

# Einsatz eines reversen genetischen Systems bei Rizomania zum besseren Verständnis der *Rz1* Resistenzüberwindung

Sebastian Liebe<sup>1</sup>, Edgar Maiss<sup>2</sup>, Mark Varrelmann<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute für Zuckerrübenforschung, Abteilung Phytomedizin, Holtenser Landstr. 77, D-37077 Göttingen

<sup>2</sup>Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Herrenhäuser Str.2, 30419 Hannover

## Einleitung:

Das *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) ist der Verursacher der Rizomania-Krankheit an Zuckerrübe. Infizierte Pflanzen zeigen eine vermehrte Seitenwurzelbildung, einen verkleinerten Rübenkörper sowie Vergilbungen am Blattapparat. Die Virusübertragung erfolgt durch den bodenbürtigen Protisten *Polymyxa betae*. BNYVV wird im Anbau hauptsächlich durch ein dominantes Resistenzgen (*Rz1*) kontrolliert. Die langjährige Nutzung von *Rz1* führte zu einem hohen Selektionsdruck, infolge dessen sich BNYVV Populationen mit Resistenz überwindenden Eigenschaften entwickelt haben. Diese Populationen weisen eine Mutation im RNA3 kodierten Pathogenitätsfaktor P25 (Aminosäureposition 67-70) auf. Ebenso konnte man eine zusätzliche RNA-Komponente (RNA5) identifizieren, die unabhängig von der Mutation im P25, eine Resistenzüberwindung vermitteln soll. Für den tatsächlichen Nachweis einer resistenzüberwindenden Mutation/RNA-Komponente müssen diese jedoch unabhängig vom Vektor und der Viruspopulation geprüft werden. Dies ist nur mit reversen genetischen Systemen, sogenannten infektiösen cDNA Klonen, möglich.

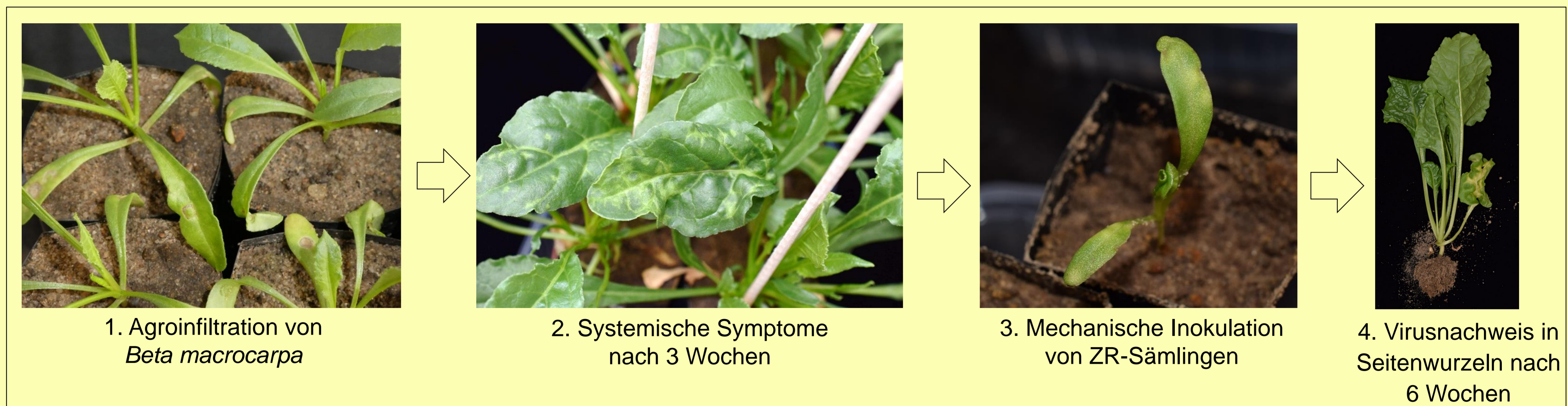


Abb. 1: Darstellung des Inokulationsverfahrens für die Infektion von Zuckerrüben mit einem infektiösen cDNA Klon des BNYVV.

## Material und Methoden:

Für die Entwicklung des reversen genetischen Systems wurde ein infektiöser cDNA Klon des BNYVV aus einem nicht resistenzüberwindenden Virusisolat (A-Typ) hergestellt. Mittels PCR wurde an der Aminosäureposition 67-70 (AS67-70) des P25 die Tetrade ALHG zu VLHG, VCHG und AYPR mutiert, um einen resistenzüberwindenden Klon zu erzeugen. Darüber hinaus wurde die RNA5 (P-Typ) aus einer resistenzüberwindenden Viruspopulation kloniert. Für die Infektion von Zuckerrüben wurde ein zweistufiges Inokulationsverfahren entwickelt (Abb.1). Zunächst wurden Sämlinge von *Beta macrocarpa* (1. Laubblattpaar) mittels Agroinfiltration mit den BNYVV Klonen infiziert. Nach systemischer Ausbreitung wurde Blattmaterial mit Symptomen geerntet und für die mechanische Inokulation von 7 Tage alten ZR-Sämlingen eingesetzt. Dazu wurden 6 ZR-Sämlinge in einem 15ml Falconröhrchen mit 5ml Presssaft (1g Blattmaterial + 4ml Phosphat-Puffer 0,05M + 50mg Karborund) auf einem Vortex-Mixer geschüttelt (höchste Stufe, 60 Sekunden). Danach wurden die Sämlinge 5 Minuten inkubiert und anschließend in sterile Erde pikiert. Der Virusnachweis erfolgte nach 6 Wochen in den Seitenwurzeln mittels ELISA. Für die Resistenztestung wurde ein anfälliger und *Rz1* resistenter Genotyp verwendet.

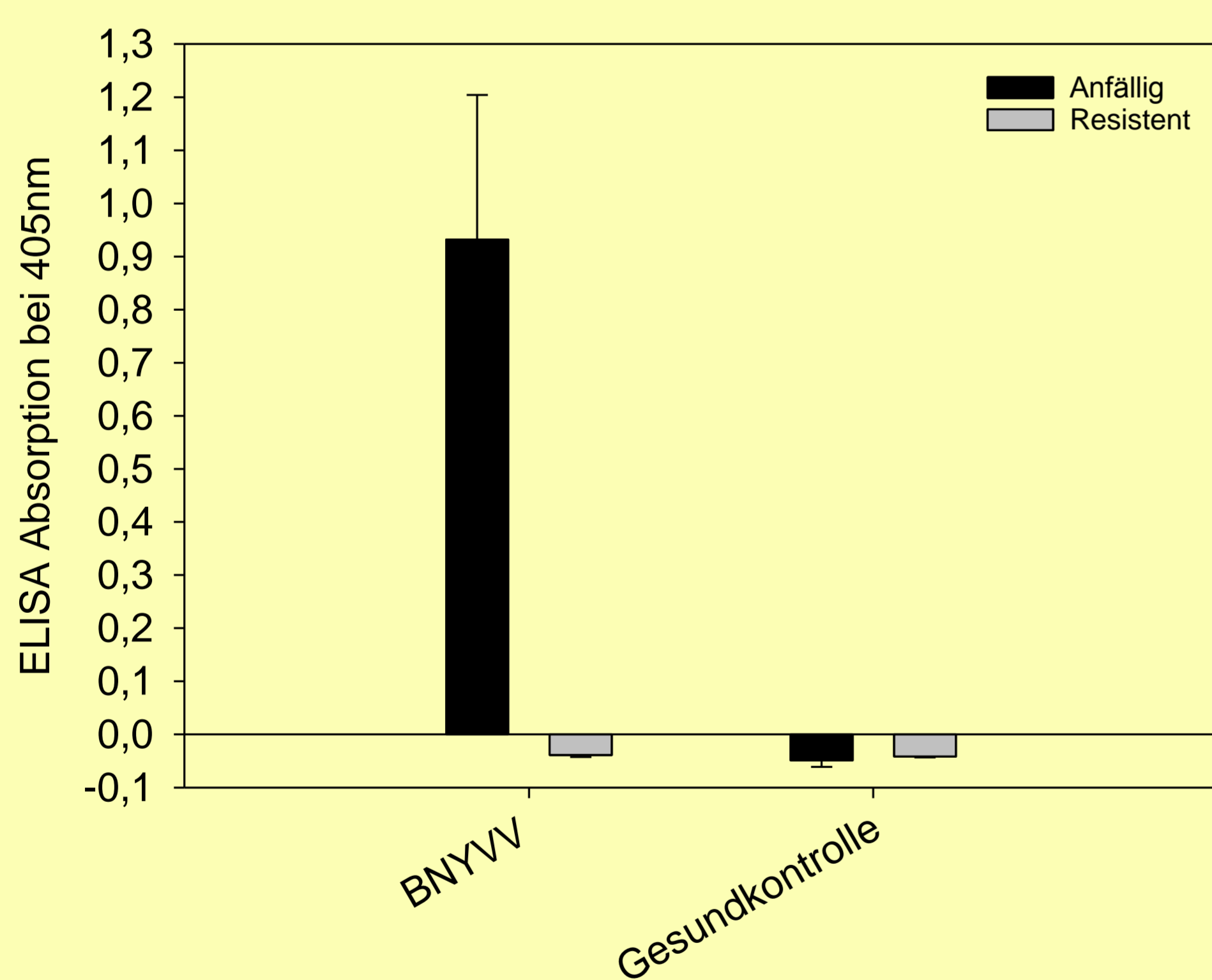


Abb.2: Mittelwerte der ELISA Absorptionswerte (405nm) gemessen in Seitenwurzeln von einem anfälligen und resistenten ZR-Genotyp nach Infektion mit BNYVV (48dpi, n=12).

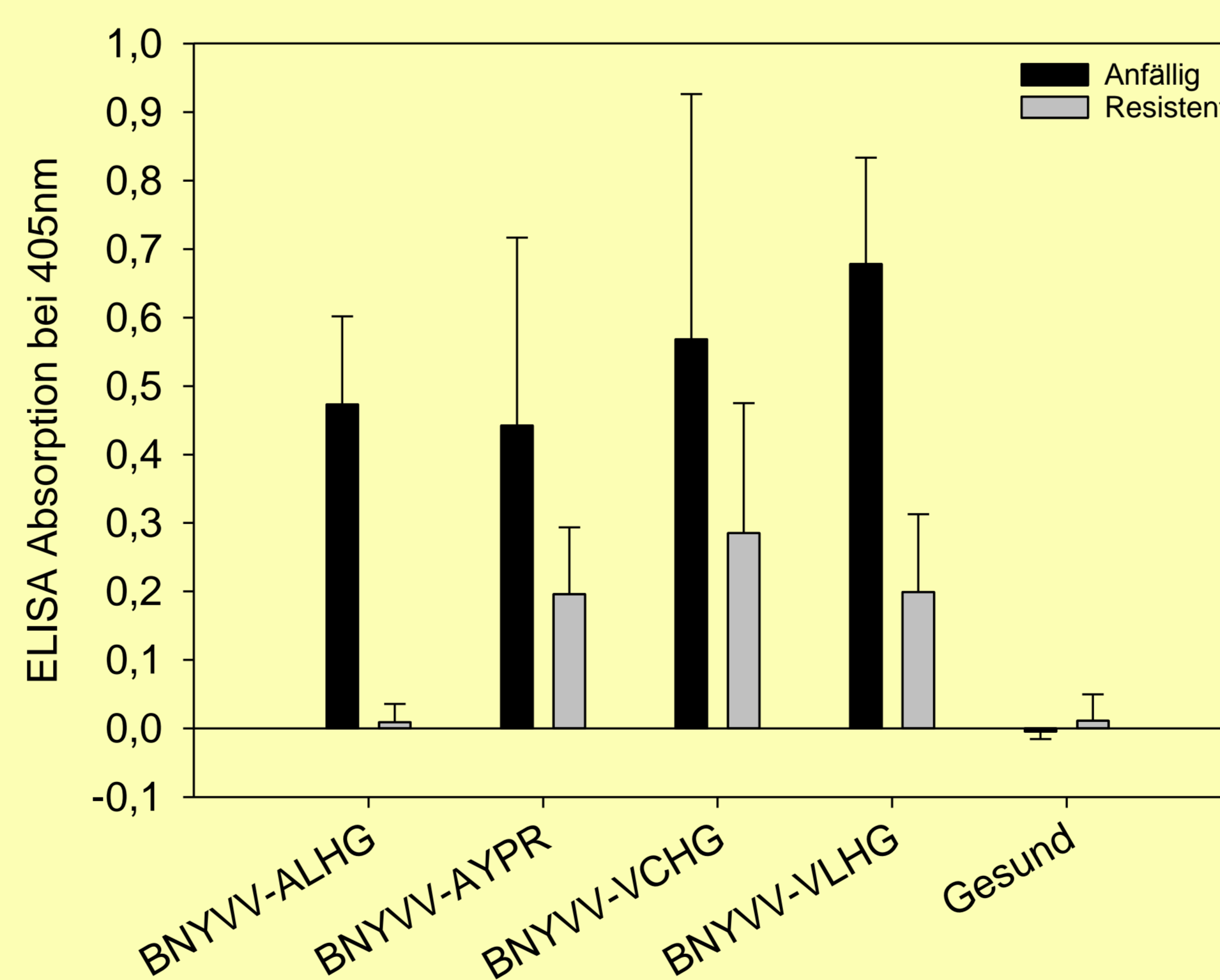


Abb.3: Mittelwerte der ELISA Absorptionswerte (405nm) gemessen in Seitenwurzeln von einem anfälligen und resistenten ZR-Genotyp nach Infektion mit verschiedenen Tetradenvarianten des BNYVV (51-52dpi, n=12).

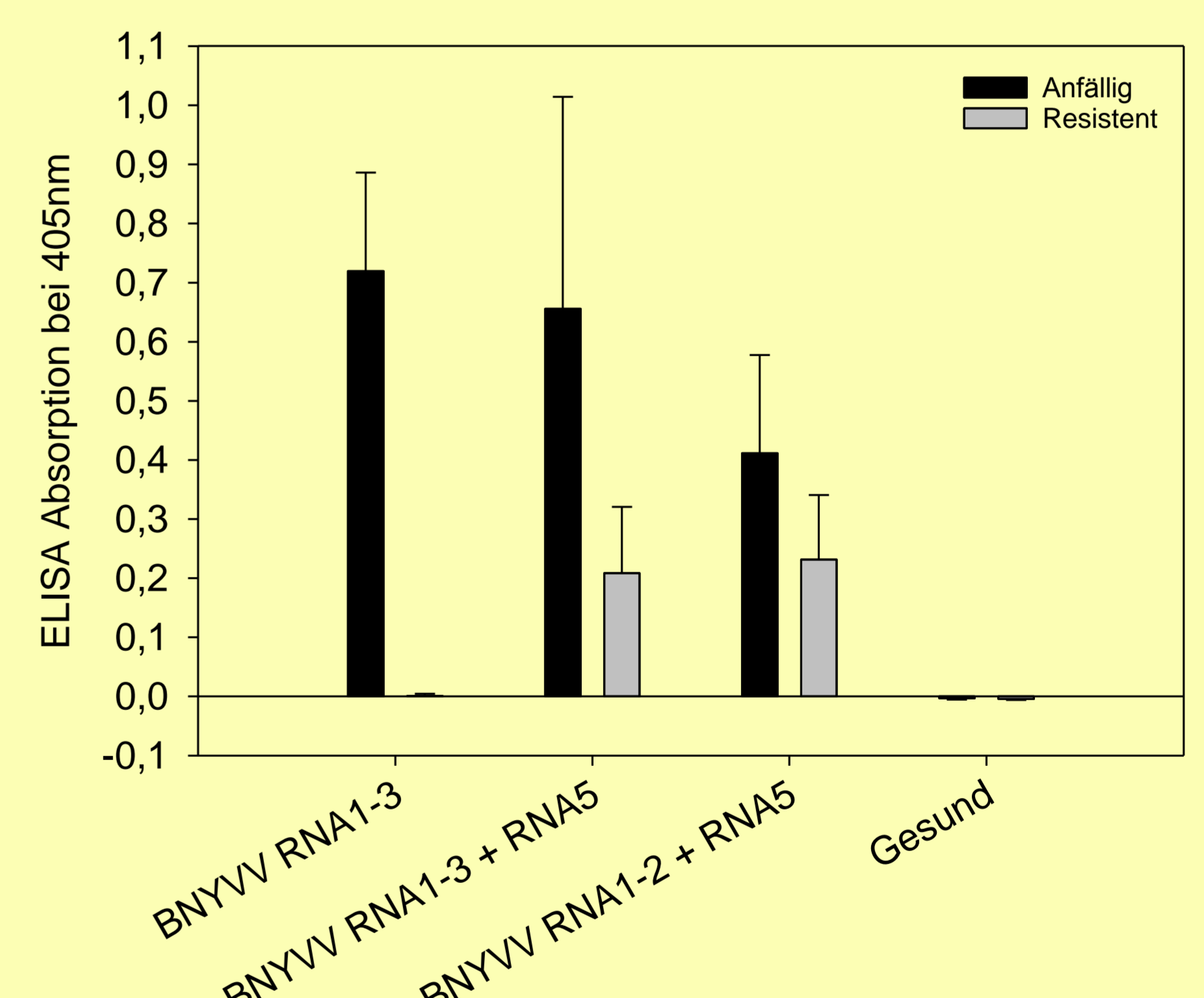


Abb.4: Mittelwerte der ELISA Absorptionswerte (405nm) gemessen in Seitenwurzeln von einem anfälligen und resistenten ZR-Genotyp nach Infektion mit verschiedenen Tetradenvarianten des BNYVV (51-52dpi, n=12).

## Ergebnisse und Diskussion:

Für die Etablierung des Resistenztests wurden ein anfälliger und ein resistenter Zuckerrüben genotyp (*Rz1*) mit dem BNYVV-Klon infiziert. Lediglich in den Seitenwurzeln des anfälligen Genotyps konnte das Virus nachgewiesen werden, wodurch die Wirkung des *Rz1* Resistenzgens bestätigt wurde (Abb. 2). Anschließend wurde die nicht resistenzüberwindende Tetrade an AS67-70 des P25 von ALHG zu VLHG, VCHG und AYPR mutiert. Im Resistenztest führten alle Mutationen der Tetrade zu einer messbaren Virusreplikation im resistenten Genotyp (Abb. 3). Lediglich bei der Ausgangstetrade ALHG konnte kein Virus nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass verschiedene Mutationen in der Tetrade zu einer Resistenzüberwindung führen. Ebenso konnte eine Resistenzüberwindung erreicht werden, wenn zusätzlich die RNA5 inokuliert wurde (Abb. 4). Dieser Effekt war unabhängig von der Tetradenmutation, was daraufhin deutet, dass BNYVV unterschiedliche Mechanismen zur Überwindung der *Rz1* Resistenz entwickelt hat. Mit dem hier entwickelten reversen genetischen System steht ein geeignetes Verfahren zur Verfügung, um den Mechanismus der Resistenzüberwindung weiter aufzuklären.