

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.

De aanwezigheid van de rhizoctoniaschimmel in de grond hoeft niet altijd tot (grote) schade te leiden. Resultaten van vorig jaar leren dat grondmonsters kunnen verschillen in hun gevoeligheid (bodemweerstand) voor rhizoctonia. Het is vooralsnog onbekend of dit verschijnsel stabiel is binnen een jaar en/of tussen jaren.

2. Werkwijze

2.1 Identificatie en pathogeniteit

Gronden verschillen in gevoeligheid (natuurlijke bodemweerstand) voor *Rhizoctonia solani* (jaarverslag 2000; figuur 7 en 8). Het is de vraag of deze verschillen in natuurlijke weerstand constant zijn in de tijd. Afhankelijk van dit gegeven kan een uitspraak gedaan worden over het bemonsteringstijdstip. Er zijn grondmonsters genomen in april, juni, augustus en november. Rhizoctonia-isolaten werden verzameld van bietenmonsters uit Nederland en verkregen via collega's in het buitenland. Van de door rhizoctonia aangetaste bietenmonsters werd in het laboratorium de schimmel op kweek gebracht en geïdentificeerd via de pectinezymogrammethode. Pectinezymogrammen zijn patronen van pectineafbrekende enzymen die in het laboratorium via gel-elektroforese 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 en wellicht met pathogeniteit.

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, de opkweek en de herkomst. Variatie in pectinezymogrampatronen wordt verder onderzocht door anastomose-toetsen onder de microscoop en DNA-technieken. De verschillende anastomosegroepen van *Rhizoctonia 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 (een 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-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 het ITS-gebied van ribosomaal DNA (rDNA) en DNA-fingerprinttechnieken, zoals RAPD, kunnen primers ontworpen worden die specifiek zijn voor bijvoorbeeld AG 2-IIIB. Uit een publicatie en van een Japanse collega zijn de sequenties voor specifieke primers voor AG 2-IIIB verkregen om te toetsen. Van 95 isolaten en enkele buitenlandse isolaten van suikerbieten is de genetische variatie onderzocht met rDNA-ITS, RAPDs, en is de specificiteit van drie primers getest.

2.3 Detectie in grondmonsters

Natuurlijke bodemweerstand tegen rhizoctonia

Proefvelden en een aantal praktijkpercelen werden in april, juni, augustus en november bemonsterd en getoetst op hun gevoeligheid voor rhizoctonia. De mate van bodemweerstand werd geschat door rhizoctonia in verschillende dichtheden aan grondmonsters toe te voegen. Rhizoctonia werd gekweekt in een zand/aarde-meelcultuur en in een 0, 0,5 en 1,0% gewichtsverhouding met de grondmonsters gemengd. Deze proeven zijn uitgevoerd in biotoetsen in de kas. Getoetst zijn

grondmonsters genomen in Aagtekerke, Erm, Hoeven, Lierop, Halsteren, Horn, Hummelo, Deurne en, later in het seizoen, in Mierlo, Aalden en Harfsen.

3. Resultaten

3.1 Identificatie en pathogeniteit

Dit jaar zijn er vanuit de praktijk weer bietenmonsters met rhizoctonia-aantasting aangeboden op het IRS. Ook zijn er monsters uit proefvelden en via buitenlandse collega's verkregen. Het merendeel van de isolaten betrof *R. solani* AG 2-2IIIB. *R. solani* AG 1-IC- en AG 5-isolaten werden alleen op zaailingen aangetroffen. Ook in Polen lijken problemen met rhizoctonia toe te nemen. Van een Poolse collega werd een aantal isolaten verkregen van zaailingen van suikerbieten, die geïdentificeerd werden als AG 1-IC, AG 4, AG 5 en AG 11. Drie isolaten konden niet bij de bestaande AG's worden ondergebracht.

In de collectie aanwezige AG 4-isolaten werden getoetst op hun pathogeniteit voor suikerbieten. AG 4-isolaten zijn wel pathogeen op zaailingen, maar geen van de getoetste AG 4-isolaten kon acht weken oude planten aantasten in een kastoets. Het gebruik van AG 4 als inoculum in het screenen van resistente rassen, zoals dat in Chili gebeurt, heeft dan ook geen zin.

3.2 Moleculaire identificatie

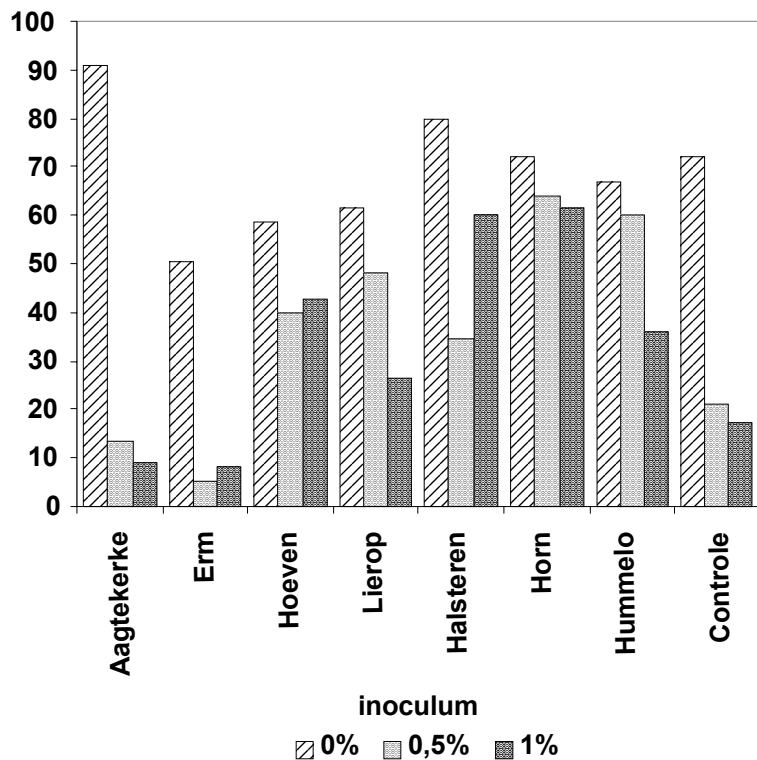
Recentelijk zijn specifieke primers voor de verschillende subgroepen van AG 2 beschreven in de literatuur. Dankzij de goede contacten met onderzoekers in Alaska en Japan kon het IRS al eerder over deze informatie beschikken en is in de loop van 2001 begonnen met het toetsen van deze primers op de collectie AG 2-isolaten die op het IRS aanwezig was. Het onderzoek is nog niet afgerond, maar de eerste resultaten zijn veelbelovend. Dat wil zeggen dat het merendeel van de AG 2-2IIIB-isolaten kunnen worden aangetoond met deze specifieke primer.

3.3 Detectie in grondmonsters

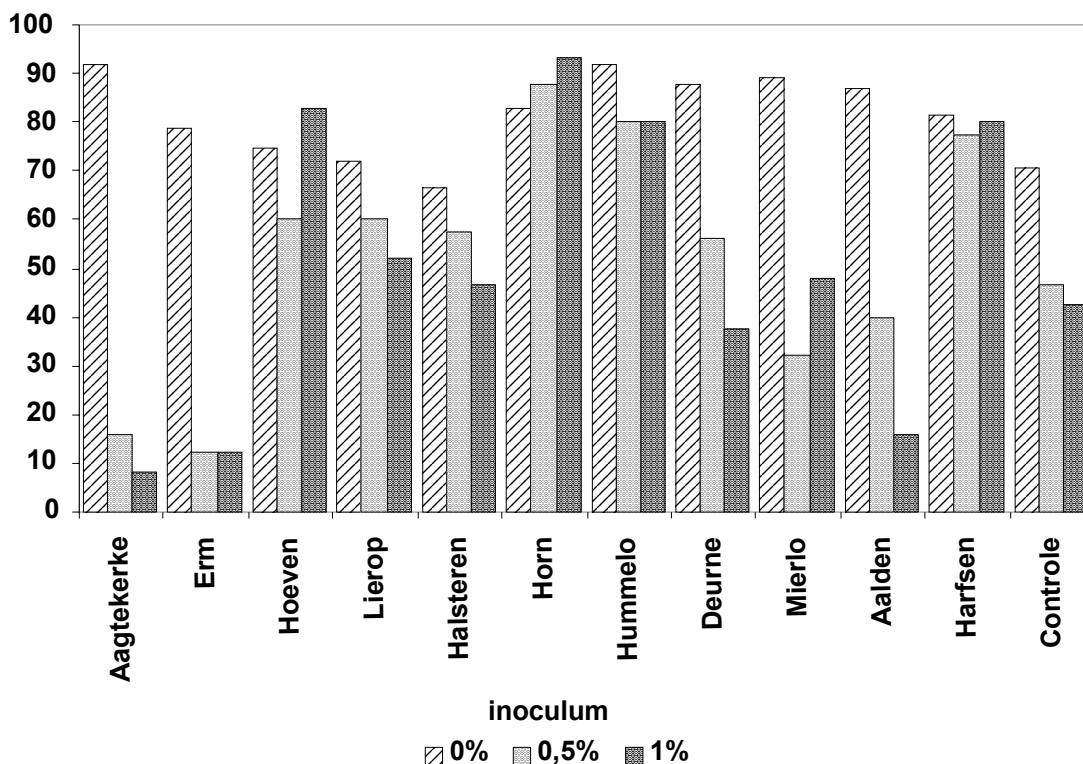
Natuurlijke bodemweerstand tegen rhizoctonia

De proef van juni is, door een te hoge watergift in de kas, mislukt (te veel plantuitval door aphanomyces). Figuur 1 illustreert dat gronden verschillen in natuurlijke weerstand tegen *R. solani*. In grondmonsters van de percelen in Aagtekerke en Erm vielen weinig tot geen zaailingen weg door rhizoctonia, van nature aanwezig in de grond. Deze gronden reageerden wel gevoelig voor de schimmel. Na toevoeging van rhizoctonia-inoculum vielen er veel planten weg, zowel in grondmonsters genomen in mei als in augustus. Deze proeven waren aangelegd op percelen waar in het verleden rhizoctoniaschade was geweest. Op de proefpercelen Hoeven, Lierop en Horn was er wel in het voorafgaande jaar een zware rhizoctoniaschade. Deze percelen reageerden in deze proeven minder gevoelig voor rhizoctonia in een kastoets. Op proefperceel Hummelo was er twee jaar geleden een zware rhizoctonia-aantasting. Deze kwam in twee achtereenvolgende jaren niet terug, noch op de proefvelden noch in de kastoets. In alle gevallen trad er in het veld geen noemenswaardige rhizoctonia-aantasting op. Van het praktijkperceel te Deurne was geen ernstige rhizoctonia-aantasting uit het verleden bekend. Grondmonsters van dit perceel lieten weinig tot geen natuurlijk aanwezige rhizoctonia zien. In augustus zijn grondmonsters genomen in praktijkpercelen met een zware rhizoctonia-aantasting. Grondmonsters van de percelen Mierlo en Aalden reageerden gevoelig, terwijl in het grondmonster van Harfsen een natuurlijke weerstand leek te zijn ontwikkeld. Opvallend was dat in alle drie de gevallen van een zware rhizoctonia-aantasting de schimmel in het grondmonster via een biotoets nauwelijks was aan te tonen. Met betrekking tot detectie en natuurlijke ziektevering in grondmonsters zijn dan ook nog geen eenduidige conclusies te trekken.

plantbestand (%)



plantbestand (%)



Figuur 1. Plantbestand suikerbietenzaailingen 4 weken na zaaien in grondmonsters waaraan 0, 0,5 of 1,0% van een rhizoctonia-inoculum is toegevoegd. Grondmonsters genomen in mei (boven) of augustus (onder).