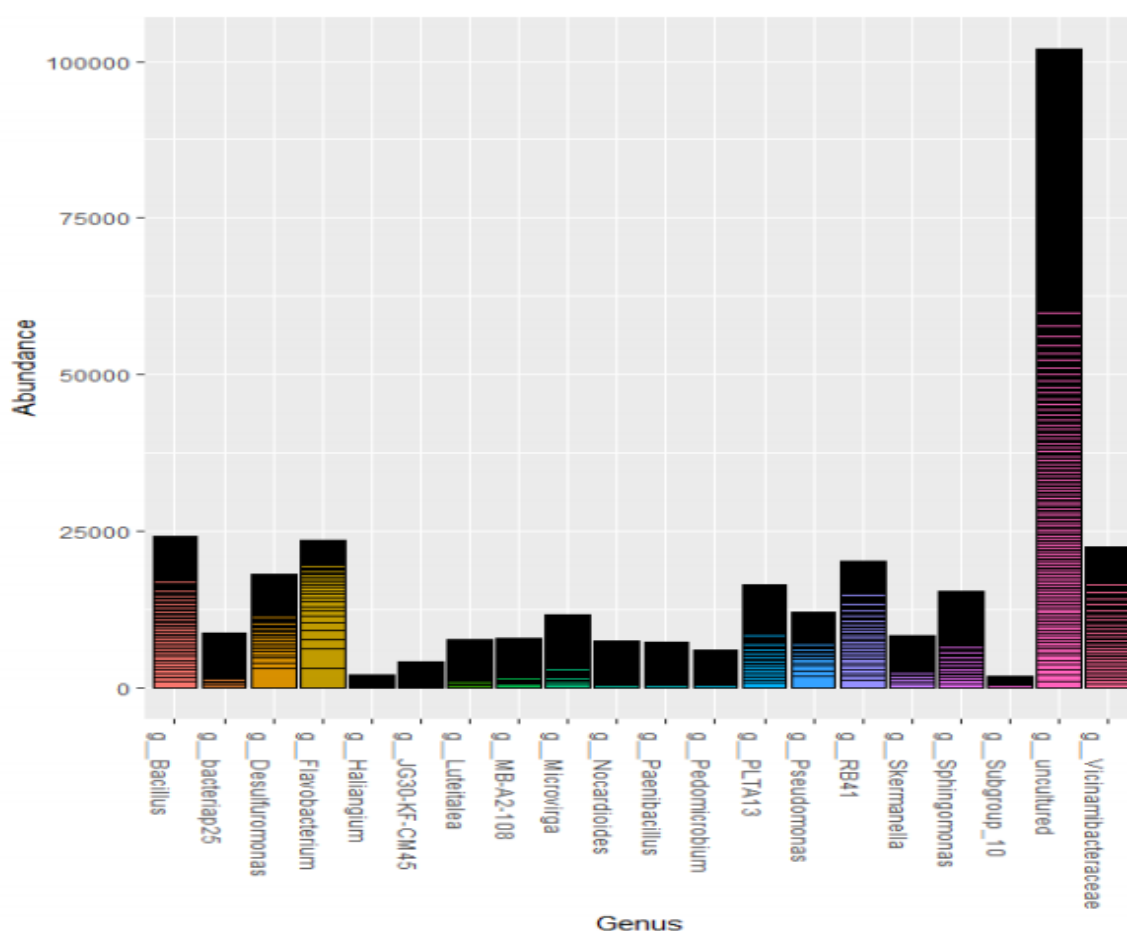
Figuur 18. Bacteriële diversiteit in alle 2020 monsters (Najaar). Elke kleur staat voor een bacterie genus.



Figuur 19. Schimmel-diversiteit in alle 2020 monsters, de felrode balk in de kolommen zijn verschillende soorten van het genus *Fusarium* (Najaar).

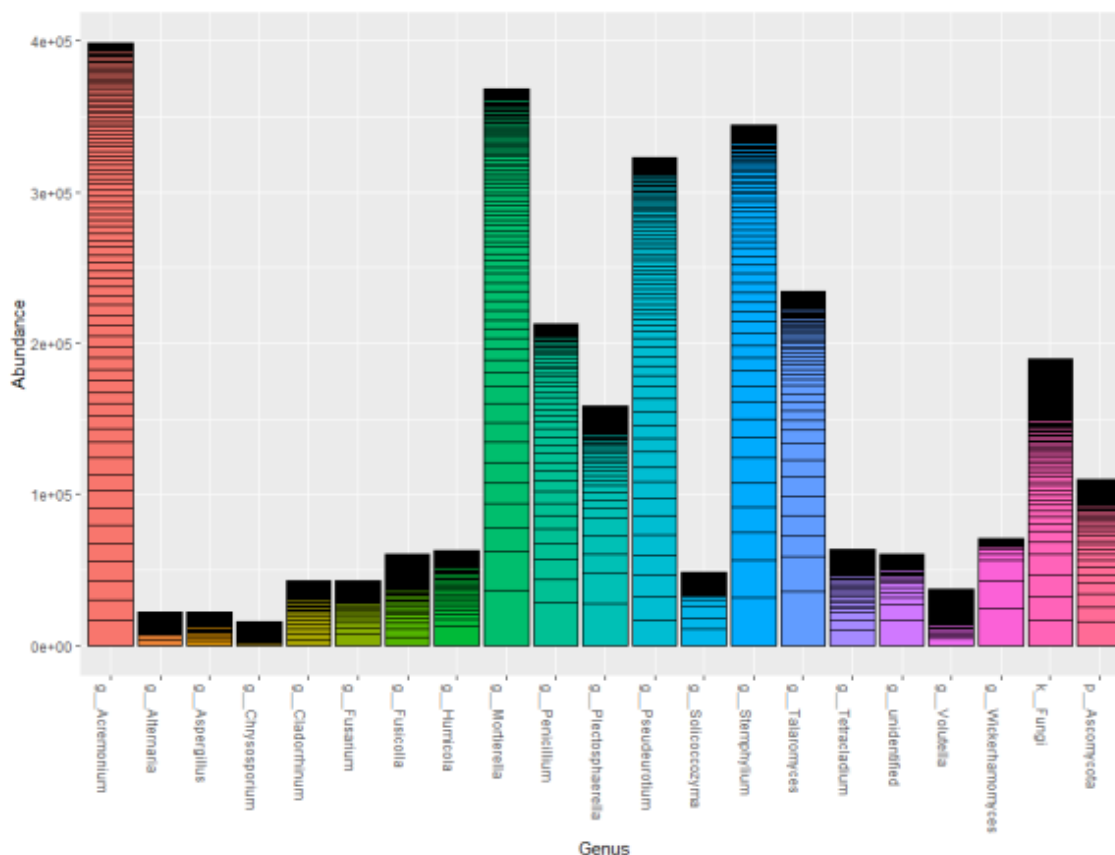
Van de verzamelde grondmonsters hebben we wel een deel metadata over de grondsamenstelling en over de rotaties. Voor deze data is gekeken welke er gecorreleerd lijken te zijn met de met de Bio-TaqMan vastgestelde hoeveelheden *F. oxysporum* f.sp. *cepae*. Echter omdat de dataset beperkt was tot een 31-tal grondmonsters is de kracht van de analyse vrij beperkt.

Qua voorkomende bacterie-genera bleek een drie tal 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 is, is op grond van deze data niet te zeggen (Figuur 20). 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 21).



Figuur 20. De twintig belangrijkste bacteriegenera en de drie genera die negatief gecorreleerd zijn met de hoeveelheid *F. oxysporum* f.sp. *cepae*.

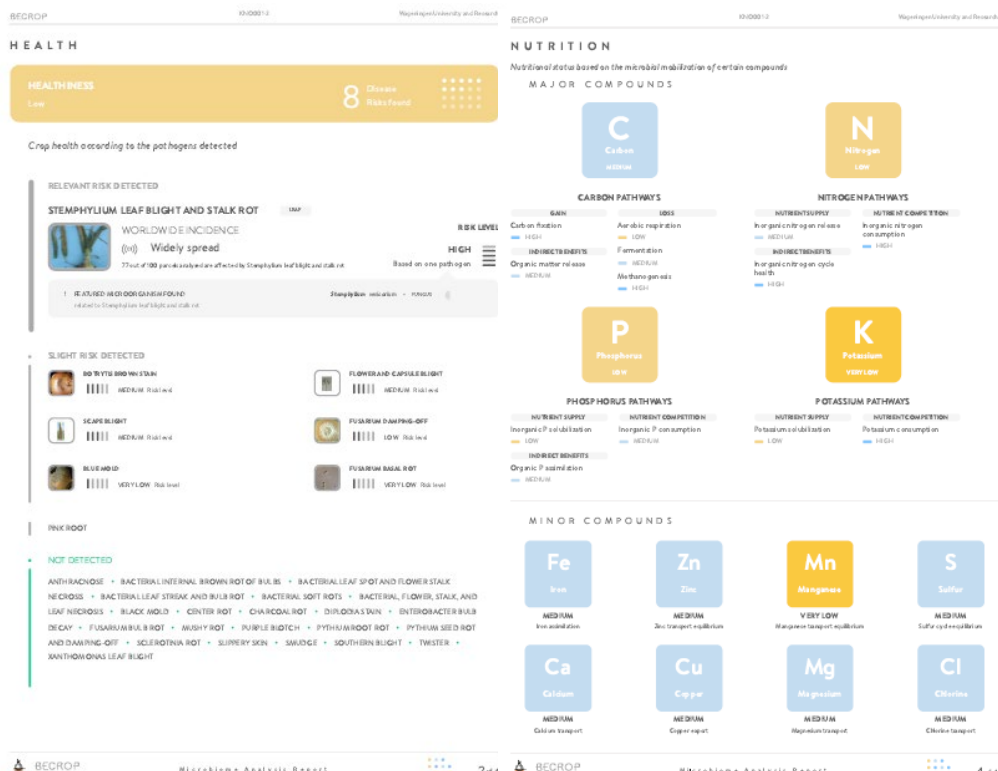
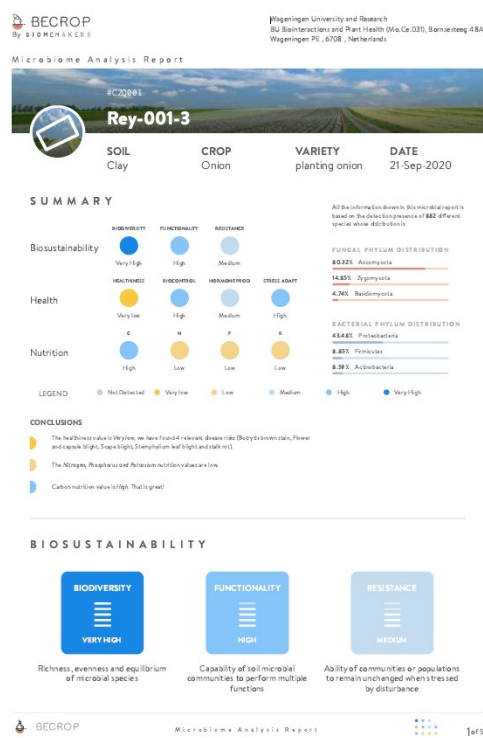
Genus	P-Value	% increase of taxon for every <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i> spore/gram soil increase
<i>Sphingomonas</i>	0.047	-0.000008
<i>Microvirga</i>	0.016	-0.000012
<i>Desulfuromonas</i>	3.36e-06	-0.000022



Figuur 21. 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*.

Genus	P-Value	% increase of taxon for every <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i> spore/gram soil increase
<i>Tausonia</i>	0.0022	-0.000030
<i>Candida</i>	0.0011	-0.000021
<i>Wickerhamomyces</i>	0.0007	-0.000019
<i>Apiotrichum</i>	0.0044	-0.000019
<i>Vishniacozyma</i>	0.0323	-0.000017
<i>Coprinellus</i>	0.0145	-0.000020
<i>Botrytis</i>	0.0009	-0.000040

Van alle verzamelde grondmonsters in het voor- en najaar van 2021 zijn microbiotoomanalyses en becrop data (Figuur 22) verzameld. Deze zullen in 2022 worden vergeleken met zowel de data over voorkomende aantallen *F. oxysporum* f.sp. *cepae* als met verzamelde data over schade in veld en opslag.



Figuur 22. Voorbeeld van een deel van de Becrop-analyse aan een van de bodemmonsters.

4 Discussie en interpretatie

Met de biotoetsen zoals in 2020 uitgevoerd op hele uien is vast te stellen welke van de eerder geïsoleerde *Fusarium* stammen pathogeen zijn en welke niet. Volgens de Engelse onderzoekers geven de testen op hele uien en op zaailingen 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 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 dus groot: daar bleken slechts 94 van de 329 isolaten (29%) *F. oxysporum* f.sp. *cepae* te zijn op grond van de gebruikte Engelse PCR testen op *six5* en andere genen. Dit komt waarschijnlijk omdat er met het uitplaten ook tal van secundaire infecties door bacteriën en schimmels en aanwezige niet-pathogenen, waaronder andere algemeen voorkomende *Fusarium* soorten, mee kunnen liften.

In 2021 zijn velden gemeten aan het begin en het einde van de teelt voor *F. oxysporum* f.sp. *cepae*. In velden werd tijdens het groeiseizoen een gemiddelde toename van het pathogeen tijdens de uienteelt waargenomen van circa 50x. In een deel van de velden werd geen *F. oxysporum* f.sp. *cepae* aangetoond, ook niet in uien na de teelt. In gronden waar *F. oxysporum* f.sp. *cepae* werd aangetroffen, kon vaak ook in rotte uien het pathogeen worden aangetoond. Aangezien nog niet alle data van uiteindelijke uitval van uien door *F. oxysporum* f.sp. *cepae* bekend was – oogsten van de proefvelden worden pas in mei 2022 beoordeeld – zijn die data nog niet verwerkt.

De bioinformatica studie van de genomen van de verschillende op ui voorkomende *Fusarium* soorten, pathogenen van andere waardplanten en niet-pathogene soorten laat zien dat het genoom in drie delen te classificeren is. Allereerst zijn er de eigenschappen die door alle *Fusarium* isolaten gedeeld worden en waarin nauwelijks tot geen variatie zit, de zogenaamde huishoudgenen. Daarnaast zijn er eigenschappen die niet door alle isolaten gedeeld worden. In pathogene soorten zitten bijvoorbeeld gedeelde eigenschappen die hun virulentie bepalen. Tenslotte zijn er genen die specifiek gelinkt zijn aan een bepaalde gastheersoort. Voor *F. oxysporum* f.sp. *cepae* bleken zeven genen/allelen (Tabel 1) specifiek te zijn en niet in andere pathogenen en niet-pathogenen voor te komen. Dit geeft aan dat deze genen specifiek betrokken zijn bij het infectieproces van *Fusarium* op ui. Op twee van deze eigenschappen is nu een moleculaire diagnostische tests ontwikkeld die specifiek de uienpathogenen kunnen detecteren. Vier van deze zeven genen cq allelen zijn niet eerder geïdentificeerd als verantwoordelijk voor pathogeniteit. De eerste sets van Taqman primers en probes die op de specifieke genen ontwikkeld zijn lieten inderdaad allemaal de verwachte specificiteit zien: zowel inclusiviteit (detectie van verschillende *F. oxysporum* f.sp. *cepae* isolaten uit Nederland, maar ook van daarbuiten) als ook exclusiviteit (geen detectie van pathogenen van andere waardplanten of niet pathogenen). De 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 sinds 2021 ook elk een interne controle toe te voegen aan de detectiemethode.

Volgens de proeven in 2020, vindt tijdens mesofiele vergisting van plantaardige materialen 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 dan dus nog niet ziektekiem vrij te gebruiken. Dit geeft aan dat als er zwaar besmet materiaal met veel schimmelsporen in de vergister beland en er vanaf dag 1 ook een continue uitstroom van besmet materiaal is met het toevoegen van nieuwe materialen, er naar schatting 2-5% van deze sporen levend in digestaat aanwezig zal zijn.

Tijdens de proeven in 2021 bij een professionele compostering met zowel losse sporen (conidiosporen en chlamydosporen) als met sporen in bollen, blijkt de afdoding een stuk efficiënter dan bij mesofiele compostering. Na een ronde compostering bij een temperatuur van 60-65° is meer dan 99.99% afgedood. Na een tweede ronde kon er helemaal geen levend materiaal van *Fusarium* meer worden aangetoond.

Een simulatie van veldinundatie in bakken met verschillende soorten grond, verschillende toevoegingen aan de grond, waaronder aangetaste uien, bij temperaturen van 16.5°C en lager is uitgevoerd. De verschillende inundatie behandelingen variëren niet significant van elkaar en laten zien dat *Fusarium* besmetting in een periode van 8-14 weken inundatie ongeveer 100x afneemt. In niet geïnundeerde grond nam de *Fusarium* populatie niet of nauwelijks af. Uit onderzoek aan *Fusarium* in banaan is wel gebleken dat *Fusarium* door het veld verspreidt kan worden bij inundatie. In de simulatie in emmers is hier niet naar gekeken. In 2022, zullen verschillende percelen die geïnundeerd worden ook geanalyseerd worden op het effect van inundatie op de *Fusarium* populatie.

Microbioomdata van de verschillende grondmonsters uit 2020 zijn gegenereerd en geanalyseerd. Analyse laat zien dat bepaalde in de bodem aanwezige verbanden tussen de bodempopulaties van bacteriën en schimmels negatief gecorreleerd zijn met *Fusarium*: deze organismen zijn meer aanwezig als *Fusarium* laag is en andersom. Van de grondmonsters verzameld in 2021 zijn ook microbioomdata verzameld die verder verwerkt zullen worden zodra de data over ziektedruk in veld en opslag compleet is.

5 Conclusies en aanbevelingen

Fusarium oxysporum f.sp. *cepae* is het in Nederland meest gevonden *Fusarium* pathogeen op ui en ook in de biotoets was het de soort die de zwaarste aantasting in de ui veroorzaakte. Dankzij de genomische analyse van ui-pathogenen en niet-ui-pathogenen hebben we 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 hebben we een diagnostische toets ontwikkeld

Deze toets 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 bovendien 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 vermenigvuldigt blijkt het bovendien mogelijk om kwantitatief in grondmonsters te kunnen meten vanaf enkele sporen per gram grond (Bio-TaqMan).

Met de verbeterde detectie kan er ook verder gewerkt worden aan de analyse van grond- en plantmonsters uit verschillende vruchtwisselingsproeven en uit de praktijk om in kaart te brengen wat het verloop van de pathogenen onder verschillende teeltomstandigheden is, maar ook gekeken worden naar drempelwaarden 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 in 2021, laat zien dat tijdens het groeiseizoen *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* al snel met 50-voud toeneemt. Desalniettemin zijn er grote verschillen tussen percelen in de mate van vermeerdering na een uienteelt en soms zelfs een afname.

Qua reststroomverwerking, blijkt aan mesofiele vergisting het risico te kleven dat een klein percentage van *Fusarium* sporende behandeling overleeft. Zeker als zwaar aangetast materiaal op dergelijke wijze vergist wordt, bestaat er 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 materiaal van *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 in bakken met verschillende typen met *Fusarium* besmet materiaal geen totale afdoding van *Fusarium* geven, maar wel de druk van het pathogeen een 100-voud verlagen. Risico is wel dat de *Fusarium* meer egaal over het perceel verspreid wordt.

Microbioanalyses van 2020-monsters laten zien dat er verschillende groepen bacteriën en schimmels een negatieve correlatie hebben met *Fusarium*. Of deze schimmels de oorzaak zijn van verminderde *Fusarium* of juist het gevolg, is op grond van deze data niet te zeggen.

6 Referenties

- Haapalainen, M., Latvala, S., Kuivainen, E., Qiu, Y., Segerstedt, M. and Hannukkala, A.O. (2016), *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. redolens* associated with basal rot of onion in Finland. *Plant Pathol*, 65: 1310-1320.
- Kalman, B., Abraham, D., Graph, S., Perl-Treves, R., Meller Harel, Y., & Degani, O. (2020). Isolation and Identification of *Fusarium* spp., the Causal Agents of Onion (*Allium cepa*) Basal Rot in Northeastern Israel. *Biology*, 9(4), 69. <https://doi.org/10.3390/biology9040069>
- Klokočar-Šmit, Z., Lević, J., Masirevic, S., Grozdanović-Varga, Je., Vasić, M. and Aleksić, S. (2008). Fusarium rot of onion and possible use of bioproduct. *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke*. 2008. 10.2298/ZMSPN0814135K.
- Komada, H. 1976. A new selective medium for isolating Fusarium from natural soil. *Proceedings of the American Phytopathological Society* 3:221
- Liu, C.M., Kachur, S., Dwan, M.G. *et al.* FungiQuant: A broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiol* **12**, 255 (2012). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-255>
- Scholten, O. and Burger, K. (2020) *Fusarium*-onderzoek in de Nederlandse uienteelt. Uireka rapportnummer: 2019-04.
- Taylor, A., Vágány, V., Jackson, A.C., Harrison, R.J., Rainoni, A. and Clarkson, J.P. (2016), Identification of pathogenicity-related genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Molecular Plant Pathology*, 17: 1032-1047.

Bijlage I - 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	Zaaidatum:	Grondontsmetting, jaar
	Partijnummer:	Sjalot/ Anders	Biologisch/Gangbaar	Biologische GO: Inundatie:
	Rotatieschema Gewas(sen)/jaar:	Bemesting/ Groenbemester(s):	Grondbewerking: ⁶ Ploegen/eggen/rotorkoep /anders.... Ploegdiepte: Niet/wel kerend Graag periode voor/najaar aangeven	Gewasbestrijding Bovengronds: Ondergronds: Pootgoed-/Gewas- voorbehandeling:
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):	Verslamping:
OPSLAG ⁷	Rooi datum:	Geplande datum einde opslag:	Opslag temperatuur:	Kiemremmersmiddelen:
	Inschuurdatum:	Opslag: Los/kisten/anders:	Opslag luchtvochtigheid:	☐ MH ☐ 1,4 sight ☐ 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:			

Resultaten worden vertrouwelijk behandeld.

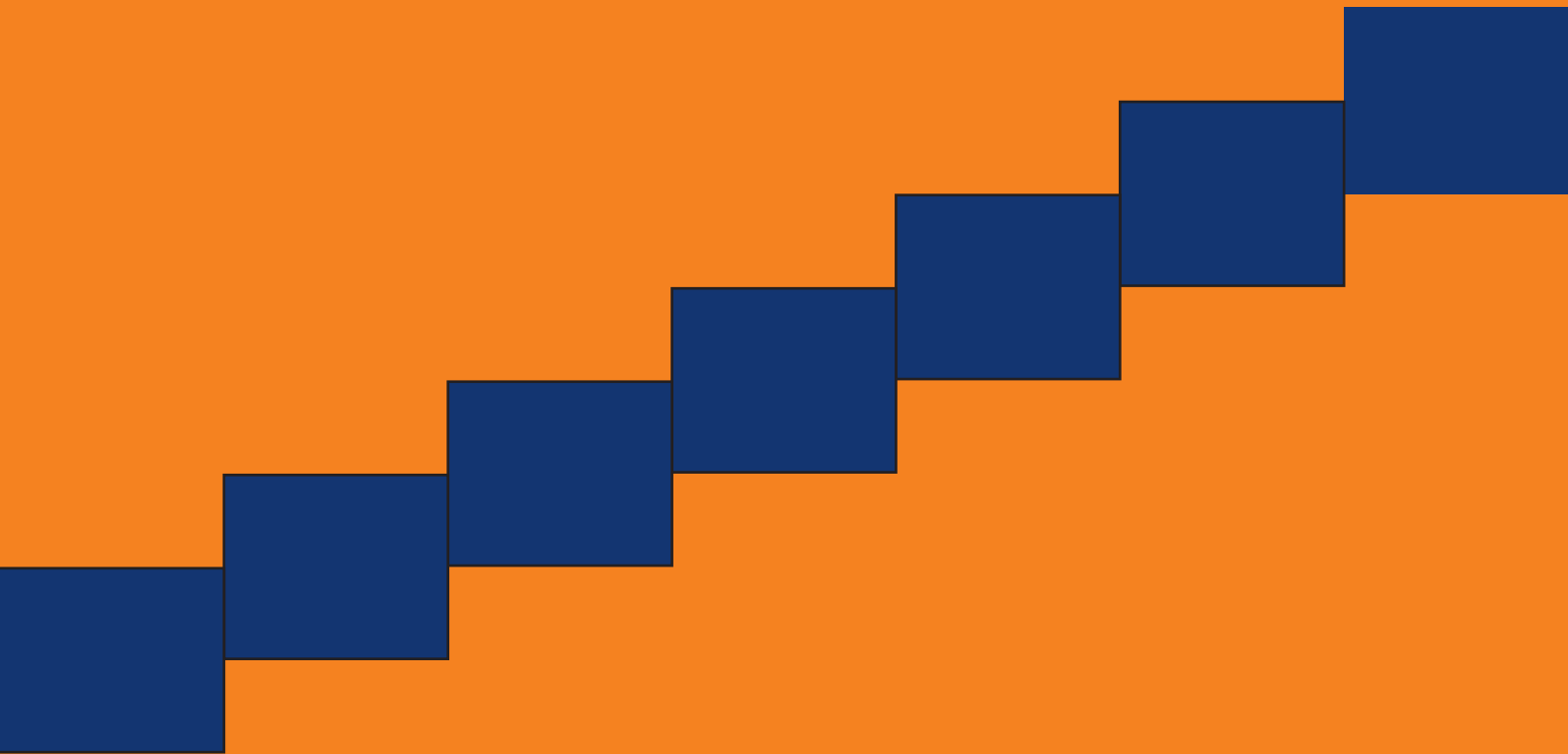
Contactpersoon: Anne van Diepeningen, BU Biointeracties en plant gezondheid (Mo.Ce.031)
Bornsesteeg, 48A, 6708 PE Wageningen, anne.vandiepeningen@wur.nl, tel: 06-14614413.

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 Uireka, een initiatief van de Holland Onion Association.

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

www.uireka.nl



is part of



Uireka wordt mede mogelijk gemaakt door:



+ meer dan 70 ketenpartners!

