


Asperagus decline

Characterization of harmful *Fusarium* strains of aspergus and development of TaqMan PCR's




Leonie Didden
Microbiologie
15-8-2017

hogeschool
Liden

Begleiding: Harrie Kovermaat & André van Vliet

nak / tuinbouw

Fusarium project




Aspergus decline met Fusarium
Fusarium

- Asperagus decline
 - Reduction of production years
 - Soilborne *Fusarium* is ~~equal~~ *causal* organism
- *F. oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. redolens*
 - Spread by seed, soil and plants
 - *F. oxysporum* and formae specialis
 - *F. oxysporum* f.sp. *asparagi*

nak / tuinbouw

Fusarium project

- Naktuinbouw tests seeds and soil
 - Seed assay (semi-selective agar en pathogenicity assay)
 - Soil assay
- Molecular assay in development with UVA (Martijn Rep)



nak / tuinbouw

Fusarium project

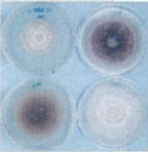
- C. Huang TaqMan PCR voor *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*
 - *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate secreted in xylem 1 (SIX1) gene
 - Useful for Naktuinbouw tomato seeds

- DNA extraction method
 - High-throughput method
 - *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* as model

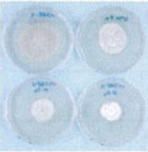
*nak*tuinbouw

Morfology

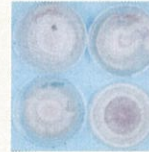
- 91 *Fusarium* isolates



F. oxysporum



F. redolens

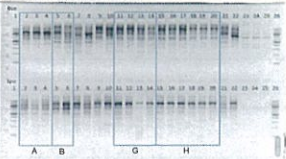


F. proliferatum

*nak*tuinbouw

Eric-Box fingerprinting

- 91 strains give 57 verschillende Eric-Box fingerprints




Number	Species	Eric-Box
1	<i>F. redolens</i>	A
2	<i>F. redolens</i>	A
3	<i>F. redolens</i>	A
4	<i>F. redolens</i>	A
5	<i>F. redolens</i>	A
6	<i>F. redolens</i>	A
7	<i>F. redolens</i>	A
8	<i>F. redolens</i>	A
9	<i>F. redolens</i>	A
10	<i>F. redolens</i>	A
11	<i>F. redolens</i>	A
12	<i>F. redolens</i>	A
13	<i>F. redolens</i>	A
14	<i>F. redolens</i>	A
15	<i>F. redolens</i>	A
16	<i>F. redolens</i>	A
17	<i>F. redolens</i>	A
18	<i>F. redolens</i>	A
19	<i>F. redolens</i>	A
20	<i>F. redolens</i>	A
21	<i>F. redolens</i>	A
22	<i>F. redolens</i>	A
23	<i>F. redolens</i>	A
24	<i>F. redolens</i>	A
25	<i>F. redolens</i>	A
26	<i>F. redolens</i>	A
27	<i>F. redolens</i>	A
28	<i>F. redolens</i>	A
29	<i>F. redolens</i>	A
30	<i>F. redolens</i>	A
31	<i>F. redolens</i>	A
32	<i>F. redolens</i>	A
33	<i>F. redolens</i>	A
34	<i>F. redolens</i>	A
35	<i>F. redolens</i>	A
36	<i>F. redolens</i>	A
37	<i>F. redolens</i>	A
38	<i>F. redolens</i>	A
39	<i>F. redolens</i>	A
40	<i>F. redolens</i>	A
41	<i>F. redolens</i>	A
42	<i>F. redolens</i>	A
43	<i>F. redolens</i>	A
44	<i>F. redolens</i>	A
45	<i>F. redolens</i>	A
46	<i>F. redolens</i>	A
47	<i>F. redolens</i>	A
48	<i>F. redolens</i>	A
49	<i>F. redolens</i>	A
50	<i>F. redolens</i>	A
51	<i>F. redolens</i>	A
52	<i>F. redolens</i>	A
53	<i>F. redolens</i>	A
54	<i>F. redolens</i>	A
55	<i>F. redolens</i>	A
56	<i>F. redolens</i>	A
57	<i>F. redolens</i>	A

*nak*tuinbouw

Analysis

- EF1alpha gen gesequenst 88 strains
 - 58 *F. oxysporum*
 - 13 *F. proliferatum* isolaten
 - 17 *F. redolens* isolaten
- Phylogenetic tree (NJPGMA & Kimura 80)


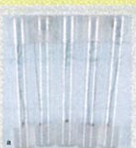


a) Phylogenetic tree van 117 *F. redolens*, 13 *F. proliferatum* en 58 *F. oxysporum* isolaten

Pathogenicity assays

- In vitro assay
- In vivo assay

用tube 進行接種的方法會出現偽陽性

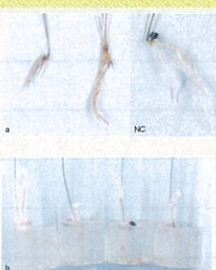


a) Dierixk bewaarden met bacteriële sporegrootte; b) 10 dagen oude sporegrootte in pot

nak / tuinbouw

In vitro assay


- 54 strains of *Fusarium*
 - 5,8 % negative
 - 94,2% positive




a) *F. oxysporum* (sp. *sp.*) in spore grootte; b) in spore grootte met spore grootte met complexen van *F. proliferatum*

nak / tuinbouw


In vivo assay



Vitrotron 28°C



Greenhouse 20-25°C




Vitrotron 25°C


10 zaailingen per pot (9 dagen na zaaien)

nak tuinbouw


Symptoms (6 weeks)




1289



1293



1325



NC

nak tuinbouw

Results in vivo assay

- 20 *Fusarium* strains
 - 11 out of 20 *Fusarium* isolates harmful for asperagus
 - Other formae specialis negative

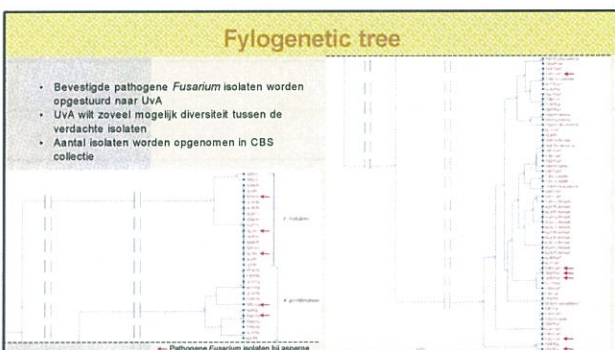
<i>Fusarium</i> isolaat	NFC nummer	Afkomst	aantal planten met symptomen	algemene score (PS)
<i>F. sp. asparagi?</i>	1324	Aspergi? (collectie)	0/10	0,00
<i>F. sp. asparagi?</i>	1326	Aspergi? (collectie)	0/10	0,00
<i>F. sp. illi</i>	1329	Lelie	0/9	0,00
<i>F. sp. cyclaminis</i>	1330	Cyclamen	0/9	0,00
<i>F. sp. asparagi?</i>	1340	Asperge veld	0/10	0,00
<i>F. sp. asparagi?</i>	1345	Asperge Grand (FAG)	1/10	0,10
<i>F. oxysporum (biocentrif slant)</i>	1389	LVA	1/10	0,10
<i>F. sp. copae</i>	1346	LI	1/10	0,00
<i>F. proliferatum</i>	1323	Asper	3/8	0,63
<i>F. oxidans</i>	1328	Asperge veld	10/10	1,10
<i>F. sp. asparagi?</i>	1322	Asperge veld	8/10	1,80
<i>F. medusae</i>	1391	Asperge veld	6/10	2,00
<i>F. proliferatum</i>	1390	Asperge veld	10/10	2,10
<i>F. proliferatum</i>	1342	Asperge veld (FAG)	9/10	2,30
<i>F. oxidans</i>	1348	Asperge veld	9/9	2,70
<i>F. sp. asparagi?</i>	1340	Asperge veld	9/10	2,40
<i>F. sp. asparagi?</i>	1325	Aspergi? (collectie)	10/10	3,30
<i>F. sp. asparagi?</i>	1289	Asperge veld	10/10	3,40
<i>F. sp. asparagi?</i>	1302	Asperge veld	9/9	3,40
<i>F. sp. asparagi?</i>	1295	Asperge veld	9/9	3,00
NC			0/10	0
NC			0/10	0

nak tuinbouw

In vitro versus in vivo (soil) assay

Fusarium isolaat	Afkomst	NFC nummer	Algemene score groentebest	Buizenbets uitslag
Fo f.sp. asparagi	Asperge? (collectie)	1324	0,00	Positief
Fo f.sp. asparagi	Asperge? (collectie)	1329	0,00	Licht positief
Fo f.sp. illi	Lulae	1329	0,00	Zwaar positief
Fo f.sp. cyclaminis	Cyclamen	1330	0,00	Zwaar positief
Fo f.sp. asparagi?	Asperge wortel	1343	0,00	Zwaar positief
Fo f.sp. asparagi	Asperge Groend (FAQ)	1345	0,10	Zwaar positief
Fo f.sp. cerasi	LJ	1348	0,00	Zwaar positief
F. proliferatum	Ayur	1353	0,03	Zwaar positief
F. nidulans	Asperge wortel	1356	1,10	Zwaar positief
Fo f.sp. asparagi?	Asperge wortel	1352	1,00	Zwaar positief
F. nidulans	Asperge wortel	1391	2,00	Zwaar positief
F. proliferatum	Asperge zaad	1355	2,10	Zwaar positief
F. proliferatum	Asperge Zaad (FAQ)	1342	2,30	Zwaar positief
F. nidulans	Asperge wortel	1336	2,70	Zwaar positief
Fo f.sp. asparagi?	Asperge wortel	1348	2,80	Zwaar positief
Fo f.sp. asparagi?	Asperge? (collectie)	1325	3,20	Positief
Fo f.sp. asparagi?	Asperge wortel	1380	3,40	Zwaar positief
Fo f.sp. asparagi?	Asperge wortel	1282	3,40	Zwaar positief
Fo f.sp. asparagi?	Asperge wortel	1305	3,80	Zwaar positief
F. oxysporum (biocontrol strain)	UvA	1390	0,10	Negatief

In vitro assay false positives



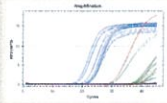
C. Huang TaqMan PCR for *Foxysporum f.sp. lycopersici*

- C. Huang TaqMan PCR
 - 3 suspected FoI isolates + 1 negative isolate (Fo47)
 - NSC-1390 t/m 1399 isolates from seeds (complaint)

Afkomst	Numer isolaat	Fusarium soort	FoI (FAM) Ct-waarde	28S (TR) Ct-waarde		
Tomaat	FoI51	<i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i>	23,42	23,44	15,77	15,00
Tomaat	FoI89	<i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i>	23,31	23,37	15,35	15,33
Tomaat (UvA)	FoI4267	<i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i>	25,29	25,27	15,36	15,60
UvA	Fo47	<i>Fusarium oxysporum</i> (biocontrol strain)	N/A	N/A	15,71	15,69
Routine isolaat	1394	<i>Fusarium oxysporum</i> (tomaat)	N/A	N/A	17,21	17,20
Routine isolaat	1395	<i>Fusarium oxysporum</i> (tomaat)	N/A	N/A	18,52	18,56
Routine isolaat	1396	<i>Fusarium oxysporum</i> (tomaat)	N/A	N/A	17,52	17,50
Routine isolaat	1397	<i>Fusarium oxysporum</i> (tomaat)	N/A	N/A	17,44	17,47
Routine isolaat	1398	<i>Fusarium oxysporum</i> (tomaat)	N/A	N/A	18,31	18,45
Routine isolaat	1399	<i>Fusarium oxysporum</i> (tomaat)	N/A	N/A	16,44	16,47
Routine isolaat	1390	<i>Fusarium oxysporum</i> (tomaat)	N/A	N/A	17,30	17,36
Routine isolaat	1391	<i>Fusarium oxysporum</i> (tomaat)	N/A	N/A	17,05	17,15
Routine isolaat	1392	<i>Fusarium oxysporum</i> (tomaat)	N/A	N/A	18,00	18,74
Routine isolaat	1393	<i>Fusarium oxysporum</i> (tomaat)	N/A	N/A	18,20	18,21
PICtine (biocontrol strain)			N/A	N/A	35,12	35,17

F. oxysporum f.sp. melonis TaqMan PCR

Afkomst	Nummer isolaat	Fusarium soort	S06 (FAM)		S01AB (V3)		28S (TR)	
Meloen	1319	Fusarium oxysporum f.sp. melonis	28,33	28,34	28,90	28,96	20,02	20,09
Chrysanth	1322	Fusarium oxysporum f.sp. chrysanthemii	44,02	41,85	37,84	35,48	18,02	18,89
Asperge	1324	Fusarium oxysporum f.sp. asparagi	42,80	42,81	38,90	38,50	18,12	18,12
Anjer	1327	Fusarium oxysporum f.sp. dianthi	37,23	38,30	35,88	35,82	20,52	20,40
Dipladenia	1335	Fusarium oxysporum f.sp. dipladenia	45,00	42,45	37,77	36,15	20,46	20,45
Asperge Zaai (FAZ)	1341	Fusarium proliferatum	43,82	43,57	38,45	38,71	19,00	19,89
Asperge wortel	1289	Fusarium oxysporum f.sp. asparagi?	43,80	44,52	37,89	38,39	18,92	19,96
PCRsw			100%	100%	100%	100%	100%	30,94



– Evaluation of new protocol

nak tuinbouw

Bedankt!

- Ik wil graag iedereen van R&D bedanken voor de leuke, gezellige tijd als stagiaire bij Naktuinbouw!




Dank aan:

- UVA voor isolaten en kennis
- Syngenta voor TaqMan PCR's
- Toetslaboratorium voor Fusarium isolaten

nak tuinbouw
