Project No. 12-03

BODEMGEBONDEN SCHIMMELZIEKTEN
Identificatie en detectie van *Rhizoctonia solani*

Projectleider: J.H.M. Schneider

1. Inleiding

Rhizoctonia solani kan al vroeg in het seizoen de jonge bietenplanten aantasten. De symptomen lijken op wortelbrand. Wortelbrand wordt echter ook veroorzaakt door *Aphanomyces cochlioides* en *Pythium ultimum* (zie project 03-02). De veroorzaker van wortelbrand kan alleen in het laboratorium eenduidig worden vastgesteld door de schimmel te isoleren en op te kweken. *R. solani* kan ook later in het groeiseizoen bieten aantasten.
Een voorspelling van de kans op schade, gebaseerd op een biotoets, draagt bij tot een duurzame en rendabele beheersing van de ziekte en is onontbeerlijk bij de inzet van resistente rassen. Een complex van schimmels veroorzaakt wortelbrand; de ontwikkeling van een biotoets dient daarom hand in hand te gaan met een snelle en eenduidige identificatie van het schimmelcomplex. Daarom worden de mogelijkheden voor een moleculaire identificatie en detectiemethode van de belangrijkste ziekteverwekkers onderzocht.

2. Werkwijze

2.1 Identificatie en pathogeniteit

Van de door rhizoctonia aangetaste bietenmonsters werd in het laboratorium de schimmel op kweek gebracht en geïdentificeerd via de pectinezymogrammethode. Pectinezymogrammen zijn patronen van pectine afbrekende enzymen die in het laboratorium via gelelektroforese zichtbaar worden gemaakt. Een soort streepjescode voor enzymen. Pectine is een belangrijk deel van de celwand van planten en de verschillende patronen correleren met anastomosegroepen (AG) en wellicht met pathogeniteit. Rhizoctonia-isolaten werden verzameld van bietenmonsters uit Nederland en verkregen via collega's in het buitenland.
Van een selectie van isolaten is de pathogeniteit op zaailingen in klimaatkastexperimenten bij 10°C en 23°C vastgesteld.

2.2 Moleculaire identificatie en detectie

Het maken van pectinezymogrammen is tijdrovend. Bovendien is er nogal wat variatie binnen de bandjespatronen die afhankelijk is van het isolaat en de opkweek. Variatie in pectinezymograampatronen wordt verder onderzocht door anastomosetoetsen onder de microsoop te verrichten en DNA-technieken. De verschillende anastomosegroepen van *R. solani* zijn genetisch verschillend. Ook binnen de verschillende AG's is er genetische variabiliteit. Voor een snelle en eenduidige detectiemethode is het essentieel de genetische variabiliteit te onderzoeken. Variatie in het DNA wordt onderzocht door verschillende technieken toe te passen:

1. met behulp van algemene stukjes DNA (zo'n stukje DNA dat dient om een bepaald deel te vermeerderen heet een primer) wordt een deel van het DNA, hier het ITS-gebied, vermeerderd in een PCR-machine. Het ITS-gebied is een gebied op het DNA dat de genen scheidt die coderen voor de ribosomen (de eiwitfabrieken van de cel). Dit vermeerderde deel van het DNA kan variëren in grootte, wat via een gel-elektroforesetechniek zichtbaar wordt gemaakt. De variatie is groter tussen AG's, dan binnen de AG's en kan dienen als hulpmiddel bij identificatie;
2. met behulp van andere, zogenaamde RAPD's, primers kunnen bandjespatronen (streepjescodes) worden verkregen op een gel. Ook hier geldt dat de variatie in bandjes een hulpmiddel is bij de identificatie. Op basis van rDNA- en RAPD-technieken kunnen primers ontworpen worden die specifiek zijn voor bijvoorbeeld AG 2-2IIIB. Uit een publicatie en van een Japanse collega zijn de sequenties voor specifieke primers voor AG 2-2IIIB verkregen om te toetsen op hen specificiteit. Van 95 isolaten en enkele buitenlandse isolaten van suikerbieten is de genetische variatie onderzocht met rDNA-ITS en RAPD en is de specificiteit van drie primers getest.

2.3 Detectie in grondmonsters

Mpn-methode
Op de voorvruchtenproefvelden van Hummelo en Someren zijn periodiek grondmonsters genomen, bij zaaien in april, mei, juli en augustus. Grondmonsters uit de objecten suikerbieten, zwarte braak, maïs en gele mosterd 'Maxi' werden in de kas getoetst. De mate van grondbesmetting werd geschat met een mpn-methode.

Natuurlijke ziektewering tegen rhizoctonia
Op de proefvelden Someren en Hummelo bleef de rhizoctonia-aantasting ver achter bij de verwachting. Daarom werd besloten om eind augustus een aantal proefvelden en praktijkpercelen te bemonsteren en te toetsen op de weerstand tegen rhizoctonia. De mate van ziektewering kan worden geschat door rhizoctonia in verschillende dichtheden aan grondmonsters toe te voegen. Deze proeven worden uitgevoerd in biotoetsen in de kas.

3. Resultaten

3.1 Identificatie en pathogeniteit

In 2000 werden 106 isolaten van *Rhizoctonia solani* geïsoleerd van geïnfecteerde bietenplanten. De bietenmonsters werden verkregen van praktijkpercelen en van IRS-proefvelden. De symptomen varieerden van wortelbrand in april tot wortelrot eind augustus. De isolaten werden geïdentificeerd volgens de pectinezymogrammethode. De voorlopige resultaten staan in tabel 37 en 38. Van de isolaten verzameld in 2000 bleek 71% tot AG 2-2IIIB te behoren. In de periode 1997-2000 werden 334 rhizoctonia-isolaten verkregen. Het percentage AG 2-2IIIB daarvan was 71. Opvallend was dat bij pathogeniteitstesten niet alle isolaten ziekteverwekkend waren (tabel 38).

Tabel 37. Overzicht van verzamelde isolaten van anastomosegroepen van *Rhizoctonia solani* over de periode 1997-2000.

	1997	1998	1999	2000	totaal
AG2-2IIIB	24	45	94	75	238
AG2-2IIIB?	6	2	5	2	15
1-IC	2	2	1	1	6
H	5	3	0	0	8
5	0	5	1	1	7
3	0	0	8	0	8
overig	3	10	12	27	52
totaal	40	67	121	106	334

Tabel 38. Genetische variatie in een collectie van AG 2-2IIIB-isolaten uit Nederland (2000).

waardplant	aantal isolaten[1]	lengte ITS-gebied[2]	RAPD[3]	22sp1[4]			22spk[4]			pathogeniteit[5]	
				+	-	+/-	+	-	+/-	+	-
suikerbiet	63	702-764	s,b,h,?	46	12	2	58	0	9	45	10
maïs	5	748-778	b	4	1	0	3	0	2	4	0
waspeen	6	742-768	b	4	1	1	6	0	0	6	0
schorseneer	3	745-749	b	2	1	0	3	0	0	2	1
gladiool	1	708	s	1	0	0	1	0	0	1	0
melganzevoet	1	-	h	0	1	0	1	0	0	0	1
lelie	7	761-771	b	6	1	0	2	0	5	2	0
aardappel	2	718-753	b,?	1	1	0	2	0	0	1	1
voederbiet	1	764	b	1	0	0	1	0	0	1	0
engelwortel	1	760	a	1	0	0	1	0	0	1	0
maggi	1	704	b	1	0	0	1	0	0	1	0
spinazie	1	769	-	1	0	0	0	0	1	*	*
rode biet	1	731	s	1	0	0	1	0	0	1	0
cichorei	1	708	-	0	1	0	0	0	1	0	1
rabarber	1	687	-	0	1	0	0	0	1	0	1

[1] Aantal AG 2-2IIIB-isolaten volgens de pectinezymogrammethode.
[2] Lengte ITS gebied in basenparen.
[3] RAPD: verschillende bandjespatronen gecodeerd met a,b,s,h,? -: niet gedaan.
[4] + = positief signaal; - = geen signaal; +/- = zwak of onduidelijk signaal.
[5] Pathogeniteit bij 23°C: +:aantal isolaten dat ziekteverwekkend is; -: aantal isolaten dat niet ziekteverwekkend is (niet alle mogelijke isolaten zijn getoetst); * = niet gedaan.

3.2 Moleculaire identificatie en detectie

Van de AG 2-2IIIB-isolaten over 1997-1999 zijn er 95 geselecteerd naar symptomen, regio en waardplant en onderzocht op variabiliteit in DNA en pathogeniteit. Uit de voorlopige resultaten blijkt een behoorlijke genetische variatie. Met name de grootte van het ITS-gebied verschilt tussen de isolaten. Binnen AG 2-2IIIB zijn er enkele verschillende RAPD-patronen te onderscheiden (tabel 38). Wellicht komt dit overeen met symptomen of geografische herkomst. Nadere analyse zal dit moeten uitwijzen.
Er zijn drie specifieke primers getoetst, te weten 22sp1, 22sp2 en 22spk. Dit zijn stukjes DNA die specifiek AG 2-2IIIB aantonen. De primer 22sp2 bleek onvoldoende specifiek en gaf bandjes op de verkeerde plaats. Primer

22sp1 toonde wel AG 2-2IIIB-isolaten aan met bandjes op de juiste plaats. Echter, toch nog circa twaalf van de zestig niet, zogenaamde vals-negatieven. Ook deze primer is dus onvoldoende specifiek. Primer 22spk, verkregen van collega's uit Japan, bleek beter en toonde 89% van de isolaten aan, had geen negatieven waar positieven verwacht werden, maar er zijn enkele vragen bij de vage reacties (+/-, tabel 38). De data moeten nog nader, per getoetst isolaat, uitgewerkt worden voordat definitieve conclusies getrokken kunnen worden.
De variabiliteit binnen anastomosegroepen van *R. solani* is groot en niet alle isolaten konden dan ook direct op naam worden gebracht. Met aanvullend DNA-onderzoek kan identificatie worden afgerond. Dit is met name belangrijk voor de categorie 'overig' en 'H' (Halsteren), samen goed voor ongeveer 17% van het totaal aan isolaten. De H-isolaten zijn ook pathogeen voor suikerbieten, maar hebben een afwijkend zymogram- en RAPD-patroon. Dit laatste is aangeduid met 'h' in tabel 38. Deze isolaten worden wel herkend met primer 22spk. Pathogeniteitsgegevens van de groep 'overig' en 'H' vormen samen met DNA-onderzoek de basis voor detectie van de voor suikerbieten pathogene rhizoctonia's. Het is belangrijk verder te onderzoeken hoe de resistente rassen reageren op de isolaten uit de categorie 'overig'.

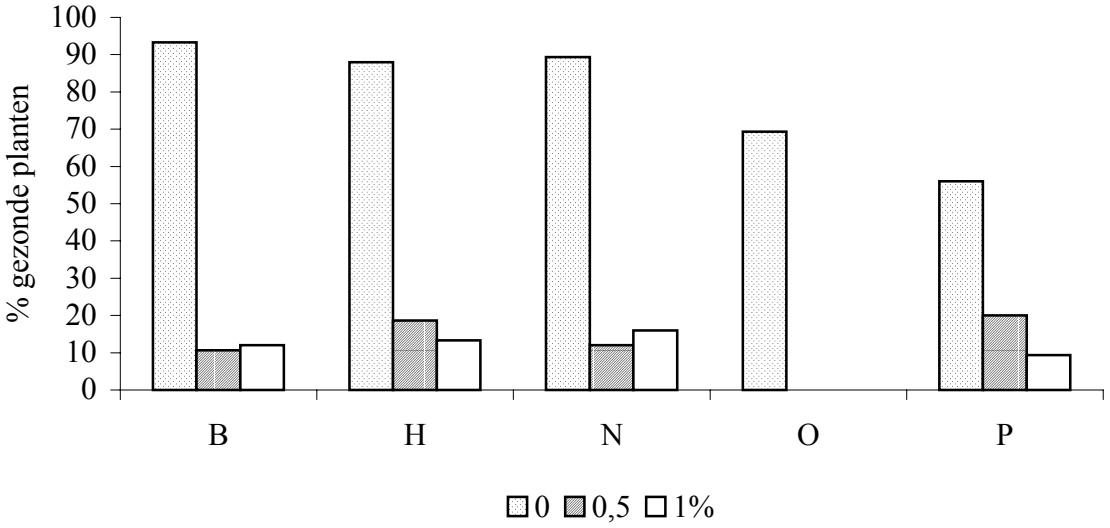
3.3 Detectie in grondmonsters

Mpn-methode

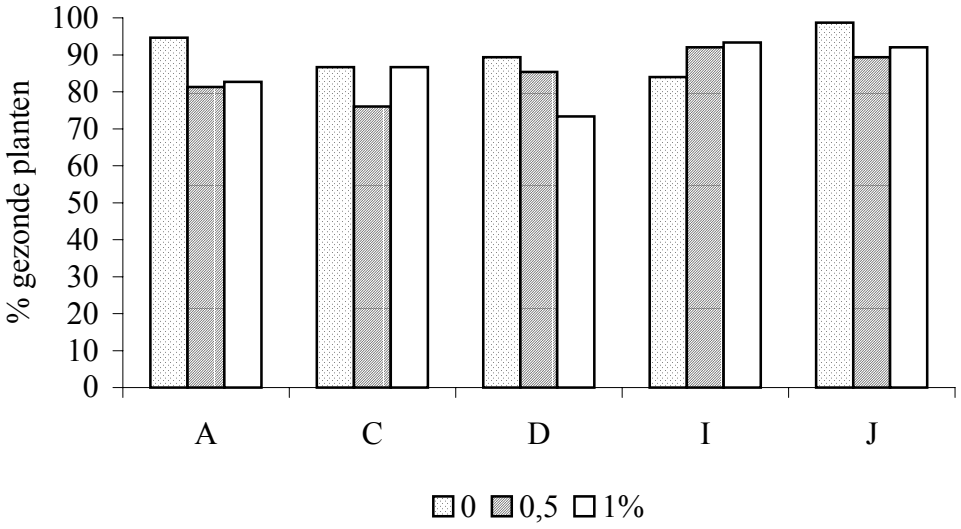
De mate van besmetting van grondmonsters van de proefvelden Someren en Hummelo werd getoetst met een mpn-methode. Op proefveld Someren was er in het veld gedurende het hele seizoen nauwelijks aantasting door rhizoctonia. In de biotoets in de kas werd dan ook, op een enkel plantje na, geen aantasting door rhizoctonia gevonden. Op proefveld Hummelo trad in mei en juni nogal wat wortelbrand op (zie ook project 12-04). De aantasting zette echter niet door. In grondmonsters genomen in het voorjaar werden plantjes in de biotoets aangetast door rhizoctonia. In grondmonsters genomen in juli en augustus was dat niet het geval. De gegevens zijn nog niet statistisch verwerkt.

Natuurlijke ziektewering tegen rhizoctonia

Van de negentien getoetste grondmonsters bleken er vijf een lage natuurlijke ziektewering tegen rhizoctonia te hebben. Binnen twee weken na het zaaien van de bieten in grondmonsters waarin een lage dosering van rhizoctonia was toegevoegd, vielen gemiddeld tussen de 80-100% van de plantjes weg (figuur 7).
Grondmonster B was afkomstig van een cercospora-proefveld met bieten zonder rhizoctonia.
Grondmonsters N, O en P waren afkomstig van percelen waar minstens 15 jaar geen bieten hadden gestaan en dit jaar wel. Op perceel P was wel rhizoctonia geconstateerd, wat terugkwam in de biotoets. Aan de grondmonsters waaraan geen rhizoctonia was toegevoegd, vielen toch plantjes weg door rhizoctonia.
Grondmonster H was afkomstig van een perceel met wintertarwe, waarop in 1999 zware aantasting met rhizoctonia in suikerbieten was geconstateerd.
Vijf grondmonsters bleken een hoge natuurlijke ziektewering tegen de rhizoctoniaschimmel te hebben (figuur 8). In deze grondmonsters werd 8-25% van de plantjes geïnfecteerd na toevoeging van rhizoctonia. In de controle, waarbij geen rhizoctonia was toegevoegd, werden gemiddeld 2 tot 16% van de plantjes aangetast.
Grondmonster A was afkomstig van een perceel waar in 1996 zwaar rhizoctonia was opgetreden en bij een bietenteelt in 1998 nagenoeg geen schade optrad.
Grondmonsters C, I en J waren afkomstig van percelen waar in 2000 rhizoctoniaschade was opgetreden.
Grondmonster D was afkomstig van proefveld Someren, waar in 1999 zware rhizoctoniaschade was opgetreden en in 2000 niet. Statistische verwerking moet nog plaatsvinden. Indien dezelfde gronden bij herhaling dezelfde mate van ziektewering laten zien tegen rhizoctonia, is het de moeite waard deze gronden te analyseren op antagonisten. Dergelijke antagonisten kunnen wellicht via het pillenzaad of een andere toepassing worden gebruikt om rhizoctoniaschade te verminderen.



Figuur 7. Gronden (B, H, N, O, P) met een lage ziektewering tegen *Rhizoctonia solani* in een biotoets waaraan respectievelijk 0, 0,5 en 1% van een rhizoctoniacultuur is toegevoegd. Het percentage gezonde planten is twee weken na zaaien gemeten in een biotoets (2000).



Figuur 8. Gronden (A, C, D, I, J) met een hoge natuurlijke ziektewering tegen *Rhizoctonia solani* in een biotoets waaraan respectievelijk 0, 0,5 en 1% van een rhizoctoniacultuur is toegevoegd. Het percentage gezonde planten is vier weken na zaaien gemeten in een biotoets (2000).