

# Bestimmung der Inokulumdichte von Isolaten des *Beet necrotic yellow vein virus* und Nachweis der variablen Pathogenität gegenüber verschiedenen Zuckerrüben-Genotypen - Resistenztest in natürlich infiziertem Boden versus *Polymyxa betae* Zoosporenfektion

F. Pferdmeiges und M. Varrelmann

• Institut für Zuckerrübenforschung, Abteilung Phytomedizin, Holtenser Landstr. 77, D-37079 Göttingen

## Einleitung

Die Zuckerrübenkrankheit Rizomania, verursacht durch das *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV, Genus Benyvirus), wird durch Zoosporen des bodenbürtigen Plasmodiophoromyceten *Polymyxa betae* übertragen. Drei Virustypen (A, B und P) sind bekannt, die sich in ihrer Genomzusammensetzung und geographischen Verteilung unterscheiden. BNYVV besteht aus vier RNA Segmenten mit einem Pathogenitätsfaktor auf der RNA4, nur P-Typen besitzen eine fünfte RNA5 mit zusätzlichem Pathogenitätsfaktor. Bisher wird Rizomania durch den Anbau toleranter Sorten mit dem Rz1 (Holly) Resistenzgen kontrolliert. Im Ausland werden z.T. doppelt tolerante Sorten [Rz1+Rz2 (WB42)] verwendet. In den letzten Jahren wurden an einigen Zuckerrübenstandorten z.B. in Spanien, Frankreich und den USA zunehmend auffällige ertragsrelevante Rizomiasymptome beobachtet. Möglicherweise sind diese Resistenzbrüche auf eine höhere Aggressivität bzw. eine höhere Virusdichte der jeweils auftretenden Virustypen zurückzuführen. Um herauszufinden, ob die unterschiedliche Virulenz isolatabhängig ist, auf bestimmten Mutationen beruht oder mit einer erhöhten Inokulumkonzentration korreliert, wurden verschiedene Infektionstests durchgeführt.

## Material und Methoden

- **MPN:**
  - MPN nach Tuitert *et al.* (1990)
  - 10 Wiederholungen, 6 Verdünnungsstufen (V1-V6): V1: 1:5; V2: 1:25; V3: 1:125; V4: 1:625; V5: 1:3 125; V6: 1:15 625
  - 6 natürlich infizierte Böden unterschiedlicher Herkunft: Langendorf (GER), B-Typ; Rovigo (I) A-Typ = „Standard A-Typ“; Daimiel (E), A-Typ und Imperial Valley (USA), A-Typ beide mit etwas abweichender genomischer Sequenz; Pithiviers (F), P-Typ mit einer weiteren RNA (RNA5) und dem darauf kodierenden Pathogenitätsfaktor (P26)
  - Rizomania-anfälliger Zuckerrüben-Genotyp
  - 5 Wochen Gewächshaus (GWH)-Kultur (14h Licht; 14°C nachts, 20°C tagsüber)
  - DAS-ELISA (Antiserum DSMZ)
  - „MPN-Calculator“ für die Verrechnung: <http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html> MPN Calculator (VB6 version)
- **Resistenztest in natürlich infizierten Böden:**
  - infizierter Boden / Sand 1:2 verdünnt
  - 3 Genotypen: anfällig, einfach tolerant (Rz1) und doppelt tolerant (Rz1+Rz2)
  - Boden aus gleicher Herkunft wie im MPN
  - 12 Wochen in der Klimakammer kultiviert (Woche 1- 5: 14h Licht; 14°C nachts, 20°C tagsüber; Woche 6-12 : 16 h Licht; 16°C nachts, 22°C tagsüber)
  - DAS-ELISA (Antiserum DSMZ); Rüben-gewicht
- **Infektion mit *P. betae* in unterschiedlichen Zoosporendichten:**
  - 6 *P. betae* Herkünfte mit 5 versch. Virusstämmen: A, B, D, IV, P, und eine virusfreie Zoosporenkultur R
  - 2 Genotypen: anfällig und Rz1+Rz2
  - 2 Verdünnungsstufen: 100 Zoosporen / ml und 1000 Zoosporen / ml
  - 3 Wo. im GWH in Hydrogefäßen (16h Licht; 18°C nachts, 24°C tagsüber)
  - DAS-ELISA (Antiserum Loewe)

## Ergebnisse

### Bestimmung der Inokulumkonzentration mit Hilfe des MPN

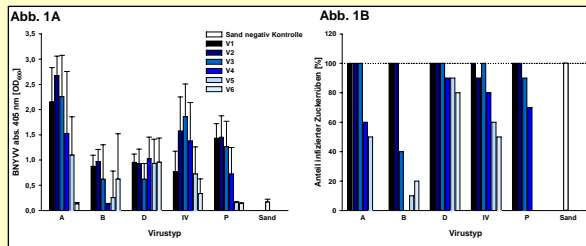


Abb. 1: Gemessene ELISA-Absorption der Böden mit den jeweiligen Virusbezeichnungen A, B, D, IV, P und Sand in 6 Verdünnungsstufen (V1-V6) dargestellt als Mittelwert über die einzelnen Wdh. je Verdünnung und Typ (Abb. 1A) sowie der tatsächliche Anteil infizierter Pflanzen in den einzelnen Verdünnungen und Typ.



Tab. 2B

Virustyp	A	B	D	IV	P
MPN / g Boden	1 000	96	15 000	2 100	430

Abb. 2: Inokulmpotential der Böden verschiedener Herkunft (A, B, D, IV, P und Sand); Ertragswirkung in der Verdünnung V1 (Abb. 2A) und Höhe des Inokulmpotenzials je g Boden (Tab. 2B).

### Resistenztest in natürlich infiziertem Boden

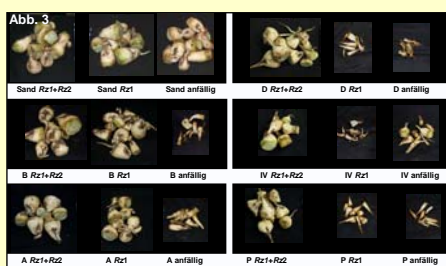


Abb. 3: Geerntete, geköpfte und gewaschene Rüben der Genotypen „Rz1+Rz2“, „Rz1“ und „anfällig“ nach 12 Wochen Kultivierung in der Klimakammer in natürlich infizierten Böden der Herkunft A, B, D, IV, P und Sand.

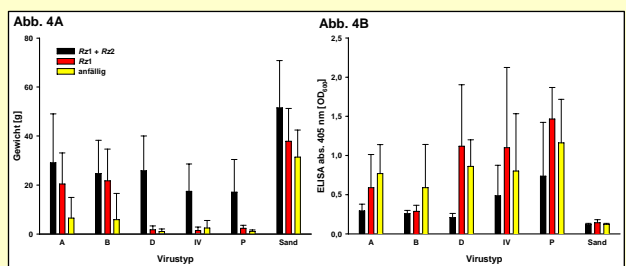


Abb. 4: Mittlere Rübenkörpergewichte (Abb. 4A) nach Kultivierung in der Klimakammer in natürlich infizierten Böden sowie die mittlere ELISA-Absorption (Abb. 4B) der drei Genotypen „Rz1+Rz2“, „Rz1“ und „anfällig“.

### Infektion mit *Polymyxa betae* Zoosporen

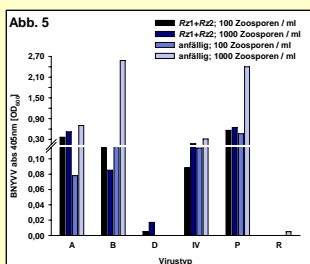


Abb. 5: ELISA-Absorption nach dreiwöchiger Zoosporenfektion in Hydrokultur mit unterschiedlichen Zoosporendichten (jeweils 100 bzw. 1000 Zoosporen pro ml Nährlösung) an zwei verschiedenen Genotypen: „Rz1+Rz2“ und „anfällig“. A, B, D, IV und P zeigen die Herkunft der verschiedenen Böden / der daraus isolierten *P. betae* Zoosporen und R zeigt eine BNYVV-freie Zoosporenkultur.

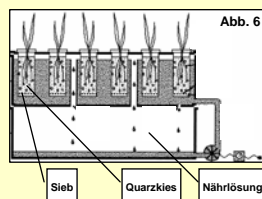


Abb. 6: Darstellung des Prinzips eines automatischen Zoosporenmersions-Systems (Adams *et al.*, 1996; Ligrève *et al.*, 1998), bei welchem durch einen zweistündigen Rhythmus die Zuckerrübenwurzeln mit einer Nährlösung über eine Periode von 3 Wochen be- und entwässert werden. Dadurch vermehren sich die Zoosporen an den Haarwurzeln und werden über die Nährlösung an neue Haarwurzeln gebracht, um dort weitere Infektionen zu erzeugen. Die Kultur ist Grundlage für Zoosporenfektionsversuche.

## Schlussfolgerungen

- Hohe MPN-Werte in den Böden von D und IV sprechen für ein hohes Inokulmpotential.
- Vergleichbar niedriges Inokulmpotential des P-Typs (Tab. 2B) mit hohen Gewichtsverlusten und ELISA-Werten (Abb. 4) im Rz1 Genotyp lassen eine stärkere Aggressivität durch den zusätzlichen Pathogenitätsfaktor P26 auf der RNA5 des P-Typs vermuten.
- Der Resistenztest in natürlich infizierten Böden (Abb. 4) zeigt hohe Ertragsverluste und hohe Virustiter im anfälligen Genotyp bei allen Virusherkünften, wie auch im Rz1 Genotyp bei D, IV und P; auf diesen Standorten wird die landwirtschaftlich hauptsächlich genutzte Rz1-Resistenz überwunden.
- Erzeugung wiederholbarer Ergebnisse bei *Polymyxa betae* Zoosporenfektionen bereitet Schwierigkeiten; Bestimmung der Anzahl der mit BNYVV-beladenen Zoosporen ist trotz Einstellung der Zoosporendichte nicht möglich, was zu hochvariablen Ergebnissen führen kann (Abb. 5).
- Nachgewiesene Sekundärinfektionen mit anderen Pathogenen wie z.B. *Phyrium* (D und IV) und *Fusarium* (P und A) könnten die Viruspathogenität und Zoosporenkultur beeinflussen.