

STEPHANIE KLUTH, CORD BUHRE, CHRISTIAN KLUTH, MARK VARRELMANN
Institute of Sugar Beet Research
Holtenser Landstr. 77
D - 37079 GOETTINGEN

TISSUE PRINT IMMUNOASSAY (TPIA) CAN BE USED TO DESCRIBE RESISTANCE OF SUGAR BEET AGAINST *RHIZOCTONIA SOLANI*

Abstract

Root and crown rot (*Rhizoctonia solani*) is of increasing economical importance in sugar beet cultivation. With no effective fungicidal control available in Europe, control strategies have to rely mainly on cultural methods. The breeding of resistant varieties has been a major achievement that sustains sugar beet production in areas infested with the pathogen. However, the mechanisms of sugar beet resistance against *R. solani* are still largely unknown.

To describe the resistance reaction of different sugar beet lines against *R. solani*, tissue print immunoassay (TPIA) was adapted for detection of *R. solani* and proved sensitive. Different sugar beet breeding lines were tested in the greenhouse against a set of *R. solani* isolates. The same lines had been subject to resistance screenings in field trials at USDA-ARS, Fort Collins, USA, where they expressed differences in resistance level. Eight week old plants were infested with liquid inoculum of three different isolates and harvested after four weeks. The severity of disease symptoms on the root surface and in longitudinal cuttings was estimated. TPIA of the longitudinal cuttings was performed to detect differences in *R. solani* distribution among the different genotypes. Specific PCR analyses of segments from necrotic and healthy-looking tissue were performed to compare with TPIA results. The spread of fungal mycelium within tissues was shown using epifluorescence microscopy. The differences in the resistance reaction of the sugar beet lines tested and the interactions between sugar beet genotype and isolate were analysed. TPIA reflected the disease severity, but in some cases TPIA signal was positive in the centre of the tap root although no fungal mycelium or DNA could be shown in microscope sections and specific PCR-analyses.

DESCRIPTION A L'AIDE DE 'TISSUE PRINT IMMUNOASSAY' (TPIA) DES REACTIONS DE RESISTANCE DE BETTERAVES A SUCRE CONTRE *RHIZOCTONIA SOLANI*

Abrégé

Le rhizoctone brun (*Rhizoctonia solani*) prend de plus en plus d'importance dans la culture de la betterave à sucre. Comme en Europe on ne dispose pas de d'agent fongicide pour lutter contre cette maladie, des mesures de façon culturale prennent un rôle important. La sélection – couronnée de succès – de variétés partiellement résistantes peut maintenir la production de betteraves sucrières à un niveau rentable

même dans des régions d'infestation. Mais les mécanismes sur lesquels cette résistance est fondée, ne sont pas encore connus actuellement. Pour mieux caractériser les réactions par lesquelles les différentes lignes de betteraves à sucre résistent à *R. solani*, on a adapté la technique de 'tissue print immunoassay' (TPIA) qui prouvait sensitif. Différentes lignes de sélection betteravière ont été testées en essai sous serre contre un certain nombre d'isolats de *R. solani*. Ces mêmes lignes avaient déjà été soumises à des séries de dépistage de la résistance en essai au champ par le USDA-ARS, Fort Collins, Etats-Unis, et avait présenté des niveaux de résistance variables. Des plantes de huit semaines étaient infestées par un inoculum liquide d'un de trois isolats et récoltées quatre semaines après. Aussi bien en surface des racines qu'en coupe longitudinale, l'intensité des symptômes de maladie a été classifiée. Sur les sections longitudinales a été appliqué le TPIA. Ainsi on voulait dépister les différences de distribution du champignon dans le tissu betteravier des différentes lignes de sélection. Des analyses PCR spécifiques de prélèvements de tissu soit nécrosé soit d'apparence saine complétaient les résultats TPIA. La propagation du champignon par son mycélium dans le tissu betteravier a été tracée par microscope épifluorescent. On a ainsi examiné les différences entre les réactions de résistance pour ces lignes de betteraves sucrières et analysé l'interaction entre leur génotype et l'isolat. Le TPIA reflétait l'intensité de l'infestation telle qu'elle avait été classée. Pour les cas où un signal venait du milieu de la racine betteravière, des examens histologiques et analyses PCR n'ont pu déceler aucun mycélium voire DNA de champignon.

BESCHREIBUNG DER RESISTENZREAKTION VON ZUCKERRÜBEN GEGENÜBER *RHIZOCTONIA SOLANI* MIT HILFE EINES „TISSUE PRINT IMMUNOASSAY“ (TPIA)

Kurzfassung

Die Späte Rübenfäule (*Rhizoctonia solani*) ist im Zuckerrübenanbau zunehmend von Bedeutung. Da in Europa zur Bekämpfung der Krankheit kein fungizider Wirkstoff zur Verfügung steht, kommt pflanzenbaulichen Maßnahmen eine besondere Rolle zu. Die erfolgreiche Züchtung teilresistenter Sorten kann eine Zuckerrübenproduktion auch in Befallsgebieten rentabel aufrechterhalten. Die Mechanismen, die der Resistenz zugrunde liegen, sind bisher jedoch nicht bekannt.

Zur besseren Charakterisierung der Resistenzreaktion unterschiedlicher Zuckerrübenlinien gegenüber *R. solani* wurde das Verfahren des „Tissue Print immunoassay“ (TPIA) für einen Nachweis von *R. solani* adaptiert, das sich als sensitiv erwies. Verschiedene Zuckerrübenzüchtlinien wurden im Gewächshausversuch gegen eine Reihe von *R. solani*-Isolaten getestet. Dieselben Linien waren in Resistenzscreenings des USDA-ARS, Fort Collins, USA, bereits im Feldversuch getestet worden, wo sie unterschiedliche Resistenzniveau aufwiesen. Acht Wochen alte Pflanzen wurden mit Flüssiginokulum je eines von drei Isolaten infiziert und nach weiteren vier Wochen beerntet. Die Stärke der Krankheitssymptome wurde auf der Wurzeloberfläche sowie im Längsschnitt bonitiert. An den Längsschnitten wurde der TPIA durchgeführt. Hierdurch sollten Unterschiede in der Verteilung des Pilzes im Rübengewebe bei den unterschiedlichen Linien aufgedeckt werden. Spezifische PCR-Analysen von Segmenten nekrotisierter sowie gesund erscheinender

Gewebepartien ergänzten die TPIA-Ergebnisse. Die Ausbreitung des Pilzmycels im Rüben- und Zuckerrüben- und Zuckerrübenlinie wurde im Epifluoreszenzmikroskop verfolgt. Unterschiede in der Resistenzreaktion der Zuckerrübenlinien wurden untersucht. Interaktionen zwischen Zuckerrüben- und Zuckerrübenlinie und Isolat analysiert. Der TPIA spiegelt die bonitierte Befallsstärke wieder. In einigen Fällen, in denen im mittleren Bereich des Rübenkörpers ein Signal auftrat, ließ sich dennoch sowohl in den histologischen wie in den molekularbiologischen Untersuchungen weder Mycel noch Pilz-DNA nachweisen.
