



## Fusarium in de laatste fase voor de oogst



Dr. Theo van der Lee en Dr. Cees Waalwijk

Plant Research International B.V., Wageningen

November 2014

---

# Fusarium in de laatste fase voor de oogst



Dr. Theo van der Lee, Dr. Cees Waalwijk met medewerking van Marga van Gent-Pelzer, Songhong Wei, Els Verstappen, Pieter Kastelein

Foto voorkant: knappend winter tarwe vlak voor de oogst (foto: Theo van der Lee)

Foto boven: een tarwe veld dat is aangetast door Fusarium enkele weken na de bloei (foto: Cees Waalwijk)

© 2014 Wageningen, Plant Research International B.V.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior written permission of Plant Research International B.V.

Copies of this report can be ordered from the (first) author.

## **Plant Research International B.V.**

Address : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen, the Netherlands  
: P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen, the Netherlands  
Tel. : +31 317 48 0732  
Fax : +31 317 41 80 94  
E-mail : [info.plant@wur.nl](mailto:info.plant@wur.nl)  
Internet : [www.pri.wur.nl/UK](http://www.pri.wur.nl/UK)

## Samenvatting

	page
Management samenvatting	1.
Algemene Inleiding	2
I. Vergelijking van graanmonsters enkele weken voor de oogst met monsters tijdens de oogst	
Doelstelling	3
Materiaal en methoden	3
Resultaten	4
Discussie	5
II. Optimalisatie van de bepaling van de hoeveelheid Fusarium met behulp van de moleculaire diagnostische methode TaqMan en vaststelling van de belangrijkste variabelen in de bepaling	
Doelstelling	8
Materiaal en methoden	8
Resultaten	9
Discussie	11
III. Testen van snelle toetsmethode die het mogelijk maakt aren in het veld moleculair te karakteriseren op de aanwezigheid van Fusarium en DON en/of T2/HT2 producenten	
Doelstelling	12
Materiaal en methoden	12
Resultaten	13
Discussie	15
Bijlage	



## 1. Management samenvatting

Pakjesrood of aarfusarium is een belangrijke ziekte in tarwe en gerst. Deze ziekte komt wereldwijd voor en leidt naast significante opbrengstverliezen ook tot kwaliteitsverlies van het geoogst product door de aanwezigheid van mycotoxinen in de granen. Aarfusarium wordt veroorzaakt door een complex van Fusarium soorten, waaronder *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* en *Microdochium nivale*. De samenstelling van dit complex en de hoeveelheid van elke soort zijn van belang bij de te verwachte hoeveelheden mycotoxinen. Fusarium en fusarium gerelateerde mycotoxinen in graan zijn een probleem dat zich tijdens de teelt voordoet. Belangrijke risicofactoren voor Fusarium en mycotoxinen in graan zijn de voorvrucht, de grondbewerking, resistentie van het gebruikte ras, meteorologische omstandigheden tijdens de bloei, gebruik van fungiciden en het tijdstip van de oogst. De rol van deze laatste factor is relatief onbekend. In dit rapport wordt dit onderzocht. Uit oogpunt van kostenbesparing en om zo dicht mogelijk bij de praktijksituatie te blijven, is zijn commerciële velden bemonsterd en niet voor artificieel geïnoculeerde proefvelden zoals in voorgaand onderzoek "Vergelijking van graanmonsters enkele weken voor de oogst met monsters tijdens de oogst". Uit dit onderzoek is naar voren gekomen dat geoogst product inderdaad meer toxine en meer Fusarium bevat dan monsters die twee weken voor de oogst zijn verzameld.

De correlatie tussen de bemonstering twee weken voor de oogst en het oogsttijdstip zelf laag was. Ook de correlatie tussen de twee bemonsteringen voor de oogst is laag. Dit bemoeilijkt de interpretatie van de resultaten. Vandaar dat gezocht is naar mogelijkheden om de moleculaire toetsen te verbeteren en om de bronnen van variatie beter in kaart te brengen. Hiervoor zijn nieuwe toetsen ontwikkeld waarbij voor elke doelorganisme twee onafhankelijke DNA regio's gebruikt worden. Dit maakt een nauwkeurige bepaling van de hoeveelheid Fusarium in het monster mogelijk en biedt ook de mogelijkheid een inschatting van de betrouwbaarheid te maken door vergelijking van de verschillende bepalingen. Bij het onderzoek naar oorzaak van de variatie werd duidelijk dat: (i) het malen van de monsters, (ii) het mengen van het gemalen monster, (iii) de DNA extractie en (iv) de TaqMan PCR alle kunnen bijdragen aan variatie. De verschillende stappen zijn technische geoptimaliseerd. Met in achtname van de bronnen van variatie is een nieuw geoptimaliseerd protocol ontwikkeld. De TaqMan methode voor DNA detectie is zeer gevoelig. één enkele besmette korrel kan gedetecteerd worden in 10.000 of zelfs 100.000 niet besmette korrels. Dit betekent dat de variatie in de praktijkmonsters vooral komt door de bemonstering van het veld. Ondanks de uitgekende bemonsteringsstrategie kunnen de 300 niet symptomatische aren niet als representatief beschouwd worden voor een heel tarwe veld. Andere bemonsteringstechnieken zoals luchtmonstering zijn getest, maar lijken nog te ver weg voor toepassing in de praktijk.

Omdat deze bemonstering van niet symptomatisch materiaal onder praktijkomstandigheden altijd lastig zal blijven, is in onderdeel drie gekeken naar snelle nieuwe methodieken die door telers of adviseurs ter plaatse kunnen worden uitgevoerd, wanneer symptomen van aarfusarium aangetroffen worden en men een inschatting van de belagers en mogelijke mycotoxinen wil maken. De eerste testen laten zien dat deze methode snel een goede diagnose van de soort en bijbehorende mycotoxinen geeft. Bij aanwezigheid van toxine-producerende Fusarium soorten kunnen telers besluiten eerder te oogsten of het geoogst product anders te verwerken of te verhandelen.

## 2. Algemene inleiding

Pakjesrood of aarfusarium is een belangrijke ziekte in tarwe en gerst (Parry *et al.*, 1995). Deze ziekte komt wereldwijd voor en ook in Nederland is deze ziekte ieder jaar aanwezig (Waalwijk *et al.* 2003; Waalwijk *et al.*, 2009; van der Fels *et al.*, 2012). De ziekte leidt tot aanzienlijke verliezen in opbrengst, maar kan ook de kwaliteit van het geoogst product sterk reduceren. Geïnfecteerde korrels zijn kleiner, verschrompeld en kunnen verschillende mycotoxinen bevatten (Schothorst *et al.*, 2004; EFSA CONTAM panel, 2013). Aarfusarium wordt veroorzaakt door een complex van Fusarium soorten waarvan het *F. graminearum* soortencomplex (ten minste 16 verschillende, zeer nauwverwante soorten; Yli-Mattila *et al.*, 2009), *F. culmorum* en *F. avenaceum* in Nederland het meest voorkomen (Waalwijk *et al.* 2003; Waalwijk *et al.* 2009). Daarnaast worden in Nederland ook *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* en *Microdochium nivale* (vroeger *Fusarium nivale* genoemd) aangetroffen (Waalwijk *et al.*, 2004; Waalwijk *et al.*, 2009). Regionale verschillen in de soortensamenstelling zijn waarschijnlijk vooral het gevolg van (micro)klimaat effecten, verschillen in bouwplan, rasverschillen binnen gewassen die ook relateren aan resistentie maar ook aan het bloeitijdstip (de meest gevoelige periode voor infectie), de grondwerking en het fungicide gebruik (Starkey *et al.*, 2007; Talas *et al.*, 2011; Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b; Zhang *et al.*, 2012; Prodi *et al.*, 2009). Wereldwijd en ook in Europa en Nederland zijn soorten van het *F. graminearum* soortencomplex het meest voorkomend.

Toch lijkt dit niet altijd zo te zijn geweest. In Nederland werd tot in de jaren 90 met name *F. culmorum* gevonden (o.a. de Nijs *et al.*, 1996) en ook in bepaalde regio's in Europa, zoals het Verenigd Koninkrijk en Scandinavië worden voornamelijk andere Fusarium soorten gevonden (Jennings *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2011). Wel lijkt ook hier *F. graminearum* belangrijker te worden. Alle veroorzakers van aarfusarium behalve *Microdochium nivale* wat feitelijk ook geen Fusarium zijn in staat mycotoxinen te produceren, die zich in graan kunnen ophopen. Mycotoxine is een verzamelnaam van secundaire metabolieten, die geproduceerd worden door schimmels en die een toxisch effect hebben op mens, dier en/of plant. Mycotoxinen zijn qua chemische samenstelling zeer divers, maar zijn stabiele moleculen die ook bij verhitting intact blijven en dus moeilijk af te breken. In de aar, het graan en ook in het stro kunnen mycotoxinen worden aangetroffen. Welke mycotoxinen zich ophopen, is afhankelijk van de Fusarium soort en zelfs van het specifieke genotype van het isolaat, dat de infectie veroorzaakt. De hoeveelheid mycotoxine is dan ook zeer variabel en afhankelijk van de aard en ernst van de infectie en van omgevingsfactoren zoals weer, maar ook stress factoren zoals de aanwezigheid van fungiciden. Eerder onderzoek laat zien dat Fusarium en fusarium gerelateerde mycotoxinen in graan een probleem zijn, die gedurende de teelt optreden, maar de oogst niet verergeren. Belangrijke risicofactoren voor Fusarium en mycotoxinen in graan zijn de gebruikte voorvrucht, grondbewerking, meteorologische omstandigheden en gebruik van fungiciden. Uit eerder onderzoek van Wageningen-UR en van verschillende Europese partners is gebleken, dat met name onder vochtige weersomstandigheden tijdens en na de bloei de hoeveelheid mycotoxinen in de laatste fase van de teelt sterk kan toenemen (van der Fels *et al.*, 2012). Dit maakt dat ook het oogst-tijdstip een belangrijke factor is in de risico beheersing van mycotoxinen in graan.

In dit rapport worden de volgende drie delen beschreven:

- I. Vergelijking van graanmonsters enkele weken voor de oogst met monsters tijdens de oogst.
- II. Optimalisatie van de bepaling van de hoeveelheid Fusarium met behulp van de moleculaire diagnostische methode TaqMan en vaststelling van de belangrijkste variabelen in de bepaling.
- III. Testen van snelle on-site toets-methoden (LAMP) die het mogelijk maken in het veld symptomatisch aren moleculair te karakteriseren op de aanwezigheid van Fusarium en DON en T2/HT2 producenten.

## I. Vergelijking van graanmonsters enkele weken voor de oogst met monsters tijdens de oogst.

De doelstelling van dit eerste onderdeel is te onderzoeken of in praktijkvelden een toename van de hoeveelheid *Fusarium* en gerelateerde mycotoxinen gevonden kan worden tijdens de laatste fase voor de oogst. De resultaten uit deze studie werden eerder gepubliceerd (van der Fels *et al.*, 2012)

### Materiaal en methoden:

#### Verzameling van de monsters.

Begin 2009 werden Nederlandse telers uitgenodigd deel te nemen aan de monitoring van graanmonsters voor de oogst en graanmonsters op het moment van de oogst. Teleren werden geselecteerd op basis van hun deelname in het European Farm Accountancy Data Network (FADN) (<http://ec.europa.eu/agriculture/>). De coördinatie van het verzamelen van deze data in Nederland gebeurt door het LEI en de data worden opgeslagen in de centrale LEI FADN database. In deze database bevinden zich representatieve jaarlijkse data van 1500 telers. Alle 283 telers uit deze database, die aangegeven hadden dat ze in 2007 of 2008 wintertarwe teelden, werden aangeschreven met de vraag of ze in 2009 weer wintertarwe teelden. Zij werden gevraagd om voor een van hun velden een graanmonster te verzamelen direct na de oogst door 1 kilogram graan korrels te verzamelen door 3 of 4 ronden met de combine te mengen. Een uitgebreide instructie en het benodigde materiaal werden naar de deelnemers gestuurd. Op percelen van 21 deelnemende telers werd ongeveer twee weken voor het geplande oogsttijdstip een bemonstering van aren uitgevoerd. Hiertoe werden ongeveer 2 x 300 aren uit het veld gehaald, afkomstig van 16 plaatsen langs een tractorpad.

De graankorrels uit deze aren werden met de hand verzameld en opgeslagen bij -20 °C tot verdere verwerking. Van alle graanmonsters werd een submonster van 100 gram genomen, dat werd gevriesdroogd in een Virtis freezemobile 12SL en vervolgens vermalen in een Foss cyclotec 1093 molen met een 1 mm zeef. De molen werd tussen de graanmonsters, steeds zorgvuldig schoon geblazen onder hoge druk en gereinigd met 96% alcohol, om kruisbesmetting te voorkomen. Van alle graanmonsters werd een submonster van 200 gram genomen voor de bepaling van het drooggewicht.

#### Kwantitatieve bepaling van de *Fusarium* soorten.

Alle tarwemonsters werden onderzocht op de aanwezigheid van *Fusarium* soorten. Van het vermalen monster werd een sub-monster van 10 tot 20 mg genomen. DNA uit dit monster werd geëxtraheerd met behulp van een de AGOWA sbeadex® Mini plant (Cat. no. 41250) in combinatie met de King Fisher DNA extractie robot (Thermo Scientific) volgens het mini plant protocol. Amplificatie van het genomische DNA van *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *Microdochium nivale* var. *majus* werden uitgevoerd zoals beschreven door Waalwijk *et al.*, 2004. Voor de bepaling van de hoeveelheid *F. langsethiae* en *F. sporotrichioides* werd gebruik gemaakt van het protocol beschreven door Waalwijk *et al.*, 2009. Een verdunningsreeks van DNA werd gebruikt voor elke *Fusarium*soort en in elke TaqMan run om te komen tot een standaard lijn voor de relatie tussen de start van detectie van het fluorescentie signaal (Ct) en de hoeveelheid DNA die oorspronkelijk aanwezig was. De gebruikte TaqMan probes waren gelabeld met de reporter kleurstof 6-carboxyfluoresceïne en de quencher tetramethylrhodamine (TAMRA). Als TaqMan amplificatiecontrole werd gebruik gemaakt van een aan ieder monster toegevoegde aardappelbladrolvirus cDNA. De gebruikte probe voor deze controle was gelabeld met VIC zodat deze controle gelijktijdig met het *Fusarium* doelorganisme gedetecteerd kan worden. De TaqMan reacties werden uitgevoerd in een volume van 30 µL, met daarin 15 µL TaqMan universele PCR master mix (Cat. no. 4304437 Applied Biosystems) 83 nM van elk van de beide probes en 333 nM van elke van de gebruikte primers. Het temperatuurprofiel voor de amplificatie was 2 minuten bij 50 °C om uracil-bevattend DNA af te breken, gevolgd door 10 minuten bij 95 °C om de uracil-N-glycosidase te inactiveren, waarna 40 cycli werden uitgevoerd bij de volgende temperaturen 15 seconden 95 °C, 60 seconden bij 60 °C. Voor elke reactie werd 1 µL DNA gebruikt.

#### Detectie van de *Fusarium* mycotoxinen:

Een multi-toxinen analyse werd gebruikt voor de gelijktijdige detectie van: 3-acetyl-deoxynivalenol en/of 15-acetyl-deoxynivalenol (3/15-AcDON), beauvericine (BEA), diacetoxyscirpenol (DAS), deoxynivalenol (DON), HT-2 toxine (HT-2), T-2 toxine (T-2), moniliformine (MON), neosolaniol (NEO), nivalenol (NIV), zearalenon (ZON), de  $\alpha$ -isomer en  $\beta$ -isomer van zearalenol ( $\alpha$ -ZOL /  $\beta$ -ZOL) (Tabel 1). Deze analyse bestaat uit een extractie, verdunning met een mengsel van aangezuurd acetonitril en water gevolgd door een LC-MS/MS analyse zoals beschreven door (Sulyok *et al.*, 2006; Mol *et al.*, 2008; Spanjer *et al.*, 2008).



## Resultaten:

### Verzamelen van graanmonsters

In totaal werden 128 graanmonsters afkomstig van individuele wintergraanvelden verzameld, afkomstig van 88 verschillende telers verspreid over heel Nederland. Van deze 128 monsters waren 86 monsters verzameld tijdens de oogst (een monster per veld) en opgestuurd door telers. In 19 gevallen kon ook voor de oogst gemonsterd worden (in tweevoud, dus 38 monsters). In één geval werd wel gemonsterd voor de oogst (in tweevoud) maar is het corresponderende monster van de oogst niet door de teler ingestuurd.

### Fusarium soorten

Van de zeven *Fusarium* soorten, die werden onderzocht in de 86 velden was *Fusarium graminearum* met 40 gevallen de meest voorkomende soort, gevolgd door *F. avenaceum* (n=26) *M. nivale* (n=23), *F. langsethiae* (n=7), *F. poae* (n=2) en *F. culmorum* (n=2). *F. sporotrichioides* werd niet aangetroffen (zie Tabel 1). Wanneer gekeken worden naar de hoeveelheden van de *Fusarium* soorten zien we een scheve verdeling, individuele monsters kunnen hoge waarden hebben. *F. langsethiae* werd alleen bij de oogst aangetroffen, niet in de monsters die ongeveer twee weken voor de oogst werden genomen. Ook *F. avenaceum* werd voornamelijk tijdens de oogst aangetroffen en slechts een keer in een monster dat enkele weken voor de oogst genomen werd.

Tabel 1. De gevonden *Fusarium* soorten en *M. nivale* en hoeveelheden DNA (in  $\text{pg}/\text{mg}^{-1}$ ) in de 86 veld monsters.

	aantal positieve monsters	gemiddelde hoeveelheid <sup>1</sup>	maximaal gevonden waarde <sup>1</sup>
<i>F. graminearum</i>	40	26.70	253.0
<i>F. avenaceum</i>	26	7.46	94.2
<i>M. nivale</i>	23	20.70	168.0
<i>F. langsethiae</i>	7	1.59	37.4
<i>F. poae</i>	2	0.39	18.4
<i>F. culmorum</i>	2	0.33	16.2

<sup>1</sup> in  $\text{pg}/\text{mg}^{-1}$

### Mycotoxinen

Negen van de 12 mycotoxinen waarop getest werd zijn in de monsters aangetroffen en zes hiervan werden meerdere keren aangetroffen. Het gaat om deoxynivalenol (DON), moniliformine, zearalenon, beauvericine, HT-2 toxine en T2-toxine. De gemiddelde waarde van de positieve monsters waren respectievelijk 242, 5,7, 5,5, 4,4 2,2 en 0,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Onderzoek naar de relatie tussen mycotoxinen onderling is alleen mogelijk wanneer voldoende aantallen positieve monsters beschikbaar zijn. Dit was het geval voor de toxines deoxynivalenol, beauvericine en zearalenon. Er werden geen duidelijke correlaties gevonden in de hoeveelheden van deze toxinen.

Tabel 2. Voorkomen van zes mycotoxinen die in de 86 veldmonsters het meest werden aangetroffen.

<b>Mycotoxine</b>	<b>aantal positieve monsters</b>	<b>gemiddelde hoeveelheid<sup>1</sup></b>	<b>maximaal gevonden waarde<sup>1</sup></b>
<b>Deoxynivalenol</b>	57	242.0	2524
<b>Beauvericine</b>	53	4.4	69
<b>Zearalenon</b>	44	5.5	119
<b>Moniliformine</b>	23	5.7	326
<b>T-2 toxine</b>	13	0.4	7
<b>HT-2 toxine</b>	9	2.2	33

<sup>1</sup>in µg/kg (ppb)

Tabel 3. Voorkomen van zes mycotoxinen die in 21 gepaarde monsters genomen voor de oogst het meest werden aangetroffen.

<b>Mycotoxine</b>	<b>aantal positieve monsters</b>	<b>gemiddelde hoeveelheid<sup>1</sup></b>	<b>maximaal gevonden waarde<sup>1</sup></b>
<b>Deoxynivalenol</b>	15	146.0	691.0
<b>Beauvericine</b>	11	2.1	13.0
<b>Zearalenon</b>	12	1.7	9.7
<b>Moniliformine</b>	5	6.7	97.0
<b>T-2 toxine</b>	4	0.7	9.7
<b>HT-2 toxine</b>	3	1.9	18.0

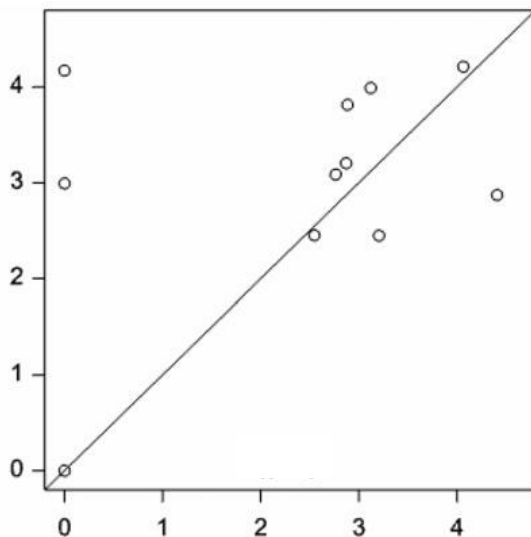
<sup>1</sup>in µg/kg (ppb)

### Relatie Fusarium soorten en mycotoxinen

Onderzoek naar de relatie tussen Fusarium soorten en mycotoxinen is alleen mogelijk wanneer voldoende aantallen positieve monsters beschikbaar zijn. Er is gekeken naar de soorten met de hoogste incidentie *F. graminearum* en *F. avenaceum* en de meest gevonden mycotoxinen BEA DON en ZON. Hierbij werd geen duidelijke correlatie tussen de hoeveelheden mycotoxinen en de hoeveelheden Fusarium.

### Relatie hoeveelheden Fusarium en mycotoxinen en in de laatste fase voor de oogst

Onderzoek naar de relatie tussen Fusarium en mycotoxinen is alleen mogelijk wanneer voldoende aantallen positieve monsters beschikbaar zijn. Dit was het geval voor de *F. graminearum* en voor *F. avenaceum* en de toxinen deoxynivalenol, beauvericine en zearalenon. Er werden geen duidelijke correlaties gevonden in de hoeveelheden van deze toxinen.



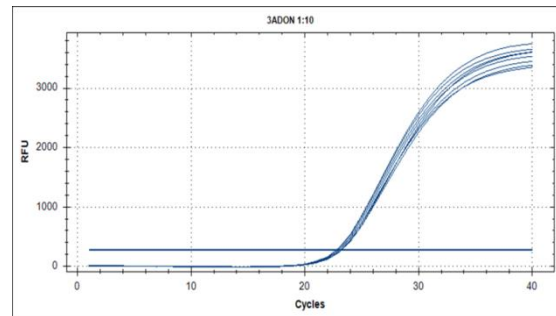
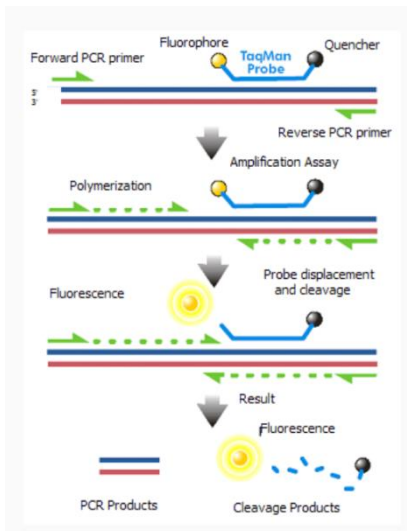
**Figuur 3. Relatie tussen de hoeveelheden *F. graminearum* enkele weken voor de oogst (x-as) en de hoeveelheid Fusarium die werd gevonden in het geoogste graan (y-as). De schaal is logaritmisch en de aangegeven hoeveelheden zijn in  $\text{pg/mg}^{-1}$ . De hoeveelheid Fusarium voor de oogst is het gemiddelde van de twee monsters. Monsters met een Ct waarde van 30 of hoger zijn niet meegenomen omdat deze niet geschikt zijn voor kwantificatie (zie verderop in dit rapport). Het punt (0,0) vertegenwoordigt meerdere waarnemingen.**

### Discussie en aanbevelingen:

Dit is de eerste nationale geografisch goed gespreide studie naar het voorkomen van Fusarium in wintertarwe monsters van praktijkvelden. Door te bemonsteren enkele weken vóór en tijdens de oogst is het mogelijk een beeld te krijgen van de ontwikkelingen in de laatste fase voor de oogst. Het parallel testen van mycotoxinen en Fusarium soorten maakt het daarnaast mogelijk de correlatie tussen Fusarium soorten en mycotoxinen te onderzoeken.

De resultaten laten zien dat zowel ten aanzien van incidentie als hoeveelheid, *F. graminearum* in Nederland de dominante soort is van het complex dat aardfusarium kunnen veroorzaken. is in goede overeenstemming met het feit dat de mycotoxinen, die door *F. graminearum* gevormd kunnen worden (DON en ZON) ook het meest werden aangetroffen in monsters wintertarwe. Na *F. graminearum* worden *M. nivale* en *F. avenaceum* het meest gevonden in de wintertarwe monsters. *M. nivale* kan wel de typische aardfusarium symptomen geven en tot aanzienlijke opbrengstverliezen leiden, maar deze schimmel produceert geen mycotoxinen en vormt vanuit het perspectief van voedselveiligheid dus geen bedreiging. *F. avenaceum* vormt wel mycotoxinen (BEA) en lijkt dus voor Nederland een belangrijke bedreiging voor de voedselveiligheid. De in deze studie gevonden incidentie en hoeveelheden van *F. avenaceum* zijn hoger dan op grond van eerder onderzoek werd verwacht (Waalwijk *et al.*, 2004). Uit het onderzoek zijn daarnaast enkele trends te vinden. De hoeveelheden mycotoxinen en Fusarium zijn in de monsters voor de oogst lager dan op het moment van de oogst. Dit geldt met name voor *F. avenaceum* en *F. langsethiae*, die in de monsters voor de oogst respectievelijk in 2 en 0% van de monsters aangetroffen, maar tijdens de oogst in respectievelijk 30% en 8% van de monsters verzameld. Voor de mycotoxinen is een zelfde beeld waarneembaar. Voor het aan *F. avenaceum* gerelateerde mycotoxine beauvericine zijn voor de oogst 11 van de 21 monsters positief (52%) met een gemiddelde van 2.1  $\mu\text{g/kg}$  bij de oogst zijn 53 van de 86 monsters positief (61% met een gemiddelde van 4.4  $\mu\text{g/kg}$ ). Voor DON en ZEA is zowel de incidentie als de gemiddelde hoeveelheid in de monsters twee weken voor de oogst lager dan van de monsters die tijdens de oogst zijn genomen. Naast deze trends is nog gekeken naar relaties tussen de verschillende mycotoxinen, de verschillende Fusarium soorten enerzijds en verschillen

tussen de monsters van hetzelfde veld en van de monsters van één veld op de twee tijdstippen van de bemonstering anderzijds. Hierbij valt vooral de grote variatie op. Zelfs de bemonstering van één veld in 2-voud geeft zeer veel spreiding. Het is bekend dat de Fusarium soort samenstelling per aar zeer verschillend kan zijn. Het verzamelen van ongeveer 300 aren van verschillende plekken in het veld heeft dit kennelijk onvoldoende kunnen harmoniseren. De vraag is of de gebruikte TaqMan detectie procedure, die gebaseerd is op de exponentiële amplificatie van het doelorganisme een belangrijke rol speelt. Ook de verschillen binnen de een monster zijn hoog. De voornaamste reden is de lage incidentie en de grote verschillen die bijvoorbeeld gevonden worden tussen twee bemonsteringen van hetzelfde veld. De vraag hierbij is of deze variatie (deels) veroorzaakt wordt door technische variatie in de DNA gebaseerde TaqMan analyse. Voor elke van de geteste soorten is steeds maar één enkele assay gebruikt. Zou de kwantificatie van de Fusarium soorten identiek zijn, wanneer een tweede, onafhankelijke, assay voor dezelfde soort zou worden gebruikt. Daarnaast worden tussen de drie herhalingen van hetzelfde gemalen monster ook duidelijke verschillen waargenomen. Hoe betrouwbaar is de kwantificatie temeer gezien de lage hoeveelheden die soms gedetecteerd worden. Het verdient dan ook aanbeveling om de huidige set van TaqMan toetsen uit te breiden en de voornaamste bronnen van variatie in tarwe monsters beter in kaart te brengen. Na deze technische optimalisatie kan opnieuw en met meer nauwkeurigheid naar de bemonsteringstrategie gekeken worden.



**Figuur 4 (links). Schematische weergave van het principe van de TaqMan. Figuur 4 (rechts). Voorbeeld van een typisch resultaat van een TaqMan met daarbij op de x-as het aantal amplificatie ronden (cycli) en op de y-as de toename van het fluorescentie signaal als gevolg van de afsplitsing van de fluorescente groep van de quencher, die bij intacte probes voor absorptie van het fluorescente signaal zorgt.**

## II Optimalisatie van de bepaling van de hoeveelheid Fusarium met behulp van de moleculaire diagnostische methode TaqMan en het bepalen van de voornaamste variaties in van de bepaling.

### Doelstelling

Voor de detectie van de verschillende Fusarium soorten wordt gebruik gemaakt van de TaqMan PCR detectie technologie. Deze methode is gebaseerd op de amplificatie en detectie van het DNA van het doelorganisme met behulp van twee primers en een probe die afgebroken wanneer het fragment geamplificeerd wordt. Deze methode is zeer gevoelig en kan één enkel DNA fragment in de reactie aantonen. In de PCR wordt de hoeveelheid van het fragment elke ronde verdubbeld zodat een exponentiële toename van het fragment ontstaat welke door de toename van het fluorescentie signaal gedetecteerd kan worden. Daarnaast is de methode zeer specifiek. Soms kan een enkele base verschil in de sequentie van het DNA het verschil maken in de detectie. Gezien de grote verschillen die gevonden werden in de bemonstering van Nederlandse velden is de vraag hoe deze zeer gevoelige methode effectief ingezet kan worden voor een kwantitatieve analyse van veld monsters en binnen welke marges rekening gehouden moet worden met variaties die afkomstig zijn van de verschillende stappen in de methode. De door ons gekozen methode om de kwantificatie verder te onderzoeken is voor de gebruikte doel organisme een tweede toets te ontwikkelen en te kijken in hoeverre de resultaten overeenkomen in een parallelle test van dezelfde monsters. Daarnaast is gekeken in hoeverre er verschillen zijn tussen de verschillende Fusarium isolaten hiervoor is de Fusarium collectie van Plant Research International gebruikt die een wereldwijde collectie van verschillende Fusarium soorten omvat. Tenslotte is gekeken in hoeverre andere factoren dan verschillen in sequentie zoals bemonstering, malen, effect hebben op de detectie en kwantificatie.

### Materiaal en methoden

#### Design van de TaqMan primers en probes

Voor het ontwikkelen van de nieuwe TaqMan primers werd enerzijds gebruik gemaakt van een huishoudgen ammonia ligase 2 gen dat specifiek *F. graminearum* kan aantonen. Daarnaast werd gebruik gemaakt van genen die coderen voor de eiwitten die betrokken zijn bij de productie van de trichothecenen. Van deze genen is bekend dat verschillende genetische varianten (chemotypes) andere varianten van de trichothecenen maken. Van het TRI3 en het TRI12 gen (Ward et al., 2008) werden van verschillende Fusarium isolaten de sequenties uit de NCBI nucleotide database verkregen en onderling vergeleken in het software pakket CLC workbench 6.0.1. Op basis van de verwantschapsanalyse werden verschillende regio's in deze genen geselecteerd die geschikt zijn voor de soort- of chemotype specifieke identificatie van Fusarium isolaten.

In totaal werden 7 primers en probes combinaties ontworpen. Aan het 5'-uiteinde van de elke probe werd een FAM label geplaatst en elke 3'-uiteinde bevatte een Minor Groove Binding of MGB. De verwachte binding op het doelorganisme en de naast verwante werd berekend in het software pakket Visual OMP zodat *in silico* een goede indruk van de specificiteit werd verkregen. Andere in deze studie gebruikte primers werden al eerder ontwikkeld. Voor *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *Microdochium nivale*, *F. poae*, *F. asiaticum*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides*, *F. verticillioides* werd gebruik gemaakt van de TaqMan toetsen zoals beschreven door Waalwijk et al., 2004; Waalwijk et al., 2008.

#### Productie van tarwe monsters met verschillende besmettingen.

Van het zomer tarwe ras Thasos werden graankorrels geïnoculeerd met verschillende isolaten waarvan de soort en het chemotype bekend was. Zwaar besmette korrels met de isolaten 68D2 (*F. graminearum*, chemotype 15-A-DON), SVP 8906 (*F. culmorum*, chemotype 3-ADON) en bfb0982\_1 (*F. asiaticum*, chemotype NIV) werden gemalen tot een fijn poeder. Deze monsters werden puur gebruikt of gemengd in verschillende verhoudingen. Bij het mengen werd naast de geïnoculeerde tarwe monsters gebruik gemaakt van niet besmet graan om de hoeveelheid Fusarium in het graan monster te verminderen ("verdunnen"). De poeders werden gemengd in de volgende verhoudingen 1/1/1 (*F. graminearum*/*F. culmorum*/*F. asiaticum*) en 100/10/1 (*F. graminearum*/*F. culmorum*/*F. asiaticum*). Deze mengsels werden daarnaast "verdund" met niet besmet graan in een 10-voudig reeks (1:0, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000 en 1:100.000). De monsters werden vervolgens nogmaals gemengd, waarbij gebruik gemaakt werd van een Rotator Reax2 (Heidolph) op een stand van 50 RPM. Van elk monster werd acht keer een sub-monster van 15-20 mg genomen. Uit deze monsters werd vervolgens DNA geëxtraheerd met behulp van de DNA extractie kit (Sbeadex Maxiplant Nucleic Acid Extraction Kit) volgens het door de fabrikant aangegeven

protocol met behulp van een Kingfisher DNA extractie Robot. Het DNA werd geëluëerd in 70 µl elutie buffer afkomstig van de Sbeadex Maxiplant Nucleic Acid Extraction Kit.

### **Detectie van Fusarium soorten en chemotypes met behulp van TaqMan**

De TaqMan reacties werden uitgevoerd in een BioRAD 384 apparaat in een volume van 15 µL. De TaqMan mix bestond voor elke reactie uit 7.5 µL Premix Ex Taq (Perfect Real time, TaKaRa), 300 nM van de forward en reverse primer, 100 nM van de probe met daarbij in elke reactie als interne positieve controle PLRV zoals eerder beschreven (Waalwijk *et al.*, 2004). Bij elk van de acht herhalingen werd 5µL DNA template toegevoegd. Het temperatuursprofiel van de TaqMan was 1 min at 95 °C, gevolgd door 40 cycli van 10 s bij 95 °C, 30 s bij 60 °C in een 384-well plaat in een CFX384 Real-time System (Bio-Rad) of een Thermo Fisher 7500 (Life Technologies).

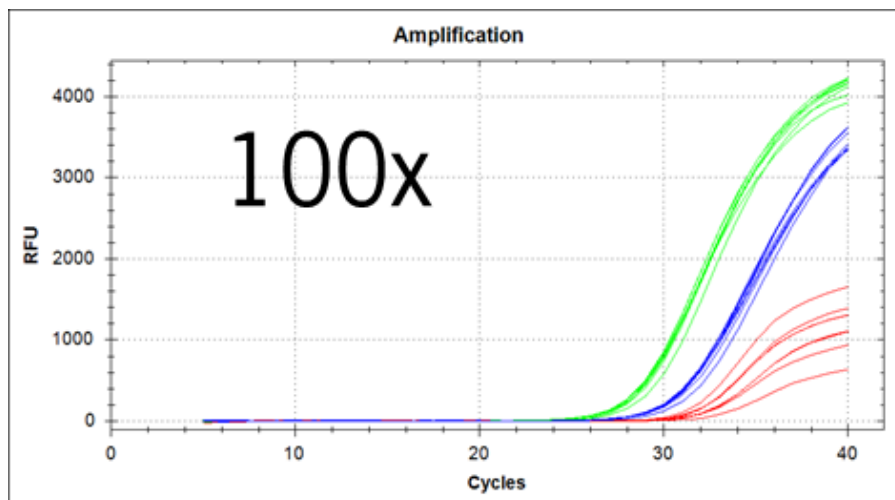
## **Resultaten**

### **Specificiteit en gevoeligheid van de nieuwe TaqMan assays**

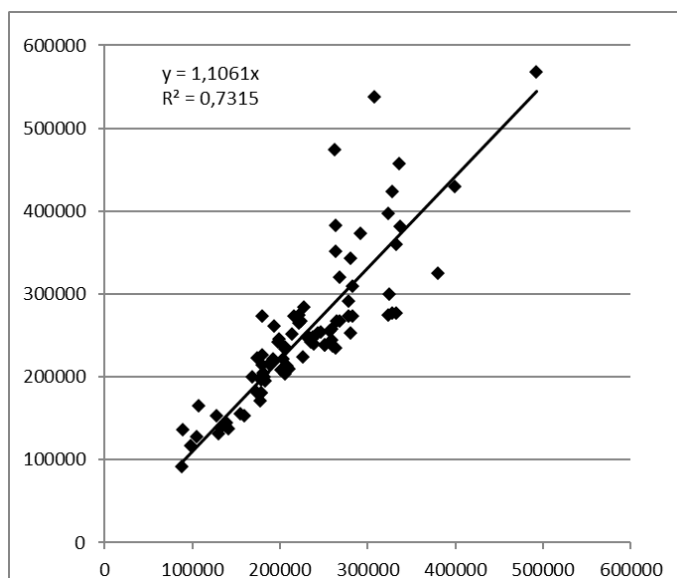
Voor de ontwikkelde Taqman assays werd de specificiteit gecontroleerd op een zeer diverse set van Fusarium isolaten. Het gaat hier om een verzameling, waarin isolaten van over de hele wereld zijn opgenomen en de identiteit is vastgesteld door sequentieanalyse middels een Luminex assay en het chemotype is bepaald via HPLC en TaqMan. De DNA concentratie werd opnieuw bepaald met behulp van PicoGreen. Van alle DNA monsters werd 5 ng in de reactie gebruikt. Deze concentratie geeft bij een efficiënte TaqMan PCR een Ct waarde van ~18. Het profiel van alle reacties werd nauwkeurig geïnspecteerd en in de hoogte van het signaal ( $\Delta Rn$ ) en het verloop van de amplificatie curve werd genoteerd. Een tabel met de resultaten is te vinden in bijlage 1. Uit deze tabel blijkt dat zowel de gevoeligheid als de specificiteit van de ontwikkelde TaqMan assays over het algemeen goed zijn. Voor de nieuwe *F. graminearum* assay zijn ook de nauwverwanten soorten *F. pseudograminearum* en *F. lunulosporum* positief. Deze soorten spelen in Nederland in graanmonsters echter geen rol van betekenis. Naast de onverwachte resultaten met *F. pseudograminearum* en *F. lunulosporum*, werden nog enkele afwijkingen gevonden. Deze afwijkingen laten zien dat het verstandig is om voor een doelorganisme of kenmerk niet afhankelijk te zijn van één enkele toets, maar de beschikking te hebben over een tweede onafhankelijke toets. Op deze manier kunnen potentieel vals-negatieve of vals-positieve monsters opgespoord. Bij discrepantie tussen de resultaten van de beide assays voor het zelfde doelorganisme of kenmerk, kunnen de monsters in meer detail onderzocht kunnen worden. Dit kan bijvoorbeeld door sequentiebepaling van een geamplificeerd fragment.

### **Gevoeligheid en herhaalbaarheid**

Daarna zijn deze TaqMan assays gebruikt om de gevoeligheid te testen. Uit de resultaten van de verdunningsreeks, blijkt dat het mogelijk is 1 geïnfecteerde graankorrel te detecteren in een achtergrond van 10.000, ook als er naast dit doelorganisme nog een 10- of 100-voud overmaat is van een ander doelorganisme. Als er geen ander doelorganisme aanwezig is, kan in een aantal gevallen zelfs 1 geïnfecteerde korrel in 100,000 niet-geïnfecteerde korrels worden aangetoond. Ook blijkt dat bij de gebruikte methode de variatie van het nemen van een sub-monster en van de DNA extractie en de TaqMan zeer gering is. Wanneer de methode in achtvoud wordt uitgevoerd is er nauwelijks variatie in het profiel en in de Ct waarde. Tot Ct waarden van ~30 is de kwantificatie ook betrouwbaar (zie figuur 5). Wel is het zo dat bij Ct waarden boven de 30 meer spreiding te zien. Boven een Ct van 30 is een verschil van een factor 2-4 niet ongebruikelijk voor de nauwkeurige kwantificatie van Fusarium is dit niet goed genoeg omdat verschillen tussen monsters vaak maar een factor twee tot 10 zijn. Vandaar dat het voor Fusarium niet mogelijk is een betrouwbare kwantificatie te doen bij Ct waarden van 30 of hoger. De detectie limiet blijft bij een Ct van 35.



**Figuur 5: TaqMan resultaat van de amplificatie in 8-voud van de verschillende doelorganismen. De oorspronkelijke mix van 100:10:1 is nog eens 100x verdund met niet gecontamineerd graan. Dit resulteerde in een mix waarbij 1:100 korrels is geïnfecteerd met *F. graminearum* (aangegeven in groen), 1:1000 korrels was geïnfecteerd met *F. culmorum* (aangegeven in blauw) en 1:10.000 korrels was geïnfecteerd met *F. asiaticum* (aangegeven in rood). Te zien is dat zelfs wanneer slechts 1:10.000 korrels besmet is met het doelorganisme wat zich bovendien bevindt in een mix van *Fusarium* soorten die 100 maal zo vaak voorkomen in alle 8 herhalingen goed gedetecteerd kan worden. Wel laat de kwantificatie (Ct waarde) waarde een grotere spreiding laat zien. Iets wat ook bij andere monsters met een Ct waarde van 30 of hoger werd waargenomen.**



**Figuur 6. Kwantificatie van twee onafhankelijke bepalingen van de hoeveelheid 15-A-DON producenten in een gerst monsters. Op de x-as staat de hoeveelheid van de 15-A-DON producenten in fg/mg zoals bepaald met behulp van de kwantificatie van de TaqMan gebaseerd op het tri3 gen en op de Y-as staat de hoeveelheid van de 15-A-DON producenten zoals bepaald met behulp van de kwantificatie van de TaqMan gebaseerd op het tri12 gen in fg/mg. De formule voor de correlatie en ook de R2 staan in de linkerbovenhoek van de grafiek.**

## Discussie

De resultaten laten zien dat nieuwe specifieke toetsen zijn ontwikkeld voor *Fusarium* en voor het chemotype. Dit maakt het mogelijk om de hoeveelheid van de verschillende *Fusarium* soorten goed te bepalen, maar ook om zowel binnen soorten als over soorten heen te kunnen bepalen welke toxine gevormd wordt en dus welke toxinen in het graan verwacht kunnen worden. Daarnaast is het nu mogelijk om voor het zelfde doelorganisme of voor hetzelfde chemotype twee onafhankelijke bepalingen te doen wat de analyse een stuk robuuster maakt. De optimalisatie van de methode waarbij gebruik gemaakt wordt van molens voor het vermalen van het graanmonster, van mixers voor het mengen van het monster en van een robot voor de extractie, geeft goede resultaten. Bij lage besmettingen kan echter nog steeds variatie ontstaan. Een voorbeeld hiervan zijn gerstmonsters uit een veld, waar nauwelijks aantasting door *Fusarium* zichtbaar was en waar slechts 600 pg *Fusarium* DNA gevonden werd per milligram gemalen tarwe. Het is daarom belangrijk om twee onafhankelijke assays te gebruiken voor de kwantificatie en de monsters goed te mengen en de DNA extractie in drievoud uit te voeren. Hierdoor kan een nauwkeurige bepaling van zowel soort of kenmerk worden uitgevoerd. Bovendien kan hierdoor voorkomen worden dat door sequentie variatie in de natuurlijke populatie, de primer en/of probe sequentie niet langer past en de TaqMan tot vals positieve of vals negatieve identificaties leidt. Uit onderzoek van de wereldwijde collectie van *Fusarium* isolaten, blijkt namelijk dat kleine sequentieverschillen of zelfs deleties tussen isolaten van één en dezelfde soort geregeld voorkomen. Het is daarom essentieel hier bij de diagnostiek rekening mee te houden. De in dit rapport beschreven meervoudige TaqMan toetsen bieden bovendien de mogelijkheid tot verdere controles. Als twee trichothecene type B producenten gevonden worden (bijvoorbeeld *F. graminearum* en *F. culmorum*) dan zal de som het chemotype gelijk moeten zijn aan de som van de soorten *F. graminearum* en *F. culmorum*. Is dit niet het geval dan is óf de kwantificatie van de soorten niet goed verlopen of er zijn mogelijk onbekende soorten die ook gerekend kunnen worden tot de trichothecene B producenten. Gezien de automatisering en de verlaging van de kosten voor primers en probes kunnen na een DNA extractie deze toetsen zonder al te grote financiële bezwaren in het hier beschreven 384 format worden uitgevoerd. De in dit rapport beschreven meervoudige TaqMan toetsen staan internationaal in de belangstelling en zullen mogelijk in een aparte publicatie beschreven worden.

Het werk heeft daarnaast een goed inzicht gegeven in de factoren die een rol spelen in de variatie die in de tarwemonsters gevonden wordt m.b.t. de kwantificatie van *Fusarium*. Belangrijke factoren zijn de bemonstering, het malen en het mengen van gemalen monsters. De DNA extractie (met behulp van een robot) en de TaqMan amplificatie geven minder variatie. Bij de TaqMan is deze variatie binnen een plaat gering, maar tussen TaqMan platen groter is. Het verdient dan ook de aanbeveling om zoveel mogelijk binnen het 384 format te werken. De gevoeligheid van TaqMan is zeer goed te noemen: onder sommige omstandigheden kan één besmette korrel in 100.000 korrels gedetecteerd worden. Dit komt overeen met één besmette korrel in corresponderend met 3 kg tarwe. Dit betekent dat men in de bemonstering strategie bij voorkeur start met meer dan 3 kg. Zulke hoeveelheden zijn echter niet altijd eenvoudig te verkrijgen en ook het malen en mengen van dit soort hoeveelheden is arbeidsintensief. Om daar vervolgens een representatief sub-monster van 10 tot 20 mg uit te halen is bovendien technisch lastig. Het lijkt daarom gewenst te kijken naar alternatieve methoden van bemonstering, bijvoorbeeld van visueel aangetast materiaal. Dit zou op locatie kunnen gebeuren met behulp van de recent voor *Fusarium* ontwikkelde Loop mediated isothermal AMPLification (LAMP) technologie.



### III. Testen van snelle toetsmethode die het mogelijk maken in het veld symptomatisch aren moleculair te karakteriseren op de aanwezigheid van Fusarium en DON en T2-HT2 producenten.

#### Doelstelling

Ontwikkelen van een snelle toets, die door telers en adviseurs kan worden gebruikt om te bepalen of symptomatisch plantmateriaal Fusarium bevat en of trichothecenen van het type A (T2 toxine en HT-2 toxine) of van het type B (DON en NIV) verwacht mogen worden.

Uit onderdeel I en II van dit rapport blijkt dat het lastig is om vanuit niet symptomatisch materiaal via een moleculaire toets een goede inschatting te maken van de Fusarium infectie. Dit ligt niet zozeer aan de gevoeligheid of reproduceerbaarheid van de moleculaire toets. Het voornaamste probleem is het zeer variabel voorkomen van Fusarium. Dit betekent dat een andere manier van bemonstering gewenst is. In een belendend project zijn luchtmonsters tijdens de bloei getest (de data hiervan zijn niet opgenomen in dit rapport) maar ook dit geeft sterk wisselende resultaten waarbij per dag de hoeveelheden sterk kunnen fluctueren. Met de huidige kennis is het niet duidelijk of hiermee een goede inschatting kan worden gemaakt voor de besmetting van het graan. Daarom is gekeken naar nieuwe mogelijkheden om symptomatisch materiaal te testen. Op dit moment worden visuele waarnemingen gebruikt voor de inschatting van de aard en omvang van de Fusarium aantasting van graanpercelen. Dit is lastig en kan leiden tot onzekerheid of een verkeerde inschatting, bijvoorbeeld door aantasting door *M. nivale*. Daarnaast is het aan de hand van een visuele beoordeling niet mogelijk te bepalen welke Fusarium soort de besmetting veroorzaakt, laat staan welke toxinen hierbij gevormd worden. Om het mogelijk te maken om deze visuele waarneming met een moleculaire toets te ondersteunen is een nieuwe serie van testen ontwikkeld. De verwachting is dat telers en adviseurs graag snel een resultaat willen hebben en men daarom graag op locatie de toets zou willen uitvoeren. Daarom is gekozen voor het ontwikkelen en testen van enkele Loop mediated isothermal AMPlification (LAMP) assays. LAMP assays zijn moleculaire toetsen, waarbij net als bij TaqMan, DNA van het doelorganisme specifiek vermeerderd wordt. Een belangrijk praktisch verschil tussen LAMP en TaqMan is dat een LAMP assay bij één enkele temperatuur plaatsvindt. Hierdoor is een veel minder complex apparaat nodig, wat bovendien veel minder stroom nodig heeft, omdat niet steeds verwarmd en gekoeld hoeft te worden. Doordat de reactie bij één temperatuur plaatsvindt, is de reactie bovendien sneller. Voor Fusarium en voor de verschillende chemotypen was een LAMP assay voor zowel Type A als Type B trichothecenen uit de literatuur beschikbaar (Niessen 2010, Denschlag et al. 2014). Voor type B trichothecenen is een nieuwe assay ontwikkeld in samenwerking met een Chinese partner (IPP-CAAS, Beijing).

#### Materiaal en methoden

DNA van verschillende Fusarium soorten (zie Tabel 6) met een concentratie van 2 ng/μL werd verkregen uit de DNA stock collection van Plant Research International. In een 25 ul μL reactie werd 2 μL van dit DNA gebruikt in een 1x LAMP master-mix met 2uM FIB en BIP primers 0.2 μM F3 en B3 primers en 1 μM Loop primers. De monsters werden gedurende 30 minuten geïncubeerd bij 65 °C, waarna een smeltcurve van het geamplificeerde DNA werd bepaald. Voor elke reactie werd de tijd, die nodig was om een significante hoeveelheid signaal te meten (time of positivity, TOP) bepaald. Ter controle dat het juiste amplificatieproduct was gevormd, werd een smeltcurve van het amplicon uitgevoerd.

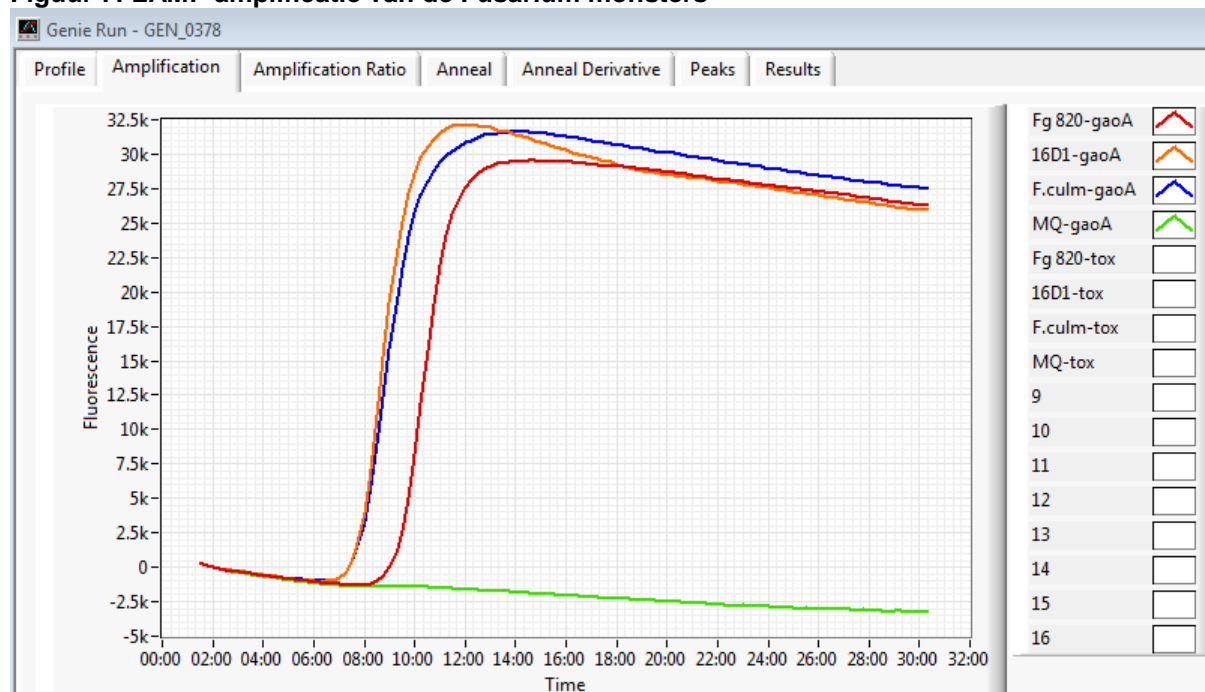
Tabel 6. Gebruikte Fusarium soorten voor de soortspecificiteit bepaling van de LAMP.

Fusarium soort	isolaat code
<i>F. avenaceum</i>	IPO 92-3
<i>F. verticillioides</i>	ITEM 2142
<i>F. vorosii</i>	CBS119178
<i>F. graminearum</i>	PD 88/790
<i>F. culmorum</i>	SVP 8906
<i>F. asiaticum</i>	bfb0082_1
<i>F. graminearum</i>	Fg820
<i>F. sporotrichioides</i>	ITEM 3596
<i>F. poae</i>	PD 93-1780
<i>F. asiaticum</i>	bfb0082_1
<i>F. langsethiae</i>	PRI 07-01

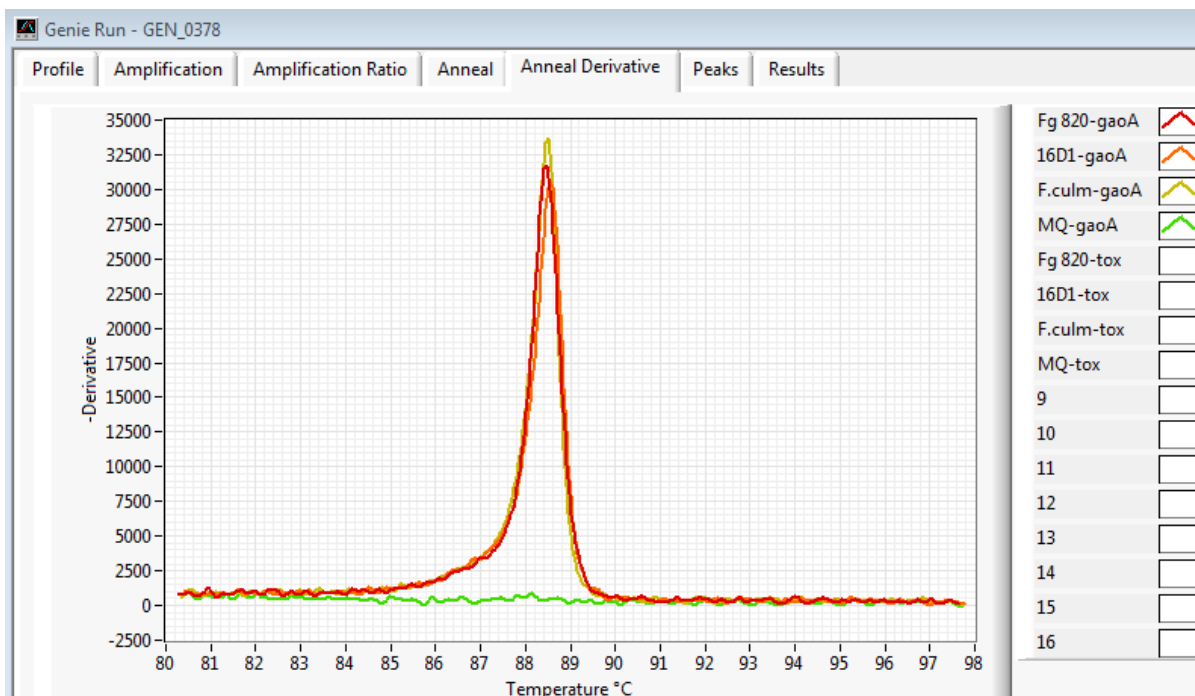
### Resultaten

De LAMP assays laten zoals verwacht een snelle toename in fluorescentie zien (figuur 7). De tijd tot een signaal gemeten kan worden (time of positivity, TOP) is meestal tussen de 5 en 10 minuten (Tabel 7). Voor de primers zonder de loop primers is deze duidelijk hoger. De negatieve controle op amplificatie, waarbij water werd gebruikt in plaats van DNA, geeft in geen enkel geval een positieve toetsuitslag. Op basis van de smeltcurves, blijken de gegenereerde amplicons zeer specifiek. Wanneer gekeken wordt of de amplificatie ook correspondeert met het soort trichothecenen zijn er een aantal discrepanties.

Figuur 7: LAMP amplificatie van de Fusarium monsters



**Figuur 8: Smeltcurve van het LAMP amplicon als controle op de correcte amplificatie van de Fusarium monsters.**



**Tabel 7. Resultaten voor de verschillende LAMP reacties op de test set van Fusarium isolaten. Voor de vier verschillende LAMP assays Tri5, In rood aangegeven waarden zijn afwijkend**

		run gen_0408		run gen_0378	
		Tri5	Tri6	gaoA	Tox
<i>F. verticillioides</i>	ITEM 2142				
<i>F. vorosii</i>	CBS119178				
<i>F. graminearum</i>	PD 88/790	22:01			
<i>F. culmorum</i>	SVP 8906	27:46		8:37	10:37
<i>F. asiaticum</i>	bfb0082_1	neg			
<i>F. graminearum</i>	Fg 820			10:07	7:37
<i>F. sporotricioides</i>	ITEM 3596		7:01		
<i>F. poae</i>	PD 93-1780		neg		
<i>F. langsethiae</i>	PRI 07-01		8:31		
<i>F. graminearum</i>	16D1			8:37	8:37
<i>F. avenaceum</i>	IPO 92-3				

## Discussie

De LAMP technologie biedt goede mogelijkheden voor een snelle on-site detectie. Wel vraagt de LAMP technologie veel van de primer design. Bij de LAMP technologie wordt gebruik gemaakt van 6 verschillende primers, waarbij het lastig is om in te schatten wat het effect van eventuele mismatches in de primerregio's is. Ook omdat bekend is dat in natuurlijke Fusarium populaties voor sommige gebieden in het genoom veel sequentiepolymorfisme voorkomt. Het is daarom van belang de LAMP assays op een grote populatie te testen en zoals beschreven in onderdeel II, net als bij TaqMan assays meerdere parallelle LAMP toetsen te ontwikkelen. Regelmatige controle van de toets zal wenselijk zijn om mogelijke misidentificatie (zowel vals-positieve als vals-negatieve resultaten op te sporen). Helaas hebben we bij het testen van de specificiteit al een aantal miscorrelaties gevonden. Eerder waren voor de ontwikkelde LAMP assays voor Fusarium al miscorrelaties beschreven. Wellicht dat een aantal van de huidige LAMP assays in de Nederlandse praktijk niet voldoen. Met name de detectie van *F. culmorum* en van *F. poae* is mogelijk een probleem. Deze soorten worden vrij algemeen gevonden in Nederland en produceren ook trichothecenen, maar kunnen op soort basis op dit moment niet goed gedetecteerd worden. De nieuw ontwikkelde toets voor trichothecenen B producenten (voornamelijk *F. culmorum* en *F. graminearum*) lijkt het beter te doen. Deze zal echter nog gecompliceerder moeten worden met een toets voor producenten van Type A trichothecenen. LAMP staat internationaal gezien erg in de belangstelling en mogelijk dat we samen met onze Chinese partner IPP-CAAS en andere groepen tot een beter pakket van LAMP assays kunnen komen. Samenvattend verwachten we dat de LAMP technologie een efficiënte, snelle toets kan worden die door telers en/of adviseurs kan worden ingezet. De voordelen van LAMP zijn evident. De kosten, de logistiek, het iteratief doorzoeken van graanvelden of geoogst product later in de keten, de snelle uitslag die ter plaatse beslissingen kan ondersteunen en interventies mogelijk maakt. Zaken die voor de teler, adviseur en andere stakeholders in de keten van groot belang zijn. Daarnaast doet de assay niet onder voor de standaard PCR, die nu nog in een groot aantal routine labs wordt uitgevoerd ter ondersteuning van telers. Mogelijk kan door uitgekende design van de primers en probes ondersteund door Next Generation Sequencing (NGS) en whole genome comparative analysis, de kwaliteit van de toetsen voor Fusarium verder worden verbeterd. Een nadeel is wel dat kwantificatie van de hoeveelheid Fusarium en ook het analyseren van complexe monsters met behulp van de LAMP technologie momenteel lastig is. Hiervoor zijn de eerder ontwikkelde TaqMan assay en de Luminex assay beter geschikt. Deze technologieën kunnen alleen in een goed geoutilleerd laboratorium worden uitgevoerd, maar zijn ook kosteneffectief en voor grote aantallen monsters geschikt. Samenwerking met meerdere partijen in de keten en de keuze van de juiste technologie op de juiste plaats zal het mogelijk maken om een juiste identificatie van toxine producerende Fusarium soorten uit te voeren en zo mycotoxinen in graanketen beter te kunnen inschatten en de juiste maatregelen te nemen om de risico's voor consument en dier te verkleinen.

## Referenties

- Boutigny AL, Ward TJ, Ballois N, Iancu G, Iosif R. 2014. Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *Eur. J. Pl. Pathol.* **138**: 133-148
- De Nijs, M., Soentoro, P., Delfgou- van Asch, E., Kamphuis, H., Rombouts, F.M. and Notermans, S.H.W. 1996. Fungal infection and presence of deoxynivalenol and zearalenone in cereals grown in The Netherlands. *J. Food Prot.* **59**: 772-777.
- Prodi A, Tonti S, Nipoti P, Pancaldi D, Pisi A. 2009. Identification of deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from durum wheat in a restricted area of northern Italy. *J. Pl. Pathol.* **91**: 727-731
- Denschlag C, Rieder J, Vogel RF, Niessen L. 2014 Real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for group specific detection of important trichothecene producing *Fusarium* species in wheat. *Int J Food Microbiol.* **177**:117-27.
- EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). 2013. Scientific Opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. *EFSA J.* **11**:3262, 119 pp.
- Fels-Klerx HJ, van der; Rijk TC de, Booi CJH, Goedhart PW, Boers EAM, Zhao C, Waalwijk C, Mol JGJ, Lee TAJ van der, 2012. Occurrence of *Fusarium* Head Blight species and *Fusarium* mycotoxins in winter wheat in the Netherlands in 2009. *Food Additives & Contaminants.* **29**: 1716 - 1726
- Gale LR, Ward TJ, Kistler HC. 2010. A subset of the newly discovered northland population of *Fusarium graminearum* from the US does not produce the B-type trichothecenes DON, 15ADON, 3ADON or NIV. In: *Proc. 2010 Nat'l Fusarium Head Blight Forum, Milwaukee, Wisconsin, USA, December 7-9, 2010*, p. 48
- Jennings P, Coates ME, Walsh K, Turne, JA, Nicholson P. 2004. Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Pl. Pathol.* **53**: 643 –652
- Nielsen LK, Jensen JD, Nielsen GC, Jensen JE, Spliid NH, Thomsen IK, Justesen AF, Collinge DB, Jørgensen LN. 2011. *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. *Phytopathol.* **101**:960-969
- Parry DW, Jenkinson P, McLeod L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals a review. *Pl. Pathol.* **44**: 207-238.
- Mol HGJ, Plaza-Bolaños P, Zomer P, de Rijk TC, Stolker, AAM, Mulder PPJ. 2008. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Anal Chem*, **80**: 9450–9459.
- Niessen L, Vogel RF, 2010 Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Int J Food Microbiol.* **15**:140(2-3):183-91.
- Schothorst RC, van Egmond HP. 2004. Report from SCOOP task 3.2.10 “collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states”. Subtask: trichothecenes. *Toxicol. Lett.* **153**: 133–143
- Somma S, Petruzzella AL, Logrieco AF, Meca G, Cacciola, OS Moretti A. 2014. Phylogenetic analyses of *Fusarium graminearum* strains from cereals in Italy, and characterisation of their molecular and chemical chemotypes. *Crop Past. Sci.* **65**: 52-60
- Starkey DE, Ward TJ, Aoki T, Gale LR, Kistler, HC, Geiser DM, Suga, H, Tòth B, Varga, J, O'Donnell K. 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fung. Genet. Biol.* **44**, 1191–1204
- Spanjer MC, Rensen PM, Scholten JM. 2008. LC–MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Addit Contam.* **25**: 472–489.
- Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher, R. 2006. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **20**: 2649–2659.
- Talas F, Parzies HK, Miedaner T. 2011. Diversity in genetic structure and chemotype composition of *Fusarium graminearum* sensu stricto populations causing wheat head blight in individual fields in Germany. *Eur. J Pl. Pathol.* **131**:39–48
- Umpiérrez-Failache, M, Garmendia, G, Pereyra, S, Rodríguez-Haralambides, A, Ward, TJ, Vero S. 2013. Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *Int J Food Microbiol.* **166**:135-140

- Waalwijk C, de Vries PhM, Köhl J, Xu X, van der Lee TAJ, Kema GHJ. 2008. Development of quantitative detection methods for *Fusarium* in cereals and their application. In: "Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade" J. Leslie, R. Bandyopadhyay and A. Visconti (eds). Pp.195-205. CAB International. ISBN 978-1-84593-082-0
- Waalwijk C, Kastelein P, de Vries PM, Kerenyi Z, van der Lee T, Hesselink T, Kohl J, Kema GHJ. 2003. Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. Eur. J. Pl. Pathol. **109**: 743-754
- Waalwijk, C, Koch, SH, Ncube, E, Allwood, J, Flett, B, de Vries, I and Kema, GHJ. 2008. Quantitative detection of *Fusarium* spp. and its correlation with fumonisin content in maize from South African subsistence farmers. World Mycotoxin Journal **1**: 39-47.
- Waalwijk C, Köhl J, de Vries I, van der Lee T. 2009. Fusarium in winter wheat 2007-2008- Inventory, identification and quantification of new species (PRI report 272 in Dutch)
- Ward TJ, Bielawski JP, Kistler HC, Sullivan E, O'Donnell K. 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. Proc. Nat'l Acad. Sci. **99**: 9278–9283
- Ward TJ, Clear RM, Rooney AP, O'Donnell K, Gaba D, Patrick S, Starkey DE, Gilbert J, Geiser DM, Nowicki TW. 2008. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. Fung. Genet. Biol. **45**: 473–484
- Yang L, van der Lee T, Yang X, Yu D, Waalwijk C. 2008. *Fusarium* populations on Chinese barley show a dramatic gradient in mycotoxin profiles. Phytopathol. **98**: 719–727
- Yli-Mattila T, Gagkaeva T, Ward TJ, Aoki T, Kistler HC, O'Donnell K. 2009. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Far East of Russia. *Mycologia* **101**, 841–852.
- Zhang H, Van der Lee T, Waalwijk C, Chen W, Xu J, Xu J, Zhang Y, Feng J. 2012. Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *PLoS ONE* **7**, e31722
- Zhang Z, Zhang H, van der Lee TAJ, Li C, Arens P, Xu J, Xu JS, Yang LJ, Yu DZ, Waalwijk C, Feng J. 2010a. Genetic diversity studies on *Fusarium asiaticum* isolates collected from barley in China show a clear substructure associated with their geographic origin. Eur. J. Pl. Pathol. **127**: 239-248
- Zhang H, Zhang Z, Van der Lee T, Xu J, Yang L, Yu D, Waalwijk C, Feng J. 2010b. Population genetic analyses of *Fusarium asiaticum* populations from barley suggest a recent shift favoring 3ADON producers in southern China. Phytopathol. **100**: 328–336.
- Zhang JB, Li HP, Dang FJ, Qu B, Xu YB, Zhao CS, Liao YC. 2007 Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China Mycol. Res. **111**: 967-975.



## Bijlage 1

Tabel 1. Detectie van *F. graminearum* en vaststellingen van chemotypen in referentie isolaten met behulp van TaqMan assays. Voor elke Fusarium isolaat is het isolaatnummer, de soort, van welke waardplant **de Fusarium** geïsoleerd is, het land van herkomst, de oorspronkelijke karakterisatie m.b.t. het Toxine dat geproduceerd wordt (zowel door een diagnostische PCR als door een Luminex assay) en de Ct waarde van de verschillende nieuwe TaqMan assay (achtereenvolgens: TRI3 NIV, TRI12 NIV, TRI3 3ADON, TRI12 3ADON, TRI3 15ADON, TRI12 15ADON en *F. graminearum*). Verwachte positieve waarden zijn in groen aangegeven waarbij voor een specifieke reactie minimaal 10 Ct hoger moet liggen (dit komt overeen met een factor 1000 minder gevoelig). Resultaten van Ct waarde die afwijken van de verwachting zijn in rood weergegeven. De resultaten worden in onderdeel "Optimalisatie van de bepaling van de hoeveelheid Fusarium met behulp van de moleculaire diagnostische methode TaqMan en het bepalen van de voornaamste variaties in van de bepaling" verder beschreven en geanalyseerd.



Isolate code	Species	Host/ substrate	Geographic origin	Toxin (PCR)	Toxin (Luminex)	Ct						<i>F.g</i> <i>clade</i>
						TRI3 NIV	TRI12 NIV	TRI3 3ADON	TRI12 3ADON	TRI3 15ADON	TRI12 15ADON	
NRRL2903	<i>F. austroamericanum</i>	Polypore	Brazil		3ADON	31	ND	20	20	31	31	19
NRRL28718	<i>F. austroamericanum</i>	Corn	Brazil		3ADON	30	ND	20	20	37	37	19
NRRL28436	<i>F. meridionale</i>	Orange twig	New Caledonia		NIV	20	19	30	29	37	ND	18
NRRL28723	<i>F. meridionale</i>	Corn	Nepal		NIV	21	19	36	39	35	36	19
NRRL29010	<i>F. meridionale</i>	Soil	South Africa		NIV	23	21	ND	ND	29	28	21
NRRL29020	<i>F. boothii</i>	Corn	South Africa		15ADON	31	29	37	37	20	20	19
NRRL26916	<i>F. boothii</i>	Corn	South Africa		15ADON	ND	ND	30	30	20	20	19
NRRL29011	<i>F. boothii</i>	—	South Africa		15ADON	34	30	30	30	20	20	18
NRRL29105	<i>F. boothii</i>	Corn	Nepal		15ADON	28	27	32	31	20	19	18
NRRL25797	<i>F. mesoamericanum</i>	Banana	Honduras		NIV	23	19	30	27	35	ND	19
NRRL29148	<i>F. mesoamericanum</i>	Grape ivy	USA		3ADON	31	ND	20	20	ND	ND	19
NRRL26752	<i>F. acacia-mearnsii</i>	<i>Acacia mearnsii</i>	South Africa		NIV	21	19	32	28	ND	38	19
NRRL26754	<i>F. acacia-mearnsii</i>	<i>A. mearnsii</i>	South Africa		NIV	21	19	35	28	36	35	19
NRRL26755	<i>F. acacia-mearnsii</i>	<i>A. mearnsii</i>	South Africa		NIV	20	18	32	27	30	29	18
NRRL6101	<i>F. asiaticum</i>	Barley	Japan		3ADON	ND	ND	19	19	29	29	18
NRRL13818	<i>F. asiaticum</i>	Barley	Japan		NIV	21	19	33	28	30	29	19
NRRL26156	<i>F. asiaticum</i>	Wheat	China		3ADON	30	ND	18	18	27	27	18
NRRL28720	<i>F. asiaticum</i>	Corn	Nepal		?	24	22	35	30	21	25	18
NRRL28721	<i>F. asiaticum</i>	Corn	Nepal		NIV	20	19	32	31	33	32	18
NRRL6394	<i>F. graminearum</i>	Millet	Hungary		3ADON	29	28	21	20	30	29	28
NRRL13383	<i>F. graminearum</i>	Corn	Iran		NIV	21	18	31	27	31	30	18
NRRL28063	<i>F. graminearum</i>	Corn	USA		15ADON	35	33	34	35	20	18	18
NRRL29169	<i>F. graminearum</i>	Wheat	USA		15ADON	31	30	33	32	22	21	20
NRRL3288	<i>F. culmorum</i>	—	—		3ADON	31	ND	20	19	32	31	ND
NRRL25475	<i>F. culmorum</i>	Barley	Denmark		3ADON	28	ND	19	19	27	27	27
NRRL13721	<i>F. cerealis</i>	Potato	Poland		NIV	21	18	30	27	34	33	ND
NRRL25491	<i>F. cerealis</i>	<i>Iris hollandica</i>	Netherlands		NIV	20	18	37	27	36	ND	ND
NRRL25805	<i>F. cerealis</i>	Soil	Columbia		NIV	20	19	ND	27	34	32	ND
NRRL13393	<i>F. lunulosporum</i>	<i>Citrus paradisi</i>	South Africa		NIV	21	19	29	29	32	32	19
NRRL28062	<i>F. pseudograminearum</i>	Barley	Australia		3ADON	30	ND	20	20	32	32	23
NRRL28065	<i>F. pseudograminearum</i>	<i>Medicago sp.</i>	South Africa		3ADON	34	ND	18	19	32	33	22
NRRL28338	<i>F. pseudograminearum</i>	Soil	Australia		3ADON	34	ND	20	19	33	32	23

5A1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	15ADON	15ADON	38	33	36	ND	20	20	19
6D1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	36	ND	20	19	34	29	18
15G1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	36	ND	21	20	35	36	20
20D1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	15ADON	15ADON	ND	ND	39	ND	20	20	19
24F2	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	ND	ND	21	20	35	ND	20
26G1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	15ADON	15ADON	ND	ND	ND	ND	20	20	19
28G1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	ND	ND	21	20	35	ND	19
30H2	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	15ADON	3ADON	ND	ND	40	ND	20	21	19
32I2	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	34	ND	21	20	ND	34	20
34A1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	NIV	NIV	21	19	ND	28	37	36	19
35E1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	ND	ND	21	20	35	ND	19
52B2	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	NIV	NIV	20	18	ND	27	ND	ND	19
65B1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	15ADON	15ADON	ND	ND	37	ND	20	21	20
69C1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	NIV	NIV	21	18	ND	28	38	ND	20
70A2	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	15ADON	15ADON	ND	ND	37	ND	20	20	19
70E1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	ND	ND	21	21	34	38	20
75B1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	NIV	NIV	20	18	ND	27	ND	ND	19
75B2	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	NIV	NIV	21	19	ND	27	ND	ND	20
76D1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	ND	ND	21	20	34	37	19
76D2	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	ND	ND	22	21	ND	ND	20
76E1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	15ADON	15ADON	37	ND	40	ND	21	21	20
77D1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	ND	28	21	20	35	ND	19
77E1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	ND	ND	22	21	ND	ND	20
78A1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	37	ND	22	21	ND	ND	20
79A1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	NIV	NIV	22	20	ND	29	ND	38	22
79C1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	ND	ND	21	20	34	ND	19
79D1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	ND	ND	21	20	34	37	20
79E1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	15ADON	15ADON	ND	ND	39	ND	20	20	20
bfb0173_1	<i>F. meridionale</i>	barley	China	NIV dun	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
bfb0990_1	<i>F. graminearum</i>	barley	China	15ADON	15ADON	ND	ND	ND	ND	21	21	20
bfb0999_1	<i>F. graminearum</i>	barley	China	15ADON	15ADON	ND	ND	35	37	20	20	19
bfb1068_1	<i>F. graminearum</i>	barley	China	15ADON	15ADON	37	34	39	ND	20	20	19
bfb1117_1	<i>F. meridionale</i>	barley	China	NIV	NIV	19	17	33	33	34	35	18
bfb1124_1	<i>F. meridionale</i>	barley	China	NIV	NIV	19	18	ND	ND	35	36	19
bfb1300_1	<i>F. asiaticum</i>	barley	China	3ADON	3ADON	37	ND	20	20	33	34	19
C2a	<i>F. graminearum</i>	wheat	France	15ADON	15ADON	ND	ND	ND	ND	21	20	20
C9a	<i>F. graminearum</i>	wheat	France	15ADON	15ADON	ND	ND	32	32	20	20	19
CH103b	<i>F. asiaticum</i>	wheat	China	NIV	NIV	21	19	ND	28	ND	ND	19

CH104a	<i>F. asiaticum</i>	wheat	China	3ADON	3ADON	34	ND	19	19	33	35	18
CH106a	<i>F. asiaticum</i>	wheat	China	3ADON	3ADON	36	ND	19	18	34	ND	17
CH108b	<i>F. asiaticum</i>	wheat	China	NIV	NIV	20	18	37	28	33	37	19
CH110a	<i>F. asiaticum</i>	wheat	China	3ADON	3ADON	35	ND	19	19	34	ND	18
CHG005	<i>F. asiaticum</i>	maize	China	NIV	NIV	21	19	ND	29	ND	37	20
CHG009	<i>F. graminearum</i>	maize	China	15ADON	15ADON	ND	ND	ND	37	20	21	20
CHG013	<i>F. graminearum</i>	maize	China	15ADON	15ADON	ND	ND	36	ND	20	21	20
CHG019	<i>F. graminearum</i>	maize	China	15ADON	15ADON	ND	ND	36	36	17	21	20
CHG113	<i>F. graminearum</i>	maize	China	15ADON	15ADON	36	ND	ND	ND	21	21	20
CHG116	<i>F. graminearum</i>	maize	China	15ADON	15ADON	35	34	37	ND	21	21	20
CHG119	<i>F. graminearum</i>	maize	China	15ADON	15ADON	ND	ND	ND	ND	21	21	21
CHG134	<i>F. boothii</i>	maize	China	15ADON	15ADON	ND	ND	ND	ND	20	21	20
CHG142	<i>F. graminearum</i>	maize	China	15ADON	15ADON	ND	ND	39	33	20	20	19
CHG157	<i>F. graminearum</i>	maize	China	15ADON	15ADON	ND	ND	37	35	20	21	20
CHG211	<i>F. boothii</i>	maize	China	15ADON	15ADON	ND	ND	ND	ND	21	21	21
CHG220	<i>F. graminearum</i>	maize	China	15ADON	15ADON	ND	33	ND	37	20	21	20
CHG226	<i>F. boothii</i>	maize	China	15ADON	15ADON	ND	ND	39	ND	19	19	18
CHG240	<i>F. meridionale</i>	maize	China	NIV	NIV	20	18	ND	ND	35	37	19
CHG261	<i>F. boothii</i>	maize	China	15ADON	15ADON	ND	ND	38	ND	19	19	18
EO K 2.15	<i>F. boothii</i>	unknown	unknown	15ADON	15ADON	ND	ND	ND	ND	23	23	22
EO K 2.21	<i>F. boothii</i>	unknown	unknown	15ADON	15ADON	ND	33	ND	ND	23	23	22
FG 06	<i>F. graminearum</i>	rye	Germany	NIV	NIV	21	19	39	28	37	36	20
FG 08	<i>F. graminearum</i>	rye	Germany	15ADON	15ADON	ND	ND	ND	ND	20	20	19
IPO 1868	<i>F. graminearum</i>	wheat	unknown	NT	NIV	18	16	ND	26	33	33	ND
L14b	<i>F. graminearum</i>	wheat	France	15ADON	15ADON	38	ND	37	ND	20	21	20
L2a	<i>F. graminearum</i>	wheat	France	15ADON	15ADON	ND	ND	33	33	20	20	19
L3b	<i>F. graminearum</i>	wheat	France	15ADON	15ADON	ND	ND	37	ND	19	20	19
MRC 6010	<i>F. boothii</i>	maize	unknown	15ADON	15ADON	36	ND	38	ND	19	19	18
PH-1	<i>F. graminearum</i>	maize	USA	15ADON	15ADON	ND	ND	35	37	20	21	20
SVP 8901	<i>F. culmorum</i>	wheat	Netherlands	NIV	NIV	21	24	ND	ND	34	35	ND
ITEM 3593	<i>F. sporotrichioides</i>	oat kernel	unknown	NT	3ADON	35	ND	29	28	35	ND	31
TAPO 21	<i>F. poae</i>	unknown	unknown	NT	ND	ND	36	36	37	ND	ND	ND
16D1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	NIV	NIV	20	19	ND	26	37	ND	20
31F1	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	3ADON	3ADON	37	ND	21	19	36	36	19
68D2	<i>F. graminearum</i>	wheat	Netherlands	15ADON	15ADON	36	ND	ND	ND	21	21	19
bfb0082_1	<i>F. asiaticum</i>	barley	China	3ADON	3ADON	ND	ND	21	19	ND	ND	19
bfb0982_1	<i>F. asiaticum</i>	barley	China	NIV	NIV	21	19	ND	26	ND	37	19
CH024b	<i>F. asiaticum</i>	wheat	China	15ADON	15ADON	ND	ND	ND	ND	22	26	20

SVP 8906	<i>F. culmorum</i>	wheat	Switzerland	3ADON	3ADON	ND	ND	21	19	34	37	ND
----------	--------------------	-------	-------------	-------	-------	----	----	----	----	----	----	----