

Aus dem
Institut für Zuckerrübenforschung
Göttingen

Anneke Behn

***Rhizoctonia solani* in Zuckerrüben:
Testung und Umweltstabilität der Resistenz
gegenüber der Späten Rübenfäule
sowie Identifizierung von
Resistenz-Kandidatengen**

43/2015



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Rhizoctonia solani in Zuckerrüben:

Testung und Umweltstabilität der Resistenz gegenüber der Späten Rübenfäule
sowie Identifizierung von Resistenz-Kandidatengen





Aus dem Institut für Zuckerrübenforschung,
An-Institut der Georg-August-Universität Göttingen

***Rhizoctonia solani* in Zuckerrüben:
Testung und Umweltstabilität der Resistenz
gegenüber der Späten Rübenfäule
sowie Identifizierung von Resistenz-Kandidatengen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Agrarwissenschaften
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Anneke Behn
geboren in Uelzen

Göttingen, Dezember 2013



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2015
Zugl.: Göttingen., Diss., 2013

D7

1. Referent: Prof. Dr. Mark Varrelmann
2. Koreferent: Prof. Dr. H. Becker
3. Prüfer (mündliche Prüfung): Prof. Dr. B. Märländer

Mündliche Prüfung: 05. Februar 2014

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2015
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2015

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-95404-926-4
eISBN 978-3-7369-4926-3



„Das Äußere einer Pflanze ist nur die Hälfte ihrer Wirklichkeit.“

Johann Wolfgang von Goethe





Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	9
II. Abbildungsverzeichnis	12
III. Tabellenverzeichnis	14
1. Einleitung	15
1.1. Biologie des Schaderregers	15
1.1.1. Taxonomie	15
1.1.2. Lebenszyklus	17
1.1.3. Infektion und Besiedelung	18
1.1.4. Pathogenitätsfaktoren	19
1.1.5. Wirtsreaktion von anfälligen und resistenten Pflanzen	21
1.2. <i>Rhizoctonia solani</i> in Zuckerrüben	22
1.3. Bekämpfung der Späten Rübenfäule	24
1.3.1. Biologische Bekämpfungsmöglichkeiten	24
1.3.2. Chemische Bekämpfungsmöglichkeiten	27
1.3.3. Pflanzenbauliche Maßnahmen	28
1.4. <i>Rhizoctonia</i> -Resistenz in Zuckerrüben	30
1.4.1. Verschiedene Resistenztypen und deren Bedeutung	30
1.4.2. Züchtung und Untersuchung <i>R. solani</i> -resistenter Zuckerrüben	31
1.5. Fakten zum möglichen Klimawandel und dem Pathosystem Zuckerrübe- <i>R. solani</i>	32
1.5.1. Hintergrund der prognostizierten Klimaänderung	32
1.5.2. Zuckerrübenanbau im Klimawandel	34
1.6. Ziele der Arbeit	37
2. Manuskript 1	
Resistenzprüfung von Zuckerrübensorten gegenüber <i>Rhizoctonia solani</i>	55
3. Manuskript 2	
Effects of humidity, soil moisture and temperature on <i>Rhizoctonia</i> root and crown rot resistance in field-grown sugar beet	79
4. Manuskript 3	
Identification of genes related to <i>Rhizoctonia solani</i> resistance in sugar beet	106
5. Diskussion	137
5.1. Mögliche Auswirkungen des Klimawandels auf das Pathosystem Zuckerrübe- <i>R. solani</i>	137
5.2. <i>R. solani</i> -Resistenztest in Zuckerrüben: Optimierungsmöglichkeiten	140



5.3. Stand des Wissens der <i>R. solani</i> -Resistenzmechanismen in Kulturpflanzen und mögliche Rückschlüsse auf die Resistenz von Zuckerrüben gegenüber der Späten Rübenfäule	145
6. Zusammenfassung	167
7. Publikationen	170
8. Danksagung	172
9. Lebenslauf	174
10. Eidesstattliche Erklärung	176



I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acc. number	Accession number
AG	Anastomosegruppe
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
ATEAM	Advanced Terrestrial Ecosystem Analysis and Modelling
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	base pairs
BSA	Bundessortenamt
BZE	Bereinigter Zuckerertrag
cDNA	complementary DNA
cfu	colony forming unit
CLM	Climate Local Model
CMS	Cytoplasmatic Male Sterility
ca.	circa
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Dg	Durchgang
d.h.	das heißt
DI	disease index
DNA	Desoxyribonucleic acid
dpi	days post inoculation
EST	Expressed Sequence Tag
EU	Europäische Union
et al.	et alii
Fig.	Figure



h	hour
ha	Hektar
HR	Hypersensitive Reaktion
iE	infektiöse Einheiten
IPCC	Intergovernmental Panel of Climate Change
ISG	Intraspezifische Gruppe
kg	Kilogramm
KLIFF	Klimafolgenforschung
Kap.	Kapitel
l	Liter
lc	longitudinal cut
m	Meter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NCBI	National Center for Biotechnology Information
No.	number
ns	not significant
o.a.	oben angegeben
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
polyA ⁺ RNA	polyadenylierte RNA
ppmv	parts per million by volume
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
REMO	Regionalmodell



Rep.	Repetition
res	resistant
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonucleic acid
RRCR	Rhizoctonia root and crown rot
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
s	surface
s.o.	siehe oben
spp.	species (plural)
SSH	Suppression Subtractive Hybridisation
sus	susceptible
t	Tonne
T _{ann}	Annealing temperature
TDR	Time Domain Reflectometry
Ts	Testsorten
UN	United Nations
UNEP	United Nations Environment Programme
USA	United States of America
Vol.	Volume
WETTREG	Wetterlagenbasiertes Regionalmodell
WHC	Water Holding Capacity
WMO	World Meteorological Organization
WSY	White Sugar Yield
z. B.	zum Beispiel

Verweise und Erläuterungen zu den verwendeten Protein- und Gen-Bezeichnungen befinden sich in den jeweiligen Kapiteln.



II. Abbildungsverzeichnis

Abbildungen in der Einleitung

Abb. 1: Symptome der Späten Rübenfäule an Zuckerrüben. (A) Nekrosen an den Blattansätzen; (B) Rübe mit geringem Befall, nekrotisches Gewebe erscheint noch scharf abgegrenzt von gesundem; (C) verfaulte, deformierte Zuckerrüben; (D) welke Zuckerrübe; (E) stark welke sowie vertrocknete Blattrosette, (F) Befallsnest im Bestand mit abgestorbenen Pflanzen (Bilder A. Behn)..... 24

Abb. 2: Der klassische Zusammenhang zwischen Wirt, Pathogen, Umwelt (Klima) und Abwehrmechanismus (nach Newton et al., 2012). 36

Abbildungen in Manuskript 1

Abb. 1: Symptome von *Rhizoctonia solani*-Befall an Zuckerrüben im Feld: Fäulnis im Inneren des Rübenkörpers (A.) sowie an der Oberfläche, teils unter Rissbildung (B.); Welke des Blattapparates (C.) sowie in Nestern absterbende und schwindende Pflanzen im Bestand (D.)..... 59

Abb. 2: Befallsbonitur an Zuckerrübenkörpern von acht Sorten (drei Standard-, fünf Testsorten) im Gewächshaustest in vier Durchgängen (Dg) 2007 und 2008; Bonitur des abgestorbenen Gewebes der Rübenoberfläche (a) sowie des Rübenlängsschnitts (b); Anzahl Pflanzen je Wiederholung: $n_1=15$, $n_2=32$, $n_3=24$, $n_4=24$ 65

Abb. 3a-e: Befallsbonitur der Zuckerrübenoberfläche von acht Sorten (drei Standard-, fünf Testsorten) aus der Freilandprüfung an fünf Prüforten mit verschiedenen Inokulumstufen (20 kg, 40 kg bzw. 100 kg je ha) aus dem Jahr 2009; Mittelwerte der Bonituren von neun Versuchsansätzen;
Orte: (a) Etzweiler, (b) Tabertshausen 66
Orte: (c) Göttingen, (d) Ottmaring..... 67
Ort: (e) Regensburg 68

Abb. 4: Bereinigte Zuckererträge [BZE; $t\ ha^{-1}$] von acht Sorten (drei Standard-, fünf Testsorten (Ts)) aus den neun Versuchsansätzen des *Rhizoctonia*-Resistenztests 2009 im Feld. 69

Abb. 5: Befallsbonitur der Zuckerrübenoberfläche von vier Sorten (anfällige und resistente Standardsorte, zwei Testsorten (Ts), aus dem Sortiment der Sortenresistenzprüfung 2009) aus dem Versuch zur Optimierung des *Rhizoctonia*-Resistenztests im Feld, Standort Göttingen; Mittelwerte der Bonituren aus den vier Varianten konventionell, Vlies, Bewässerung, Vlies+ Bewässerung 70



Abbildungen in Manuskript 2

Fig. 1 Humidity [%] in the plant stand at the study site Göttingen in plots with or without plant cover and/or irrigation during the treatment period in 2010 and 2011. The dotted line represents the untreated plots and the solid lines the plots with plant cover (light gray), irrigation (dark gray) and plant cover and irrigation (black), respectively. The dashed line displays the beginning of the treatment period..... 89

Fig. 2 Soil moisture [Vol. %] during the treatment period at the study site Göttingen in plots with or without plant cover and/or irrigation in 2010 and 2011. The dotted line represents the untreated plots and the solid lines the plots with plant cover (light gray), irrigation (dark gray) and plant cover and irrigation (black), respectively. The dashed line displays the beginning of the treatment period..... 90

Fig. 3 Soil temperature [°C] during the treatment period at the study site Göttingen in plots with or without plant cover and/or irrigation in 2010 and 2011. The dotted line represents the untreated plots and the solid lines plots with plant cover (light gray), irrigation (dark gray) and plant cover and irrigation (black), respectively. The dashed line displays the beginning of the treatment period..... 91

Fig. 4a and 4b Effect of plant cover, irrigation and the combination of both on *R. solani* disease severity [% necrotic tissue of sugar beet surface] of a susceptible (black columns) and three resistant genotypes (light, medium and dark gray columns) at the study site Göttingen in 2010 and 2011, $n_{\text{year}}=64$. The vertical bars indicate the standard deviation. 92

Fig. 5a Impact of RRCR disease severity and treatment on white sugar yield (WSY) of the susceptible (black) and three resistant (gray) genotypes tested at the study site Göttingen in 2010 and 2011. The symbols indicate the different treatments (circle: untreated variant, square: plant cover, triangle: irrigation, diamond: cover + irrigation). 96

Fig. 5b Impact of RRCR disease severity and treatment on white sugar yield (WSY) of the susceptible (black) and three resistant (gray) genotypes tested at the study site Plattling in 2010 and 2011. The symbols indicate the different treatments (circle: untreated variant, square: plant cover, triangle: irrigation, diamond: cover + irrigation). 97

Abbildungen in Manuskript 3

Fig. 1 *Rhizoctonia solani* symptoms on roots of susceptible (sus) and resistant (res) breeding lines (lc: longitudinal cut, s: surface) at 21 dpi..... 115

Fig. 2 Disease rating of *Rhizoctonia solani* symptoms on the sugar beet root surface (s) and the longitudinal section (lc) of resistant (res) and susceptible (sus) breeding lines. The values displayed represent the mean disease ratings of ten plants. Results were statistically analysed by Welch's t-test. The estimated amounts of necrotic tissue on roots of susceptible and resistant genotypes were significantly different ($p < 0.05$) for both surface and longitudinal section. 115



III. Tabellenverzeichnis

Tabellen im Manuskript 1

Tabelle 1: Anzahl abgestorbener Pflanzen sowie Befallsbonitur von Parzellen und Einzelrüben von acht Zuckerrübensorten (drei Standard-, fünf Testsorten); Mittelwerte der Bonituren von neun Versuchsansätzen aus dem Jahr 2009; Bonitur nach *Büttner* et al. (2004; DI = Disease Index)..... 68

Tabellen in Manuskript 2

Table 1 Analysis of variance for the effects of environment, genotype, irrigation and coverage on the disease severity of *Rhizoctonia solani* of both locations. Significant effects are indicated by *, **, and *** as significant at the $P < 0.05$, 0.01 and 0.001 level; ns= not significant. 94

Table 2 Comparison of means of disease severity for significant main effects and interactions of both locations using Tukey-Kramer test. Means are grouped values and significant differences are signed by small letters ($P < 0.05$). 95

Tabellen in Manuskript 3

Table 1 Specific primers applied for semi-quantitative RT-PCR detection of sugar beet *Rhizoctonia solani* resistance candidate genes..... 112

Table 2 Results of BLAST sequence alignment of sequences which were differentially expressed in resistant sugar beet plants and identified with SSH. Listed are ESTs with homology to genes with putative function in resistance or stress reactions of plants according to their functional group. 118

Table 3 Expression analysis of candidate genes for *Rhizoctonia* resistance in sugar beet. Only candidates with their putative function are shown which exhibited a higher expression level in the resistant genotype. Displayed are the results of densitometric analysis: the factor represents the relationship between the band intensity of the resistant compared to the susceptible genotype. Explanations of the EST abbreviations are given in Table 1..... 123

Table 4 Expression analysis of candidate genes for *Rhizoctonia* resistance in sugar beet. Only candidates with their putative function are shown which exhibited a higher expression level in the inoculated sample. Displayed are the results of densitometric analysis: the factor represents the relationship between the band intensity of the inoculated compared to the non-inoculated sample. The explanation of the EST abbreviations are given in Table 1. 124



1. Einleitung

1.1. Biologie des Schaderregers

1.1.1. Taxonomie

Der *Rhizoctonia*-Komplex ist eine ökonomisch und ökologisch sehr bedeutende und heterogene Gruppe von bodenbürtigen Pilzen, die zum Stamm der Basidiomyceten gehört. Ihre Isolate treten weltweit in landwirtschaftlich genutzten und ungenutzten Böden fakultativ nekrotroph-lebend als Pathogene zahlreicher Wirtspflanzen, Saprophyten oder Mykorrhizapilze an Orchideengewächsen auf (Garrett, 1970; Sneh et al., 1996). Erstmals erwähnt wurde die Gattung *Rhizoctonia* 1815 von Lamarck und de Candolle (Lamarck und de Candolle, 1815). Seitdem wurden mehr als 100 Arten beschrieben, die zu der vielfältigen Gattung zählen (Ogoshi, 1987). Im Jahre 1858 berichtete Kühn erstmalig von *Rhizoctonia solani* (Kühn, 1858). Dessen Hauptfruchtform, die Gattung *Thanatephorus cucumeris*, wurde 1883 von Frank beschrieben (Frank, 1883). Sie zählt zur Klasse der Hymenomycetes (Moore, 1996). Donk berichtete mit *Hypochnus cucumeris* von dessen Basionym (Donk, 1956; Donk, 1958). Weitere Teleomorphe der *Rhizoctonia* spp. sind *Ceratobasidium* und *Waitea*. Zu *T. cucumeris* zählen vielkernige *Rhizoctonia* spp., deren Hyphen im Durchmesser 6-10 µm betragen. Anamorphe von *Ceratobasidium* werden als zweikernig beschrieben mit schmalen Hyphen als *T. cucumeris* (4-7 µm). Zu *Waitea* zählen u.a. die Arten *Rhizoctonia oryzae* und *Rhizoctonia zeae* (Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1996; Garcia et al., 2006).

Die Hyphen von *R. solani* sind zunächst hyalin, sie werden mit steigendem Alter jedoch dunkler und braun (Butler und Bracker, 1970). Der Basidiomycet besitzt ein dolipores Septum (Moore, 1996). Charakteristisch sind weiterhin die nahezu rechtwinkligen Verzweigungen des Myzels, die in der Nähe der distalen Septen der Hyphen zu finden sind, sowie die Einschnürungen, die die Hyphen in der Nähe der Gabelungen aufweisen (Butler und Bracker, 1970).

Identifizierung und Taxonomie der zahlreichen *Rhizoctonia* spp. weisen trotz der zahlreichen Arbeiten, die bisher über das Pathogen verfasst wurden, nach wie vor hohen Forschungsbedarf auf (Cubeta und Vilgalys, 1997). Die klassische Methode



zur Systematisierung der Isolate ist deren Zuordnung zu Anastomosegruppen (AGs), die nach Fähigkeit und Grad der Hyphenfusion vorgenommen wird. Die Einteilung des *Rhizoctonia*-Komplexes in Gruppen wurde von Schultz (1937) angeregt. Parmeter et al. (1969) führten in dem Zusammenhang die Anastomose ein. Nach MacNish et al. (1993) werden vier Klassen der Anastomose unterschieden: Bei verschiedenen AGs fehlt meistens die Hyphenfusion (Klasse C0) oder es kommt nur zu geringem Kontakt der Isolate (C1). Hyphen von Isolaten einer AG können sich miteinander verbinden (C2 und C3). Dabei wird die perfekte Fusion (C3), die eine Verschmelzung der Protoplasten beider beteiligter Isolate beinhaltet, von der unterschieden, bei der die Hyphen zwar ebenfalls fusionieren, bei der die beteiligten Zellen aber aufgrund von somatischer Inkompatibilität absterben (C2). Isolate, die wie in der Klasse C2 reagieren, gehören meistens zu derselben AG, sind aber genetisch verschieden. Die perfekte Fusion (C3) tritt bei sehr eng verwandten Isolaten auf, z. B. Klonen. Bisher sind 14 AGs beschrieben (Carling et al., 2002), denen teilweise zusätzlich intraspezifische Gruppen (ISGs) zugeordnet werden. AG2 z. B. ist unterteilt in AG2-1 und AG2-2. Die Einteilung basiert auf der Anastomosehäufigkeit zwischen verschiedenen Isolaten. AG2-2 ist weiterhin untergliedert in AG2-2 IIIB und AG2-2 IV. Die dazugehörigen Isolate werden beschrieben, sich in Pathogenität und Morphologie in Kultur zu unterscheiden (Ogoshi, 1987).

Einige Studien liegen mittlerweile vor, in denen die Genomsequenz unterschiedlicher AGs entschlüsselt worden ist. Unter Zuhilfenahme verschiedener Methoden haben z.B. Zheng et al. (2013) das Genom von AG1 IA und Wibberg et al. (2013) das von AG 1-IB entschlüsselt. Erste Genexpressionsstudien verschiedener AGs von *R. solani* sind mittlerweile weiterhin verfügbar (Lakshman et al., 2012). Deren Ergebnisse liefern wertvolle Erkenntnisse, die dabei helfen können, z.B. Pathogenitätsfaktoren oder die Phylogenie des Schaderregers zu verstehen. Um die Genetik der *Rhizoctonia* spp. zu entschlüsseln, eine Möglichkeit für die Systematisierung mithilfe von genetischen Unterschieden der Arten und eine Alternative zur Klassifizierung durch Anastomosegruppen zu finden, waren in der Vergangenheit verschiedene molekulargenetische Methoden eingesetzt worden. Diverse molekulare Marker sind dabei bisher zum Einsatz gekommen, z. B. Isozymanalyse (Laroche et al., 1992), genetischer Fingerabdruck (Gonzalez et al., 2012), DNA-DNA-Hybridisierung (Vilgalys, 1988), "restriction



fragment length polymorphism" (RFLP) (Vilgalys und Gonzalez, 1990), "randomly amplified polymorphic DNA" (RAPD) (Duncan et al., 1993) und Spacer-Sequenzierung der ribosomalen DNA (Gonzalez et al., 2001; Ahvenniemi et al., 2009). Unter den Methoden für die Bestimmung der *Rhizoctonia*-Arten hat sich keine als beste herausgestellt, da jede Vor- und Nachteile aufweist. In Einzelfällen wird die Nutzung einer Kombination empfohlen (Cubeta und Vilgalys, 1997).

1.1.2. Lebenszyklus

Die Symptome, die von *Rhizoctonia* spp. verursacht werden, hängen von der jeweiligen Wirtspflanze ab. Am bekanntesten sind Wurzelbrand an Sämlingen sowie Wurzel- und Stängelfäule an wachsenden bzw. ausgewachsenen Pflanzen (Sneh et al., 1996). Die unterschiedlichen Stadien des Lebenszyklus von *R. solani* variieren mit Wirt und AG. Im Folgenden sollen zunächst nur einige generelle Aspekte genannt werden.

R. solani bildet keine vegetativen Sporen (Keijer, 1996). Als Inokulum dienen dem Pilz Myzel und Sklerotien in befallenem organischen Material und Boden. Diese fungieren ebenfalls als widerstandsfähige Dauerorgane (Butler und Bracker, 1970; Sumner, 1996; Agrios, 2005). Sklerotien schützen *R. solani* vor ungünstigen Umweltbedingungen und ermöglichen ein Überleben des Pathogens über mehrere Jahre (Sherwood, 1970). Die sexuell gebildeten Basidiosporen sind als Organe zur Überdauerung zu brüchig. Bei manchen *Rhizoctonia* spp. in bestimmten Regionen sind sie aber für Krankheiten an den oberirdischen Teilen verschiedenster Pflanzen verantwortlich und tragen zu einer schnellen Verbreitung über größere Distanzen bei (Naito, 1996). Größere Bedeutung haben die vegetativen Organe des Pilzes. Verschleppung von Boden und Pflanzenresten, z. B. durch Wasser oder Maschinen, beschleunigt deren Verbreitung und den Transport zu neuen Wirten (MacNish et al., 1993; Agrios, 2005). Vom Inokulum aus wächst der Pilz auf die Pflanze zu (Keijer, 1996). Mobilität und Vitalität von *R. solani* im Boden werden von verschiedenen Umweltfaktoren bestimmt. Otten et al. (2001) nennen das Nahrungsangebot und die Bodenbeschaffenheit als Einflussfaktoren auf die Verbreitung: Zu geringe Porendichte verringert die Koloniausbildung von AG4. In feuchten Böden weist *Rhizoctonia* nach Baker (1970) ein kontinuierliches vegetatives Wachstum auf. Extreme Trockenheit hingegen führt zur Inaktivität des Pilzes und der Sklerotienbildung. Diese