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. 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 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.

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 anastomosetechniek of worden moleculaire technieken gebruikt.

2.2 Moleculaire identificatie

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 pectinezymograampatronen wordt verder onderzocht door anastomosetoetsen 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 primers (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 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 2-2IIIB. Enkele specifieke primers voor AG 2-2IIIB zijn beschreven in de literatuur. Van 95 isolaten en enkele buitenlandse isolaten afkomstig van suikerbieten is de genetische variatie onderzocht met rDNA-ITS, RAPD's en worden de specifieke primers getest.

2.3 Detectie in plant en in grondmonsters

De onder 2.2 ontwikkelde specifieke primers worden getoetst op hun geschiktheid om rhizoctonia in plant- en grondmonsters aan te tonen. De mate van bodemweerstand werd geschat door rhizoctonia in verschillende dichtheden aan grondmonsters toe te voegen en de wegval van zaailingen te bepalen. Rhizoctonia-isolaat 225 werd gekweekt in een zand/aardemeelcultuur en in een 0 en 1,0% gewichtsverhouding met de grondmonsters gemengd. In zeven verschillende grondmonsters (rotatie bieten en lelies) en een standaardgrond werden bietenplantjes gezaaid en de wegval na twee en vier weken geteld.
De oorzaak van de wegval werd bepaald door bietenplantjes met symptomen gedurende twee dagen in een Petrischaaltje met water te incuberen en te beoordelen op uitgroei van rhizoctonia, aphanomyces of pythium. Na beoordeling werd van enkele plantjes DNA geëxtra-

heerd met behulp van een commerciële DNA-extractiekit voor planten. Uit de praktijkgrondmonsters werd eveneens DNA geëxtraheerd met een DNA-extractiekit voor grond.
Als controle op de geschiktheid van DNA-isolatie uit grond werd een cultuur gemaakt van rhizoctonia in grond. Een rhizoctonia-isolaat werd aan een met geautoclaveerde grond gevulde kolf toegevoegd en drie tot vier weken geïncubeerd. Zo werd een grondmonster met een hoge dichtheid met alleen rhizoctonia verkregen. Van dit grondmonster met een reincultuur van rhizoctonia werd een grondverdunningsreeks gemaakt. Uit deze grondverdunningsreeks werd DNA geëxtraheerd. DNA-monsters afkomstig van plant en grond werden gebruikt in PCR-reacties met de ontwikkelde specifieke primer. Een deel van dit onderzoek is in samenwerking met en op de McGill Universiteit in Montreal (Canada) uitgevoerd.

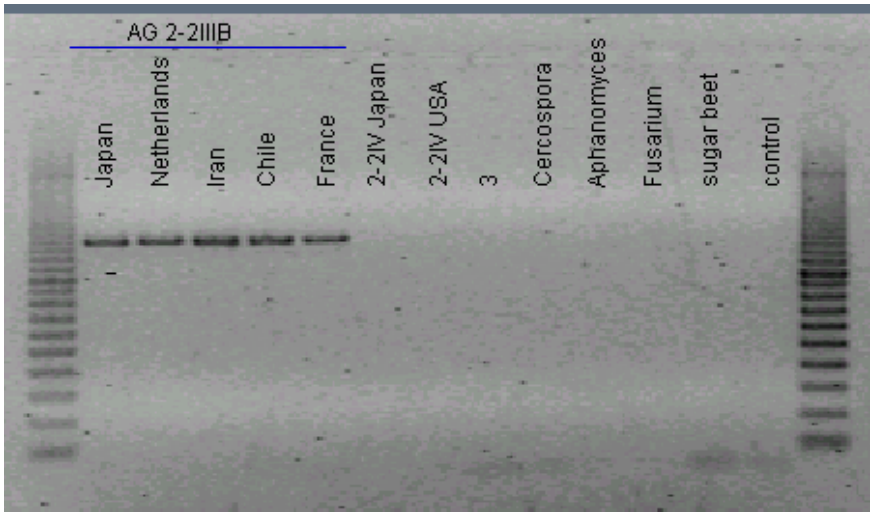
3. Resultaten

3.1 Identificatie

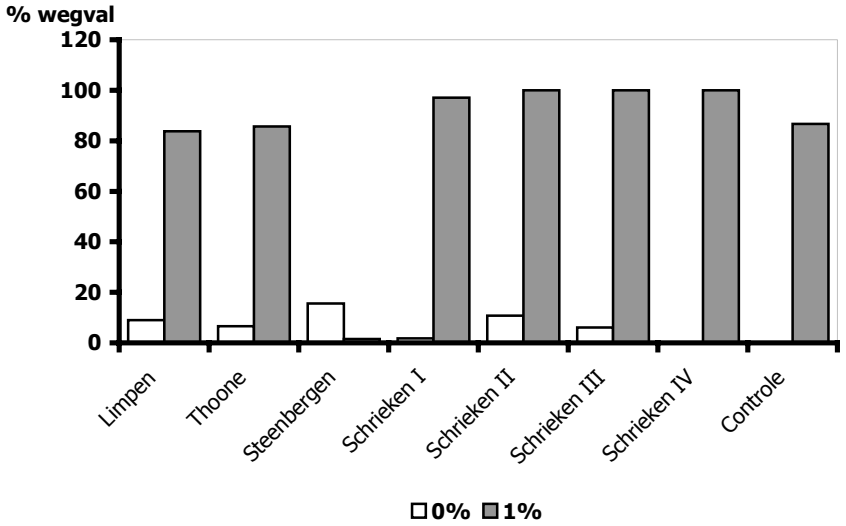
Dit jaar zijn er vanuit de praktijk weer bietenmonsters met rhizoctonia-aantasting aangeboden op het IRS. Het merendeel van de isolaten betrof *R. solani* AG 2-2IIIB. *R. solani* AG 1-IC-, AG 2-1- en AG 5- isolaten werden alleen op zaailingen aangetroffen. Tevens is er dit jaar een afwijkend pectinezymograampatroon gevonden. Verder onderzoek moet uitwijzen welke AG hierbij hoort en wat de mogelijke consequenties voor resistente rassen zijn. Uit de praktijk zijn enkele monsters met zware aantasting in rhizoctoniaresistente rassen verkregen van percelen zonder duidelijk structuurbederf. Infectieproeven moeten uitwijzen of we hier te maken hebben met een agressiever type rhizoctonia.
Ook zijn er monsters uit proefvelden en via buitenlandse collega's verkregen. In Polen lijken problemen met rhizoctonia toe te nemen. Van een Poolse collega werden ook dit jaar weer een aantal isolaten verkregen van bietenzaailingen, die geïdentificeerd werden als AG 1-IC, AG 4 en AG 5. Evenals vorig jaar konden een aantal isolaten niet bij de bestaande AG's worden ondergebracht. Binnen het kader van een samenwerkingsverband met het Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ) in Großbeeren (D) is een aantal rhizoctonia-isolaten geïdentificeerd dat in sla problemen veroorzaakt. De meerderheid betrof AG 1-1B-isolaten en enkele AG 2-1-isolaten. Tegen de verwachting in werden er geen AG 2-2-isolaten gevonden. Deze resultaten zijn inmiddels samengevat in een wetenschappelijke publicatie.

3.2 Moleculaire identificatie

Zoals vorig jaar vermeld, zijn eerst een aantal specifieke primers voor AG 2-2IIIB uitgetest op een collectie van isolaten zoals die op het IRS aanwezig is. Deze specifieke primers zijn gebaseerd op het ITS-gebied en ontwikkeld door collega's uit Alaska en Japan. Na het screenen van zo'n 250 isolaten bleek dat er enige kruisreacties waren. Dat wil zeggen dat deze specifieke primers reageerden met enkele van de isolaten waar geen reactie verwacht werd. Dit gegeven werd bevestigd door de verantwoordelijke onderzoekers voor een andere set van isolaten. Het aantonen van rhizoctonia in grond wordt daardoor bemoeilijkt. Daarom is gekozen om in samenwerking met de McGill Universiteit in Montreal specifieke primers te ontwikkelen op basis van specifieke RAPD-fragmenten (bandjespatronen). De aldus ontwikkelde specifieke primer reageerde alleen met AG 2-2IIIB-isolaten en niet met DNA van andere AG's of andere schimmels of suikerbieten.



Figuur 1. Een door het IRS en McGill Universiteit ontwikkelde specifieke primer voor AG 2-2IIIB reageert alleen met AG 2-2IIIB-isolaten, ongeacht hun geografische herkomst, niet met andere op suikerbiet voorkomende schimmels of DNA afkomstig van suikerbieten. De controle is een negatieve controle op de PCR-reactie. Aan de buitenzijde staan zogenaamde DNA-markers, waaruit de grootte van het fragment wordt afgeleid.



Figuur 2. Percentage wegval van suikerbietenzaailingen vier weken na zaaien in praktijkgrondmonsters waaraan 0 of 1,0% van een rhizoctonia-inoculum is toegevoegd.

3.3 Detectie in plant en in grondmonsters

Natuurlijke bodemweerstand tegen rhizoctonia

Van de praktijkgrondmonsters reageerde alleen het grondmonster met de code 'Steenbergen' als niet gevoelig voor rhizoctonia. Er was nauwelijks wegval na toevoeging van rhizoctonia (figuur 2) en dus een hoge bodemweerstand. In het grondmonster 'Steenbergen', waaraan geen rhizoctonia was toegevoegd, was geringe wegval door rhizoctonia en door pythium. Het gegeven dat praktijkgrondmonsters verschillen in hun gevoeligheid voor rhizoctonia, wordt hiermee nogmaals bevestigd. Onderzoek naar het mechanisme dat hier achter zit, kan nieuwe beheersingsmogelijkheden voor rhizoctoniawortelbrand opleveren. Dit onderzoek wordt in samenwerking met IfZ (D), Technische Universiteit München (D) en PPO-agv verder onderzocht binnen IRS-project 12-04.

Detectie in plantmonsters

Van de grondmonsters 'Steenbergen', 'Thoone' en de controlegrond, zoals weergegeven in figuur 2, werden zaailingen beoordeeld op het uitgroeien van rhizoctonia. Van diezelfde plantmonsters werd het DNA geïsoleerd. Deze monsters werden gekozen omdat ze verschillen in hun mate van gevoeligheid voor rhizoctonia. Rhizoctonia kon niet worden aangetoond in plantjes gegroeid in 'Steenbergen'-grond, wel in plantjes gegroeid in 'Thoone'- en de controlegrond. Een samenvatting van de resultaten staat weergegeven in tabel 1. Het bleek dat rhizoctonia niet altijd uitgroeide van plantjes met wortelbrandsymptomen, maar dat de aanwezigheid van rhizoctonia wel kon worden aangetoond met specifieke primers op het DNA. Er werden twee PCR-methoden gebruikt, namelijk een 'conventionele' PCR- machine (zoals op het IRS aanwezig) en een zogenaamd LightCycler PCR-apparaat (op McGill aanwezig). Met deze laatste (kostbare) machine kan DNA in zeer lage concentraties worden aangetoond (deze methode is dus gevoeliger dan conventionele PCR) en het DNA kan worden gekwantificeerd. Dit laatste is voor rhizoctonia (nog) niet van belang. De conclusie is dat de specifieke primer werkt voor het aantonen van rhizoctonia-DNA in plantmonsters, met zowel conventionele als LightCycler PCR-technologie.

Detectie in grondmonsters

Het bleek mogelijk om DNA van *R. solani* AG 2-2IIIB in een grondmonster aan te tonen (tabel 2), Rhizoctonia-DNA kon alleen worden aangetoond als de grondmonsters waren verdund met water. In grond kunnen elementen aanwezig zijn die de PCR-reactie remmen. Daarom is het nodig om die DNA-verdunning te zoeken waarbij de PCR-reactie niet geremd wordt, maar toch het gewenste DNA kan worden aangetoond. Uiteraard is dit afhankelijk van de concentratie van het doel-DNA. Er is een minimum hoeveelheid nodig om de reactie te laten verlopen. Deze hoeveelheid is dikwijls in grondmonsters onbekend. Te veel verdunnen kan dus inhouden dat het doel-DNA wel aanwezig is, maar niet kan worden aangetoond. Uit de grondverdunningsserie van de rhizoctoniacultuur bleek dat rhizoctonia niet meer kon worden aangetoond bij verdunningen van 1% en lager.
Rhizoctonia-DNA kon worden aangetoond in één van de controlegrondmonsters waaraan 1% van een rhizoctoniacultuur was toegevoegd. In de grondmonsters 'Thoone' en 'Steenbergen' kon geen rhizoctonia worden aangetoond door moleculaire detectie. De getoetste objecten staan weergegeven in figuur 2. De resultaten zijn niet weergegeven.
Hieruit kunnen we concluderen dat we bij een grond-

verdunning van 1% op een kritische grens zitten en het is dan ook niet verwonderlijk dat DNA van rhizoctonia niet bij deze verdunning in praktijkgrondmonsters gevonden wordt. Voor de DNA-extractie zijn we uitgegaan van een onbewerkt grondmonster. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of door ophoping van rhizoctonia, zoals met plantjes in water, of door scheiding van de zandfractie in het monster het rhizoctonia-DNA beter kan worden gedetecteerd.

4. Conclusies

Samenvattend kan worden geconcludeerd dat het IRS in samenwerking met de McGill Universiteit in Montreal (Canada) er in is geslaagd een specifieke primer te ontwikkelen voor *Rhizoctonia solani* AG 2-2IIIB, waarmee rhizoctonia in plant- en grondmonsters kan worden aangetoond. Dit biedt perspectieven voor de ontwikkeling van een 'kans-op-schadevoorspelling'.

Tabel 1. DNA-fragmenten gevonden in DNA geëxtraheerd uit bietenzaailingen gegroeid in grond, waaraan een rhizoctoniacultuur (0-1%) is toegevoegd. De proef is uitgevoerd in meerdere herhalingen. Herhalingen met een vergelijkbaar resultaat zijn niet weergegeven.

grond	herhaling	rhizoctonia		PCR	
		toegevoegd	uitgroei[1]	conventioneel	LightCycler
controle	1	0	-[2]	-	-
	2	1	+	+	+
Steenbergen	1	0	-	-	-
Thoone	1	1	-	-	+
	3	1	-	+	+

[1] Uitgroei van rhizoctonia geconstateerd na twee dagen incubatie in Petrischaaltjes met water.
[2] +: wel aanwezig; -: niet aanwezig.

Tabel 2. DNA-fragmenten gevonden na een PCR-reactie op DNA verkregen uit een verdunningsserie van een rhizoctoniagrondcultuur en na een verdunning van DNA van de grondverdunningsserie. Gebruikt zijn twee primers: ITS1F/4 om schimmel-DNA aan te tonen en $OPN19_{1800}$ om specifiek AG 2-2IIIB aan te tonen.

grond[2]	verdunning			
	ITS1F/4		$OPN19_{1800}$	
	DNA[1]			
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}
100	+	+	+	+
50	-	+	-	+
10	-	+	-	+
1	-	-	-	-

[1] DNA van de grondverdunningsserie verdund met water.
[2] De rhizoctoniagrondcultuur verdund met diezelfde geautoclaveerde grond als waarin rhizoctonia werd opgekweekt.