Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., **58** (9), S. 235–240, 2006, ISSN 0027-7479.
© Eugen Ulmer KG, Stuttgart

Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ) Großbeeren/Erfurt e.V.
Institute of Sugar Beet Research (IRS), Bergen op Zoom, Niederlande*

Nachweis des Erregers der Salatfäule *Rhizoctonia solani*

Detection of *Rhizoctonia solani* the pathogen of bottom rot on lettuce

Rita Grosch, J. H. M. Schneider* und Andreas Kofoet

Zusammenfassung

Die Salatfäule, verursacht durch *Rhizoctonia solani*, ist in Deutschland ein zunehmendes Problem im Feldanbau. Zur genauen Charakterisierung des Erregers wurden während der Vegetationsperioden 1999 und 2000 insgesamt 95 *R. solani*-Isolate von Pflanzen mit Salatfäulesymptomen aus acht Salatanbaugebieten isoliert. Neben morphologischen Eigenschaften erfolgte die Bestimmung der Anastomosegruppe (AG) auf der Basis von Hyphenreaktionen mit bekannten Testerisolaten sowie der Pektinase-Isoenzymanalyse. Als AG 1-IB wurden 93 Isolate identifiziert und jeweils ein Isolat als AG 1-IC und AG 2-1. Mittels RAPD-PCR erfolgte die Differenzierung der Untergruppen der AG 1. Die Auswertung der RAPD-Profile ergab eine separate Clusterung der Isolate der verschiedenen Untergruppen. An Salatsämlingen verursachten die Isolate der AG 1-IB eine höhere Krankheitsschwere im Vergleich zu Isolaten der AG 1-IA und AG 1-IC. In Deutschland sind Isolate der AG 1-IB verantwortlich für die Salatfäule an Kopfsalat.

Stichwörter: *Rhizoctonia solani*, Anastomosengruppen, Nachweis, *Lactuca sativa*, Salatfäule, Monitoring

Abstract

Bottom rot caused by *Rhizoctonia solani* is an increasing problem in field-grown lettuce in Germany. During the growing seasons of 1999 and 2000 ninety-five *R. solani* isolates from lettuce plants with bottom rot symptoms were collected from eight locations. The isolates were characterised using hyphal anastomosis, pectic zymograms and morphological characteristics. Ninety-three isolates were identified as AG 1-IB, one as AG 1-IC and one as AG 2-1. *R. solani* isolates belonging to various sub groups of AG 1 were differentiated by RAPD-primer P14. Isolates of various subgroups separetedly clustered. Isolates of AG 1-IB caused a higher disease severity on lettuce seedlings in a bioassay compared to isolates of AG 1-IA and AG 1-IC. *R. solani* AG 1-IB isolates are responsible for bottom rot on lettuce in Germany.

Key words: *Rhizoctonia solani*, anastomosis group, detection, *Lactuca sativa*, bottom rot, monitoring

Einleitung

Der weltweit verbreitete bodenbürtige Erreger *Rhizoctonia solani* Kühn (Anamorph von *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) verursacht an zahlreichen Kulturen Krankheiten, die zu massiven Ertragsausfällen und Qualitätseinbußen führen können. Erstmals wurde der Erreger 1858 von Julius Kühn an der Kartoffel nachgewiesen. Neben parasitischen Eigenschaften besitzt *R. solani* auch die Fähigkeit zur saprophytischen Lebensweise und überdauert in Form von Sklerotien über mehrere Jahre im Boden. Der Wirtspflanzenkreis umfasst mehr als 500 Pflanzenarten. Als Spezieskomplex besteht *R. solani* aus zahlreichen genetischen Gruppen, den so genannten Anastomosengruppen (AGs), die sich in weitere Untergruppen unterteilten. Dies gilt insbesondere für die AG 1 und AG 2. Insgesamt 13 AGs sind derzeit in der Literatur beschrieben (Carling et al., 2002), die neben morphologischen Unterschieden einen gewissen Grad an Wirtsspezifität aufweisen. Somit sind einzelne AGs verantwortlich für Krankheiten an einer begrenzten Zahl an Wirtspflanzen (Tab. 1). In Mitteleuropa verursacht *R. solani* vor allem Krankheiten an der Kartoffel, Radies, Salat oder an der Zuckerrübe. So ist die AG 3 verantwortlich für die Wurzeltöterkrankheit an der Kartoffel, die AG 4 für Umfallkrankheiten sowohl an Radies als auch an der Zuckerrübe. Die AG 2-1 ist Ursache für eine Fäule an Radies und die AG 2-2IIIB wurde als Erreger der späten Rübenfäule nachgewiesen (Zens und Dehne, 1997). Nicht immer sind die für eine Krankheit verantwortlichen AGs bekannt. Wissenslücken zur Biologie und Epidemiologie der einzelnen AGs erschweren die Verbesserung von bestehenden bzw. die Entwicklung von effektiven Bekämpfungsstrategien.

An Salat (*Lactuca sativa* L.) verursacht *R. solani* eine Fäule, die erstmals von Stone und Smith (1900) in Massachusetts an Kopfsalat im Unterglasanbau beschrieben wurde. Erste typische Symptome sind kleine rostfarbene bis schokoladenbraune Läsionen auf den Blattmittelrippen der unteren in Kontakt mit dem Boden stehenden Blätter. Unter günstigen Bedingungen vergrößern sich diese Nekrosen sehr schnell und der Erreger breitet sich über das Myzel auf der Blattoberfläche in die oberen Blattetagen aus. Bei starkem Krankheitsauftreten erfolgt eine zunehmende Fäule des Salatkopfes. Die Krankheitsschwere wird jedoch erst zum Zeitpunkt der Ernte deutlich. In späteren Stadien bildet *R. solani* hellbraune bis schwarze Sklerotien auf dem absterbenden Pflanzengewebe. Neben Rhizoctonia können Mischinfektionen mit *Botrytis*, *Pythium*, *Sclerotinia* oder Bakterien auftreten, welche die Fäule befördern (Davis et al., 1997).

In Deutschland werden ca. 5700 ha Salat angebaut und häufig erfolgt dies in einer engen Fruchtfolge, wodurch allgemein bodenbürtige Erreger begünstigt werden. In den letzten Jahren sind zunehmend wirtschaftliche Ausfälle durch die Salatfäule zu beobachten (Kofoet et al., 2001). Laun et al. (2002) berichten über jährliche Verluste in Höhe von 250 000 € in der Pfalz. In Deutsch-

Tab. 1. Verbreitung beschriebener Anastomosengruppen (AG) und Untergruppen sowie bekannte Wirtspflanzen

AG	Wirtspflanzen	Verbreitung
AG 1-IA	Reis, Sojabohne, Mais, Sorghum, Zuckerrohr	weltweit
AG 1-IB	Reis, Salat, Unkräuter, Sojabohne, Kohl	
AG 1-IC	Sonnenblumen, Buchweizen, Salat, Zuckerrübe	
AG 1-ID	Kaffee	Philippinen
AG 2-1	Iris, Hyazinthen, Lilien, Salat, Kartoffel, Radies, Spinat, Raps, Erbse	weltweit
(AG 2-t)	Tulpen	
AG 2-2	Möhre¸ Spinat, Radies, Bohne, Erbse	
AG 2-2 IIIB	späte Zuckerrübenfäule, Gladiolen, Sojabohne	
AG 2-2 IV		
AG 2-2 LP		
AG 2-3	Sojabohne	
AG 2-BI	isoliert aus dem Boden, Hyphenreaktion (C1) mit AG-2, AG-3, AG-6, AG-8	nur in Japan
AG-3	Kartoffel (Wurzel- und Stengelfäule), Tabak, Tomate, Paprika, Aubergine Samenfäule bei Möhren, Flax und Radies	weltweit (tolerant gegenüber kühleren Temperaturen)
AG 4 HG-I	Tulpen, Zuckerrübe, Kartoffel, Kaffee, Bohnen	weltweit
AG 4 HG-II	Salat, Sojabohnen, Baumwolle, Tomate, Flachs, Erbse, Gurke, Melone¸ Kohl	keine Wirtsspezifität
AG 4 HG-III	Brokkoli, Spinat	
AG-5	Kartoffel (Stengelfäule), Tulpe, Zuckerrübe, Spinat	Europa, USA, Taiwan
AG 6 HG-I	apathogen	Japan, Israel, Afrika
AG 6 GV	isoliert aus unkultiviertem Boden	
AG-7	Kartoffel (schwach pathogen)	Japan, USA
AG-8	Getreide	Australien, USA (Westküste), UK
AG-9	Kartoffel, Gemüse (schwach pathogen)	Alaska und Oregon
AG-10	Weizen (Pathogenität wenig untersucht, Saprophyt)	USA (Westküste)
AG-11	Lupinen, Reis	Australien, USA
AG-12	Orchidee	Australien

land gibt es bisher wenig Informationen über die genauen genetischen Gruppen von *R. solani* an relevanten Kulturen. Dies gilt auch für den Erreger der Salatfäule. Daher war das Ziel der vorliegenden Untersuchungen, die Salatfäule verursachenden AGs und Untergruppen im kommerziellen Salatanbau zu charakterisieren. Dazu wurde ein Monitoring durchgeführt, in dem von verschiedenen Standorten Pflanzen mit typischen Symptomen der Salatfäule gesammelt wurden. Untersucht wurden das Vorkommen, die Häufigkeit und die genaue genetische Gruppe von *R. solani*.

Typisch für *R. solani* ist ein mehrkerniges Myzel mit rechtwinkligen Hyphenabzweigungen. Die Zuordnung zu einer AG basiert auf der Fähigkeit von Isolaten einer AG vegetative Anastomosen auszubilden. Diese Eigenschaft wird zur Einordnung in eine AG genutzt (CARLING et al., 2002). Charakterisierungen von *R. solani*-Isolaten basierend auf der Pektinase-Isoenzymanalyse (SCHNEIDER et al., 1997) oder molekularbiologischen Methoden (RFLPs, rDNA-ITS Sequenzanalysen, RAPD-PCR), unterstützen das Anastomosenkonzept (JABAJI-HARE et al., 1990; KUNINAGA et al., 1997; PASCUAL et al., 2000). Zwischen Isolaten verschiedener AGs von *R. solani* werden generell keine Anastomosen ausgebildet (CARLING et al., 2002).

Material und Methoden

Isolierung von R. solani

Während der Vegetationsperioden 1999 und 2000 wurden von acht verschiedenen Standorten in unterschiedlichen Anbaugebieten Isolierungen von *R. solani* von Kopfsalat mit typischen Symptomen der Salatfäule vorgenommen (Tab. 2). Infizierte Blattstücke wurden unter Leitungswasser gespült, mit Natriumhypochlorid (1 %) oberflächensterilisiert, anschließend mit sterilem NaCl (0,3 %) abgespült und auf Wasseragar (WA, 1,2 %), versetzt mit 50 µg/ml Streptomycin und 50 µg/ml Penicillin, ausgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 3 Tagen bei 25 °C erfolgte mikroskopisch die Identifizierung des für *R. solani* typischen Myzels, welches dann von WA auf Kartoffeldextroseagar (PDA, Merck 1.10130) abgeimpft wurde. Von jeder Salatpflanze wurde ein Isolat in die Stammsammlung aufgenommen, in der die Reinkulturen auf Getreidekörnern bei –20 °C konserviert wurden.

Anastomosereaktion

Die Charakterisierung der Anastomosengruppen erfolgte anhand der Hyphenreaktion mit bekannten Testerisolaten der AG 1 bis AG 5 (Tab. 3). Dazu wurden mit WA (2 %) beschichtete Objektträger mit Myzelscheiben eines Testerisolates und eines Feldisolates beimpft und für 2–3 d bei 25 °C inkubiert. Mikroskopisch (100×) erfolgte die Ermittlung eventueller Hyphenreaktionen zwischen den Isolaten. Zur besseren Beobachtung wurden die überlappenden Hyphenregionen mit Lactophenolblau (Merck, 1.13741.0100) angefärbt. Eine Anastomosereaktion wurde bei mehr als 5 Hyphenfusionen je Wiederholung als positiv einge-

Tab. 2. Charakterisierte *Rhizoctonia solani*-AG1-IB-Isolate von erkrankten Salatpflanzen verschiedener Standorte

Jahr der Isolation	Ort	Bodentyp	Anzahl der Isolate
1999	Großbeeren	sandiger Lehm	9 1 (AG 1-IC)
2000	Großbeeren	sandiger Lehm	4
1999	Straubing	lehmiger Sand	9
1999	Stockach	Löss Lehm	2
1999	Maikammer	lehmiger Sand	12 1 (AG 2-1)
1999	Ruchheim	lehmiger Sand	18
1999	Hannover	lehmiger Schluff	8
2000 (Sommer)	Golzow	lehmiger Ton	23
2000 (Herbst)	Golzow	lehmiger Ton	6
2000	Wien	–	2

Tab. 3. *Rhizoctonia solani*-Testerisolate

AG	Untergruppe	Isolatcode	Wirtspflanze	Herkunft
1	IC	BV – 7	Zuckerrübe	Ogoshi
1	IC	F – 1	Zuckerrübe	Ogoshi
1	IC	331	–	Sneh
1	IA	C – 325	Reis	Ogoshi
1	IA	PRG 97 – 1	Reis	Hyakumachi
1	IB	TR – 22	Gras	Hyakumachi
1	IB	CS74 – 22	Zuckerrübe	Ogoshi
1	IB	B – 19	Zuckerrübe	Ogoshi
2	2–1	PS – 4	Erbse	Ogoshi
2	2–2IV	K 1	Zuckerrübe	Sneh
2	2–2IV	Pf – 28	Zuckerrübe	Hyakumachi
3		B 15	–	Sneh
3		ST 11 – 6	Kartoffel	Ogoshi
4		HI 521 – 21	Boden	Hyakumachi
4	4 HG-II	RH – 165	Zuckerrübe	Ogoshi
5		5R1	Sojabohne	Ogoshi
5		SH – 4	–	Ogoshi

– Isolate wurden in Japan isoliert.

schätzt. Die Hyphenfusionen wurden in die Kategorien C0 (keine Reaktion) und C2 (vollständige Fusion der Hyphenzellen) gruppiert (CARLING et al., 2002). Die Hyphenfusionen zwischen Isolaten einer AG sind gewöhnlich inkompatible Reaktionen, daher ist bei einer C2-Reaktion eine Plasmolyse der fusionierten Hyphenzellen zu beobachten.

Morphologische Charakterisierung

Zur Charakterisierung der Untergruppen der AG 1 wurde neben den morphologischen Beschreibungen von SHERWOOD (1969) auch der Sklerotientyp auf WA einbezogen (YANG et al., 1989). Nur Isolate der Untergruppe AG 1-IB bilden auf WA Mikrosklerotien und sind so von Isolaten der Untergruppe AG 1-IA zu differenzieren. Isolate der Untergruppe AG 1-IC bilden uniforme, fast schwarze Sklerotien auf PDA, wodurch sie gut von Isolaten der AG 1-IB und AG 1-IA zu differenzieren sind. Myzelstücke von *R. solani*, abgeimpft von einer PDA-Kultur, werden auf WA (1,2 %) platziert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Wochen bei Raumtemperatur wird die Größe der Mikrosklerotien (< 700 µm) mikroskopisch ermittelt. Von jedem Isolat wurde die Größe von 6–12 Sklerotien gemessen.

Pektinase-Isoenzymanalyse

Parallel zum Hyphenfusionstest wurde eine Charakterisierung der AG und AG-Untergruppen der *R. solani*-Isolate mit Hilfe der Pektinase-Isoenzymanalyse vorgenommen. Zufällig ausgewählte Feldisolate (27) wurden 10 d auf Pectinmedium mit Zitruspectin (SIGMA P9135) als Kohlenstoffquelle bei 23 °C kultiviert. Je Isolat wurden 10 µl Kulturfiltrat zur Elektrophorese aufgetragen. Die Proteintrennung für die einzelnen Enzyme erfolgte in 3 verschiedenen Stärkegelpuffersystemen. Die Stärkegele werden zunächst für 70 Min. in Puffer inkubiert und anschließend für 1 h in 0,1 M DL-Apfelsäure. Die Gele wurden 2 h mit 0,02 % Ruthemium-Rot angefärbt, in 3 mM Na_2CO_3 fixiert und anschließend visualisiert (SCHNEIDER et al., 1997). Zum Vergleich wurden Testerisolate der AG 1 und AG 2 in die Analysen einbezogen.

RAPD-PCR

Mittels RAPD-PCR-Profilen soll geprüft werden, ob eine Differenzierung der Untergruppen der AG 1 möglich ist. Details zu den verwendeten Testerisolaten sind in Tabelle 3 aufgeführt. Zur Extraktion genomischer DNA von *R. solani* wurde 50 mg gefriergetrocknetes Myzel nach LEE und TAYLOR (1990) aufgearbeitet. Der RAPD-PCR-Ansatz mit einem Probenvolumen von 50 µl mit 35,5 µl Aqua dest, 5 µl 10× PCR-Puffer (10 mM), 4 µl dNTPs (2,5 mM each), 3 ml $MgCl_2$ (4,5 mM), 1,25 µl Primer (40 mM), 0,25 Taq-Polymerase (Applied Biosystem, Darmstadt, Germany) und 1 µl DNA (50 ng/µl) entsprach der Methode von PASCUAL et al. (2000). Verwendet wurden die Primer P14 (5'-CCACAGCACG-3') und RC09 (5'-GAT AAC GCA C-3') (Biometra, Göttingen). Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Thermocyclerbedingungen (GeneAmp®PCR-System 9700, PE Biosystem, Weiterstadt): Initial-Denaturierung für 2 Min. bei 94 °C, 40 Zyklen für 1 Min. bei 94 °C, 1 Min. bei 35 °C und 3 Min. bei 72 °C sowie einem finalen Extensionsschritt von 10 Min. bei 72 °C. Das RAPD-Produkt wurde mittels Elektrophorese (Agarosegel 1%, in TBE-Puffer, 150 V für 1,5 h) aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend visualisiert. In allen Experimenten wurde ein DNA-Marker verwendet (72 bp bis 23 kb, Biometra, Markermix 100-698). Die Ähnlichkeit der

Tab. 4. Hyphenreaktion von *Rhizoctonia solani*-Feldisolaten von Salat mit bekannten Testerisolaten der AG 1 bis AG 5 sowie Gruppierung basierend auf der Pektinase-Isoenzymanalyse (ZG)

Isolat-code	AG*	AG Testerisolate 1-IC	1-IA	1-IB	2-1	2-2IV	3	3	4	4	5	5
1/3/22	1-IB	C2	C2	–	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
2/3/31	1-IB	C2	C2	–	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
3/3/13	1-IB	C2	C2	–	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
4/3/21		C2	C2	–	C0	C0	C0	C0	C1	C0	C0	C0
7/3/14	1-IB	C2	C2	–	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
H 5	1-IB	C2	C2	–	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
H 10	1-IB	C2	C2	–	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
H 17	1-IB	C2	C2	–	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
H 20		C2	–	C2	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
H 26a	1-IB	C2	–	C2	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
PF 2/14	1-IB	C2	C2	C2	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
PF 2/15		C2	C2	–	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
PF 2/37	2–1	–	C0	C0	C2	C2	C0	C0	C0	C0	C0	C0
PF 3/14		C2	C2	–	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
PF 2/21		–	C2	C2	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
O 2/17	1-IB	C2	–	C2	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
O 4/10	1-IB	C2	–	C2	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
O 7/10	1-IB	C2	–	C2	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
O 8/5	1-IB	–	C2	C2	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
O2 8/14		C0	–	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0

– nicht geprüft
– *Charakterisierung der AG mittels Pektinase-Isoenzymanalyse

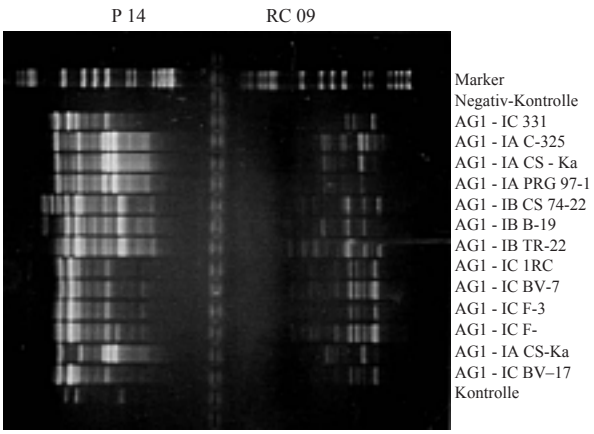

Abb. 1. RAPD-PCR-Fingerprints von *Rhizoctonia solani* AG 1-Isolaten der Untergruppen AG 1-IA, -IB und -IC, erstellt mit den Primern RC 09 und P14.

erzeugten Bandenmuster wurde mit Hilfe der „unweighted pair group method analysis“ (UPGMA) mit arithmetischen Mitteln analysiert mittels Phoretix 1D Advanced Software (Biostep GmbH, Jahnsdorf).

Myzelwachstumsrate

Das radiale Hyphenwachstum wurde in Abhängigkeit von der Temperatur (10, 15, 20, 25, 30 und 35 °C) auf PDA von 49 Feldisolaten und Testerisolaten der AG 1-IB ermittelt. Von aktiv wachsenden *R. solani*-Kulturen wurden Myzelscheiben (Ø 5 mm) abgeimpft und auf PDA-Platten übertragen. Der Myzeldurchmesser wurde in Intervallen von 24 h gemessen. Je Isolat wurden 2 Wiederholungen angelegt. Von allen Isolaten wurde die durchschnittliche Wachstumsrate in Abhängigkeit von der Temperatur berechnet.

Ergebnisse

Charakterisierung der Anastomosengruppen

Von allen beprobten Pflanzen (95) und Standorten konnte *R. solani* isoliert werden (Tab. 2). Insgesamt 94 Isolate zeigten C2-Reaktionen mit den Testerisolaten der AG 1-IA, AG 1-IB oder

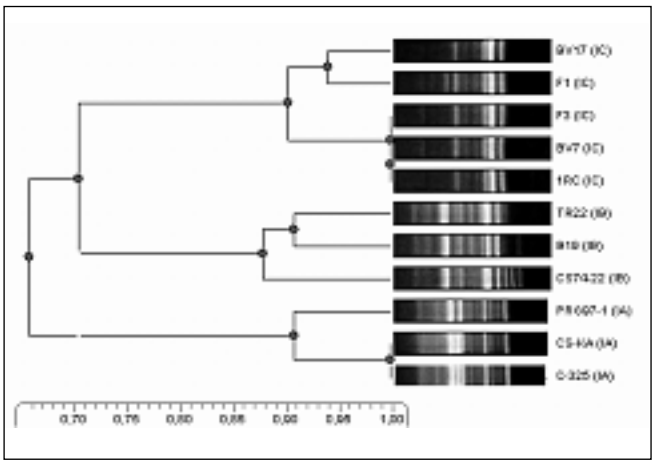

Abb. 2. Genetische Beziehung von *Rhizoctonia solani* AG 1-Isolaten der Untergruppen AG 1-IA, -IB und -IC. Das Dendrogramm wurde erstellt von RAPD-PCR-Fingerprints (Primer P14) basierend auf einer UPGMA-Analyse.

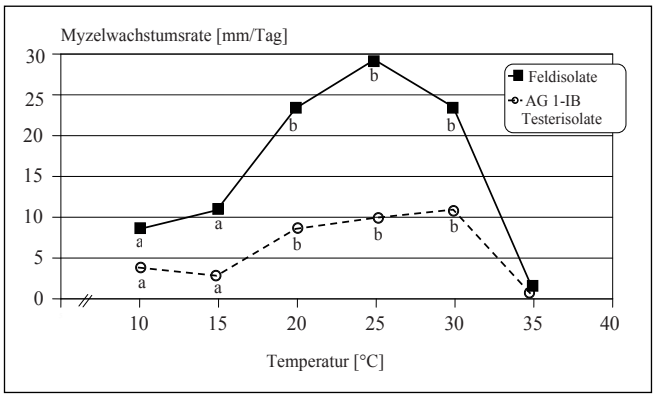

Abb. 3. Myzelwachstumsrate von *R. solani*-Feldisolaten von Kopfsalat sowie AG 1-IB Testerisolate in Abhängigkeit von der Temperatur.

AG 1-IC und sind damit in die AG 1 zu gruppieren (Tab. 4). Lediglich das Isolat PF 2/37 bildete C2-Anastomosisreaktionen mit den Testerisolaten der AG 2. Mit den übrigen Testerisolaten waren nur C0-Anastomosisreaktionen zu beobachten.

Die Gruppierung der Isolate in die entsprechenden Untergruppen der AG 1 erfolgte auf der Basis der Sklerotienmorphologie. Mit Ausnahme eines AG 1-Isolates bildeten 93 AG 1-Isolate auf WA Mikrosklerotien aus, so dass diese Isolate in die Untergruppe AG 1-IB gruppiert werden konnten. Im Durchschnitt aller untersuchten Isolate wurde eine Größe der Mikrosklerotien von 384 µm (363–443 µm) ermittelt.

Pektinase-Isoenzymanalyse

Von den 27 zufällig ausgewählten Feldisolaten für die Isoenzymanalyse wurden 26 Isolate der Untergruppe AG 1-IB zugeordnet (Tab. 4). Im Pektinase-Enzymmuster waren nur geringe Unterschiede zwischen den 26 Isolaten festzustellen. Das Enzymmuster des Isolates PF2/37 war vergleichbar zum Muster des Testerisolates der AG 2-1 und wurde daher in diese Untergruppe eingruppiert.

RAPD-PCR

Multiple PCR-Produkte wurden in allen RAPD-PCR-Profilen mit beiden Primern (P14 und RC09) generiert (Abb. 1), deren Anzahl in Abhängigkeit vom Primer und Isolat variierte. Mittels des Primers P14 wurden 14 Banden amplifiziert und 10 durch den Primer RC09 im Bereich von 0,56 bis 3,0 kb. Informative Banden, die für jede Untergruppe ein charakteristisches Muster ergaben, wurden wiederholt amplifiziert. Eine Differenzierung der Untergruppen der AG 1 war mittels beider RAPD-Primer möglich. Die Clusteranalyse, basierend auf dem Bandenmuster und der Größe der amplifizierten PCR-Produkte, ergab eine hohe genetische Ähnlichkeit zwischen den Isolaten einer Untergruppe. Das Dendrogramm zeigt, dass die Isolate einer Untergruppe der AG 1 entsprechend zusammen clustern (Abb. 2). Die Isolate der AG 1-IA weisen eine Ähnlichkeit von 92 %, der AG 1-IB von 88 % und der AG 1-IC von 90 % auf bei Amplifikation der PCR-Produkte mit dem Primer P14.

Myzelwachstumsrate

Sowohl die Feld- als auch die *R. solani*-AG-1-IB-Testerisolate zeigten ein optimales Myzelwachstum in einem Temperaturbereich von 20–30 °C (Abb. 3). Signifikante Unterschiede in der Wachstumsrate wurden bei den Feldisolaten zwischen 10–15 °C und 20–30 °C festgestellt.

Diskussion

Die Charakterisierung des Salatfäuleerregers erfolgte auf der Basis von Hyphen- bzw. Anastomosisreaktionen mit Testerisolaten, morphologischen Eigenschaften der Isolate sowie der Pektinase-Isoenzymanalyse. Die Ergebnisse der Charakterisierung der *R. solani*-Isolate von Salat mit Salatfäulesymptomen verschiedener Standorte zeigen, dass die AG 1-IB als die verursachende Anastomosegruppe der Salatfäule anzusehen ist. In bisherigen Studien wurden die AG 1, AG 2 und AG 4 als Ursache für die Salatfäule im Unterglasanbau in den Niederlanden und in Großbritannien genannt (KOOISTRA, 1983; WAREING et al., 1986). HERR (1992) isolierte außerdem die AG 5 von Kopfsalat, angebaut im Freiland in den USA. Am häufigsten wurde jedoch in diesen Untersuchungen die AG 1-IB von Salat isoliert, die in der vorliegenden Studie ebenfalls zu 98 % nachgewiesen wurde. In Bezug auf die Häufigkeit und die ermittelte AG bestätigen unsere Ergebnisse die von HERR (1992). Aufgrund der hohen Verluste, die jährlich durch *R. solani* im Gemüsebau in Brasilien verursacht werden, wurden hier in den letzten Jahren Arbeiten zur Charakterisierung der auftretenden AGs von *R. solani* durchgeführt (KURAMAE et al., 2003). Hierbei interessierte auch der Erreger der Salatfäule. Im Ergebnis dieser Studien wurde ebenfalls die AG 1-IB als ursächliche AG diagnostiziert. DAVIS et al. (1997) gehen davon aus, dass *R. solani* in allen Salatanbaugebieten zu finden ist.

Die Myzelwachstumsrate der AG 1-IB-Isolate aus dem Feld weist ein Temperaturoptimum von 20–30 °C auf. Eine hohe Variation in der Wachstumsrate bei den jeweiligen Temperaturen war jedoch bei den einzelnen Isolaten zu beobachten. Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen sowie Beobachtungen im Feld zeigen, dass die Krankheitsentwicklung an Salat durch höhere Temperaturbedingungen gefördert wird (GROSCH und KOFOET, 2003) und die Salatfäule vor allem ein Problem in warmen Regionen ist (DAVIS et al., 1997).

Die Eingruppierung in die AG erfolgte auf der Basis der mikroskopisch beobachteten vegetativen Anastomosen zwischen einem Testerisolat mit bekannter AG und dem zu charakterisierenden Feldisolat. Diese Methode ist sehr zeitaufwändig und erlaubt keine Eingruppierung in eine Untergruppe der AG 1. Dazu wurden neben morphologischen Eigenschaften wie des Sklerotientyps auf Wasseragar auch die Pektinase-Isoenzymanalyse genutzt. Im Ergebnis beider Methoden erfolgte eine Eingruppierung der Isolate in die AG 1-IB. Während die Pektinase-Isoenzymanalyse viel Erfahrung benötigt, sind bei der Ermittlung des Sklerotientyps Fehleinschätzungen nicht ausgeschlossen. Daher wurde geprüft, ob mittels molekulargenetischer Methoden, wie der RAPD-PCR, eine Differenzierung der Untergruppen der AG 1 möglich ist. Die Ergebnisse zeigen, dass die verwendeten Primer eine Eingruppierung in die Untergruppen erlauben, und unterstützen damit die phylogenetischen Analysen in Bezug auf die Untergruppen der AG 1 von PRIYATOMOJO et al. (2001). Von letztgenannter Arbeitsgruppe wurde auch eine neue Untergruppe, die AG 1-ID als Erreger einer Blattkrankheit am Kaffee, beschrieben. Phylogenetische Untersuchungen der AG 1 von *R. solani* auf der Basis von Sequenzanalysen der rDNA-ITS-Region bestätigen die phylogenetische Differenzierung mittels RAPD-PCR (TODA et al., 2004). Im Vergleich zur rDNA-ITS-Sequenzanalyse liefert die RAPD-PCR unter Einbeziehung von Isolaten bekannter AGs und Untergruppe Ergebnisse in kürzerer Zeit. Für eine schnelle und sichere Diagnose ist die Entwicklung spezifischer Primer für eine Untergruppe beispielsweise der AG 1 von Vorteil. Spezifische PCR-Primer können auf der Basis von anonymen DNA-Sequenzen, die z. B. aus RAPD-PCR-Profilen hervorgehen, entwickelt werden (TAYLOR et al., 2003). Bei ausreichender Sequenzheterogenität können sie auch aus der ITS-Region abgeleitet werden (SALAZAR et al., 2000).

Durch die Identifizierung von *R. solani* AG 1-IB als Ursache der Salatfäule in zahlreichen deutschen Anbaugebieten kann die Bekämpfungsstrategie zielgerichtet auf dieses Pathogen ausgerichtet werden. Die temperaturabhängige Eingrenzung von Zeiträumen mit hohem Befallsrisiko ist bedingt möglich. Faktoren wie die Virulenz der Isolate, die Pathogendichte im Boden und die Verteilung des Inokulums im Feld sind entscheidend für die Infektion und die Krankheitsentwicklung.

Die Entwicklung von spezifischen Nachweismethoden, die eine schnelle und sichere Diagnose eines Erregers in Pflanzen- und Bodenproben erlauben, ist das Ziel weiterer Arbeiten, wodurch sowohl die Entwicklung als auch die Anwendung von effektiven Bekämpfungsstrategien unterstützt werden könnte.

Literatur

CARLING, D. E., S. KUNINAGA, K. A. BRAINARD, 2002: Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. Phytopathology **92,** 43–50.

DAVIS, R. M., K. V. SUBBARAO, R. N. RAID, E. A. KURTZ, 1997: Compendium of lettuce diseases. APS Press, 15–16.

GONZALES, D., D. E. CARLING, S. KUNINAGA, R. VILGALYS, M. A. CUBETA, 2001: Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. Mycologia **93**, 1138–1150.

HERR, L. J., 1992: Characteristics of *Rhizoctonia* isolates associated with bottom rot of lettuce in organic soils in Ohio. Phytopathology **82**, 1046–1050.

JABAJI-HARE, S. H., Y. MELLER, S. GILL, P. M. CHAREST, 1990: Investigation of genetic relatedness among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* using cloned DNA probes. Can. J. Plant Pathol. **12**, 393–404.

KOFOET, A., A. FRICKE, H. HEINE, M. HOMMES, E. RICHTER, A. ULBRICH, U. WEIER, 2001: Kopfsalatsorten und ihre Anfälligkeit gegenüber bodenbürtigen Pathogenen. Gemüse **37** (10), 10–13.

KOOISTRA, T., 1983: *Rhizoctonia solani* as a component in the bottom rot complex of glasshouse lettuce. Verslagen en Mededelingen No. 160, 444pp. Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen.

KUNINAGA, S., G. GODOY-LUTZ, R. YOKOSAWA, 2002: rDNA-ITS nucleotide sequences analysis of *Thanatephorus cucumeris* AG-1 associated with web blight on common beans in Central America and Caribbean. Japan J Phytopathol **68,** 187.

KURAMAE, E. E., A. L. BUZETO, M. B. CIAMPI, N. L. SOUZA, 2003: Identification of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB in letture, AG 4HG-I in tomato and melon, and AG 4HG-III in brocolli and spinaci, in Brazil. Eur. J. Plant Pathos. **109**, 391–395.

LAUN, N., 2002: Zur Wirkung von FZB24 WG gegen Rhizoctonia an Salat. Gemüse **38**, 14–15.

LEE, S. B., J. W. TAYLOR, 1990: Isolation of DNA from fungal mycelial and single spores. In: PCR protocols: a guide to methods and applications, ed. INNIS, M. A., D. H. GELFAND, J. J. SNINSKY and T. J. WHITE, pp. 283–287. New York: Academic Press Inc.

PASCUAL, C. B., T. TODA, A. D. RAYMONDO, M. HYAKUMACHI, 2000: Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. Plant Pathology **49**, 108–118.

PRIYATMOJO, A., V. E. ESCOPALAO, N. G. TANGONAN, C. B. PASCUAL, K. KAGEYAMA, M. HYAKUMACHI, 2001: Characterization of a new subgroup ID of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 (AG 1-ID), causal agent of a necrotic leaf spot on coffee. Phytopathology **91**, 1054–1061.

SALAZAR, O., M. C. JULIAN, V. RUBIO, 2000: Primers based on specific rDNA-ITS sequences for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG 2 subgroups and ecological types, and binucleate Rhizoctonia. Mycol. Res. **104**, 281–285.

SCHNEIDER, J. H. M., M. T. SCHILDER, G. DIJST, 1997: Characterization of *Rhizoctonia solani* AG-2 isolates causing bare patch in field-grown tulips in the Netherlands. Eur. J. Pl. Pathol. **103**, 265–279.

SHERWOOD, R. T., 1969: Morphology and physiology in four anastomosis groups of *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology **59,** 1924–1929.

STONE, G. E., R. E. SMITH, 1900: The rotting of greenhouse lettuce. Mass. Agric. Exp. Stn. Bull. 69.

TAYLOR, G., X. WANG, S. H. JABAJI-HARE, 2003: Detection of the mycoparasite *Stachobotrys elegans* using SCAR primers in conventional and real-time PCR. Can. J. Plant Pathol. **25**, 49–61.
TODA, T., J. M. MGHALU, A. PRIYATOMOJO, M. HYAKUMACHI, 2004: Comparison of sequences for the internal transcribed spacer region in *Rhizoctonia solani* AG 1-ID and other subgroups of AG 1. J. Gen. Plant Pathol. **70**, 270–272.
YANG, X. B., J. P. SNOW, G. T. BERGGREN 1989: Morphogenesis of microsclerotia and sasakii-type sclerotia in *Rhizoctonia solani*, anastomosis group 1, intraspecific groups IA and IB. Mycol. Res. **93**, 429–434.
WAREING, P. W., Z. N. WANG, J. R. COLEY-SMITH, 1986: Fungal pathogens in rotted basal leaves of lettuce in Humberside and Lancashire with particular reference to *Rhizoctonia solani*. Plant Pathol. **35**, 390–395.
ZENS, I., H.-W. DEHNE, 1997: *Rhizoctonia solani* – Die späte Rübenfäule und Differenzierung des Pathogens. Mitt. Deut. Phytomed. Ges. **27,** 32.

Zur Veröffentlichung angenommen: 3. April 2006

Kontaktanschrift: Dr. Rita Grosch, Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ) Großbeeren/Erfurt e.V., Theodor-Echtermeyer-Weg 1, 14979 Großbeeren, Germany, E-Mail: grosch@igzev.de