

## 1 EINLEITUNG

Die Rhizoctonia-Rübenfäule oder Späte Rübenfäule (engl.: root and crown rot) gehört zu den wirtschaftlich wichtigen Zuckerrübenkrankheiten, deren Bedeutung in den letzten Jahren in vielen Zuckerrüben-Anbaugebieten zunimmt. In Deutschland sind in verschiedenen Befallsgebieten bereits mehrere 10.000 ha Anbaufläche von der Rhizoctonia-Rübenfäule betroffen (HEUPEL, 1996, 1997; BÜTTNER, 2001; 2002; FÜHRER ITHURRART & BÜTTNER, 2000; 2002).

Schäden durch die Späte Rübenfäule werden meist erst im fortgeschrittenen Entwicklungsstadium der Zuckerrüben sichtbar (MEIER *et al.*, 1993). An oder unmittelbar unterhalb der Bodenoberfläche treten am Rübenkörper Faulstellen auf, zunächst als kleine runde grau-blaue eingesunkene Läsionen erkennbar, dann flächig ausgebreitet und in die Tiefe gehend. Ein Schnitt durch den Rübenkörper zeigt zu diesem Zeitpunkt noch eine scharfe Abgrenzung zwischen faulem und gesundem Gewebe. Nach und nach erfasst die Fäule den ganzen Rübenkörper und zerstört ihn. Ab Mitte Juli befinden sich in Befallsnestern oft alle Befallsstadien nebeneinander (PFÄHLER & BÜTTNER, 2001a; 2001b). Durch einen Rhizoctoniabefall werden Rübenantrag, Zuckergehalt und Verarbeitungsqualität der Zuckerrüben erheblich vermindert, bis hin zum Totalausfall der Kultur. Rhizoctoniabefallene Rüben können nicht gelagert werden und führen zu Verarbeitungserschwernissen in der Fabrik (WOLF & VERREET, 1999). Eine Bekämpfung der Rhizoctonia-Rübenfäule mit Fungiziden ist nicht möglich. Ein Erfolg versprechendes integriertes Bekämpfungskonzept umfasst den Anbau rhizoctoniaresistenter Sorten und pflanzenbauliche Maßnahmen (BUDDEMEYER & BÜTTNER, 2001).

Verursacht wird die Späte Rübenfäule durch den Pilz *Rhizoctonia solani* (KÜHN), der erstmals 1858 beschrieben wurde. Dieser Erreger gehört zur Klasse der Basidiomyceten (Teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (FRANK) DONK) und ist ein weltweit verbreiteter Schaderreger an landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturen. *Rhizoctonia solani* tritt ubiquitär an über 500 Generae höherer Pflanzen auf. Es werden z. B. Familien wie Compositae, Gramineae, Leguminosae, Cruciferae und Solanaceae befallen.

Der Pilz bildet im Boden ein Myzel aus vielkernigen septierten Hyphen, die sich saprophytisch oder parasitisch auf lebendem Pflanzengewebe entwickeln. Diese

anpassungsfähige Lebensweise und die Möglichkeit zur Bildung von widerstandsfähigen Dauerorganen, den Sklerotien, versetzen den Pilz in die Lage, auch ungünstige Umweltbedingungen wie Trockenheit, Brache oder Frost zu überdauern.

Die Einteilung der vielen Hundert Stämme oder physiologischen Rassen von *Rhizoctonia solani* erfolgt nach Kompatibilitätseigenschaften des Pilzmyzels in Anastomosegruppen (AG) (OGOSHI, 1987; 1996; SNEH *et al.*, 1991; SNEH *et al.*, 1996). Die Anastomosegruppen spiegeln auch bestimmte physiologische Leistungen des Pilzes oder die Pathogenität gegenüber einem Wirt oder Wirtspflanzenkreis wider. Für Zuckerrüben von Bedeutung sind die Anastomosegruppen AG 4 und AG 2-2. *Rhizoctonia solani*-Isolate der AG 4 befallen vorwiegend Jungpflanzen der Zuckerrübe, AG 2-2 ist der Erreger der Späten Rübenfäule und wird in verschiedene Untergruppen gegliedert (RUSH *et al.*, 1994; HERR, 1996; FÜHRER ITHURRART, 2001; ZENS, 2000). Die große Variation in Morphologie, Physiologie und Pathogenität sorgte viele Jahre für Verwirrung bei der Taxonomie und Nomenklatur von *Rhizoctonia solani*, und eine Zuordnung verschiedener Isolate ist auch heute aufgrund unterschiedlicher Untersuchungsmethoden nicht eindeutig. Daher wird *Rhizoctonia solani* bis heute als ein Spezies-Komplex angesehen (CUBETA & VILGALYS, 1997).

Bislang wurde für Deutschland keine umfassende Beschreibung des Auftretens der *Rhizoctonia*-Rübenfäule durchgeführt. Ebenso erfolgte noch keine vergleichende Charakterisierung von *Rhizoctonia*-Biotypen, die aus befallenen Rüben isoliert wurden. Aus eingesandten faulen Zuckerrüben sollte der Erreger der Späten Rübenfäule isoliert und eine Isolatebank angelegt werden, die als Grundlage für weitere Untersuchungen diene.

Methoden zum Nachweis von *Rhizoctonia solani* in Boden und Pflanze und zur Charakterisierung der vermutlich vielen Hundert verschiedenen Biotypen und Rassen des Erregers sind wichtige Werkzeuge der phytopathologischen Forschung. Das klassische Konzept der Einteilung von *Rhizoctonia*-Isolaten in Anastomosegruppen basiert auf der Fähigkeit der Hyphen, miteinander zu verschmelzen. Heute bieten sich physiologische und molekulargenetische Methoden an, um eine Differenzierung zwischen Isolaten auch unterhalb der Ebene der Anastomosegruppe zu untersuchen. Erste Analysen von *Rhizoctonia solani*-Isolaten aus befallenen Zuckerrüben wurden mittels RAPD von ZENS (2000) durchgeführt. In der vorliegenden Untersuchung

sollen für andere Wirt-Parasit-Beziehungen bereits beschriebene Methoden für den Nachweis und die Charakterisierung der *Rhizoctonia*-Rübenfäule angepasst bzw. weiter entwickelt werden.

Folgende Versuchsfragen sollten auf Basis dieser Untersuchungen beantwortet werden:

- Welche morphologischen, biochemischen, serologischen und molekular-genetischen Diagnosemethoden sind geeignet, um die Späte Rübenfäule und deren Epidemiologie zu beschreiben?
- Wie können *Rhizoctonia solani*-Isolate charakterisiert, in Anastomosegruppen und -untergruppen eingeteilt werden, und wie ist ihre Verbreitung in Deutschland?
- Unterscheidet sich die Aggressivität von *Rhizoctonia*-Isolaten unterschiedlicher Herkünfte?

ZENS (2000) berichtete, dass auf einzelnen Befallsflächen in nahezu allen Fällen eine sehr homogene *Rhizoctonia*-Population nachgewiesen wurde. Diese von ihr als Pathotyp bezeichnete einzige Herkunft blieb über mehrere Jahren unverändert. Dagegen wurden im Rahmen dieser Arbeit in einem Feld verschiedene Herkünfte ermittelt. Da zur Definition der Anastomosegruppe Inkompatibilitätsreaktionen genutzt werden, sollte zusätzlich eine weitere Versuchsfrage beantwortet werden:

- Können sich verschiedene *Rhizoctonia*-Isolate hemmen, und verändert sich daraufhin die Wirt-Pathogen-Beziehung?

Zur Diagnose, Charakterisierung und Verbreitung von *Rhizoctonia solani* wurden über den Koordinierungsausschuss am IfZ aus allen deutschen Regionen repräsentativ Proben von befallenen Zuckerrüben zentral untersucht. Zur Bestimmung der Aggressivität bzw. Hemmwirkung wurden umfangreiche und technisch aufwendige Gewächshausversuche durchgeführt.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Anlage einer Isolatebank

Am Institut für Zuckerrübenforschung wurde in den Vegetationsperioden 1998 bis 2001 bundesweit das Auftreten der *Rhizoctonia*-Rübenfäule in den deutschen Befallsgebieten kartiert, der Pilz isoliert und eine Isolatebank mit mehr als 200 Pilzherkünften angelegt (Anhang 1). Etwa 17 % der Sammlung besteht zudem aus ausländischen Isolaten, die zur Diagnostik eingesandt wurden.

#### 2.1.1 Probenahme und Isolierung

Die Charakterisierung zuckerrübenpathogener Formen von *Rhizoctonia solani* wurde an Zuckerrüben durchgeführt, die zur Diagnose aus den *Rhizoctonia*-Befallsgebieten in Deutschland zugesandt worden waren. Die Herkunft der Proben und Daten zu den Befallsstandorten wurde von den Einsendern in einem Fragebogen detailliert dokumentiert.

Zur Isolierung des Pilzes wurden im Labor aus dem Übergangsbereich zwischen gesundem und krankem Rübengewebe kleine Gewebestücke entnommen (Abb. 1) und diese nach einer Oberflächensterilisation mit 3 % NaOCl auf Ko und Hora-Selektivmedium (Ko & HORA, 1971) ausgelegt. Anhand der typischen Morphologie der Pilzhyphen konnte häufig bereits *Rhizoctonia solani* erkannt und andere Rübenfäuleerreger ausgeschlossen werden. *Rhizoctonia solani* wurde isoliert und auf PDA-Medium weiter kultiviert.

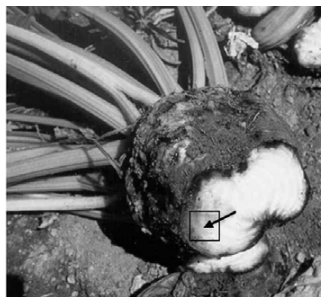


Abb. 1: Zur Isolierung von *Rhizoctonia solani* wurden aus dem Übergangsbereich zwischen gesundem und krankem Rübengewebe Proben entnommen und auf Selektivmedium ausgelegt.

### 2.1.2 Lagerung der Isolate

Die Isolate wurden auf Potato Dextrose Agar (PDA) in einem Brutschrank bei 20 °C im Dunkeln kultiviert und monatlich auf neues Nährmedium übersetzt. Dauerkulturen wurden auf SNA-Schrägagar angelegt und unter dickflüssigem Parafinöl (Merck) bei ca. 18 °C in einer Gefriertruhe aufbewahrt. Weiterhin wurden Dauerkulturen auch auf einem Gemisch aus Glycerin und Potato Dextrose Broth (PDB) angelegt und diese bei –70 °C gelagert. Dauerkulturen von *Rhizoctonia solani* sind mehrere Jahre haltbar.

### 2.2 Nährmedien für die Pilzkultivierung

Für die Kultivierung von *Rhizoctonia solani* wurden abhängig vom Verwendungszweck der Kulturen folgende Nährmedien verwendet:

#### Potato Dextrose Agar (Difco USA)

|             |                      |
|-------------|----------------------|
| PDA         | 39 g l <sup>-1</sup> |
| Aqua demin. | ad 1 l               |
| pH 5,6      |                      |

#### Potato Dextrose Broth (Difco USA)

|             |                      |
|-------------|----------------------|
| PDB         | 24 g l <sup>-1</sup> |
| Aqua demin. | ad 1 l               |
| pH 5,1      |                      |

#### Ko + Hora (KO & HORA, 1971)

|  |                        |
|--|------------------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>        | 100 ml l <sup>-1</sup> |
| MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O | 0,5 g                  |
| KCl                                    | 0,5 g                  |
| FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O | 0,01 g                 |
| NaNO <sub>2</sub>                      | 0,2 g                  |
| Agar                                   | 20 g l <sup>-1</sup>   |
| Aqua demin.                            | ad 1 l                 |

Anschließend: autoklavieren, auf 50 °C abkühlen, 120 mg Gerbsäure (in EtOH), 70 mg Neomycinsulfat (in Wasser) und 95 mg Dexon (in Ethanol) zugeben.