

## Project No. 12-03

### BODEMGEBONDEN SCHIMMELZIEKTEN

#### 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*.

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. 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 rhizoctonia in de grond hoeft niet altijd tot (grote) schade te leiden. Resultaten van voorgaande jaren 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 (zie ook project 12-04).

#### 2. Werkwijze

##### 2.1 Identificatie

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 (AG's) en wellicht met pathogeniteit. Daar waar pectinezymogrammen geen eenduidig uitsluitsel geven, wordt de anastomosestechniek of moleculaire technieken gebruikt.

##### 2.2 Toetsing en optimaliseren primers

Er zijn voor *R. solani* AG 2-IIIB specifieke primers ontwikkeld (zie jaarverslag 2002). Bij nadere toetsing met de LightCycler bleek de OPN19<sub>1800</sub>-primer niet

altijd even efficiënt het DNA te vermeerderen. Dat wil zeggen dat je niet altijd rhizoctonia aantoot, terwijl je het wel mag verwachten. Dit heeft te maken met de uiteindelijke grootte van het te vermeerderen fragment. Daarom is op basis van dit fragment een tweede primerset aangemaakt en getoetst in een LightCycler-PCR en in een conventionele PCR als een geneste PCR: het PCR-product wordt nogmaals, maar met een tweede primerset vermeerderd. Hierdoor ontstaat tevens een verhoogde gevoeligheid. Alle primersets werden op een collectie van ongeveer 250 rhizoctonia-isolaten getoetst.

#### 3. Resultaten

##### 3.1 Identificatie

Dit jaar zijn er vanuit de praktijk weer bietenmonsters met rhizoctonia-aantasting aangeboden op het IRS. Het merendeel van de isolaten betrof *R. solani* AG 2-IIIB. *R. solani* AG 1-IC-, AG 2-1-, AG 3- en AG 5-isolaten werden meestal op zaailingen aangetroffen en in een enkel geval op oudere bietenplanten. Evenals in 2002 zijn uit de praktijk enkele monsters met zware aantasting in rhizoctoniaresistente rassen verkregen van percelen zonder duidelijk structuurbederf. Infectieproeven met een isolaat verkregen uit 2002 lieten zien dat er sprake was van een agressief isolaat (isolaat 02-337). Dit ziekteverwekkend vermogen hadden we nog niet eerder gevonden. Vanuit Chili zijn rhizoctonia-isolaten, afkomstig van suikerbieten, ontvangen ter identificatie. Er werden AG 2-IIIB- en AG 4-isolaten gevonden. Daarnaast is er een afwijkende groep van AG 2 (andere zymogrampatronen en primerreacties). Vanuit Australië hebben we AG 2-isolaten verkregen die afkomstig zijn van aardappelen. Nader onderzoek heeft uitgewezen dat deze isolaten niet tot een van de bekende subgroepen van AG 2 behoren. Van een voormalig proefveld nabij Halsteren heeft het IRS in 1998 en 1999 AG 2-isolaten van aardappelen geïsoleerd. Onderzocht wordt of deze isolaten qua pathogeniteit en andere karakteristieken vergelijkbaar zijn.

##### 3.2 Toetsing en optimaliseren primers

De op het IRS ontworpen specifieke primers voor AG 2-IIIB zijn uitgetest op de IRS-collectie (250 isolaten). De primers reageerden zoals verwacht alleen met AG 2-IIIB-isolaten en niet met andere rhizoctonia-isolaten. Met deze primers kan rhizoctonia-DNA in plant en grond aangetoond worden.

Bij het screenen van deze primers kwamen afwijkende AG 2-isolaten aan het licht. Afwijkend in de zin van pectinezymogrampatronen en primerreacties. Een deel van deze isolaten was afkomstig van suikerbieten uit Australië, Chili, Spanje en Nederland. In kasproeven wordt onderzocht of deze isolaten ook pathogeen zijn voor suikerbieten en aardappelen.