

Aus dem
Institut für Zuckerrübenforschung
Göttingen

Kathrin Bornemann

**Charakterisierung von resistenz-
überwindenden Isolaten des *Beet necrotic
yellow vein virus* (BNYVV) in Zuckerrüben
und Stabilität der Resistenz in
Abhängigkeit von Umweltbedingungen**

34/2013



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Charakterisierung von resistenzüberwindenden Isolaten
des *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in Zuckerrüben
und Stabilität der Resistenz in Abhängigkeit von Umweltbedingungen





**Charakterisierung von resistenzüberwindenden Isolaten
des *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in Zuckerrüben
und Stabilität der Resistenz in Abhängigkeit von Umweltbedingungen**

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

vorgelegt von

Kathrin Bornemann

geboren in Göttingen

Göttingen, im Juli 2012



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, 2013
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2012

978-3-95404-357-6

D 7

1. Referent: Prof. Dr. M. Varrelmann
2. Korreferent: Prof. Dr. H. Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2012

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2013

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, 2013

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-95404-357-6



„Wenn du den Feind und dich selbst kennst, brauchst du den Ausgang von hundert Schlachten nicht zu fürchten. Wenn du dich selbst kennst, doch nicht den Feind, wirst du für jeden Sieg, den du erringst, eine Niederlage erleiden. Wenn du weder den Feind noch dich selbst kennst, wirst du in jeder Schlacht unterliegen.“

Sunzi (544 – 496 v. Chr.)





Für meine Familie





Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis	V III
Abbildungsverzeichnis.....	XV
1. Einleitung.....	1
1.1 Zuckerrübenanbau in Deutschland.....	1
1.2 Landwirtschaft unter sich ändernden Klimabedingungen	2
1.2.1 Klimawandel	2
1.2.2 Anstieg der Temperatur nach dem Emissionsszenario A1B.....	3
1.2.3 Auswirkungen auf die Landwirtschaft.....	5
1.3 Rizomania	6
1.3.1 Virustaxonomie und Genomexpressionsstrategie.....	7
1.3.2 Der Pathogenitätsfaktor P25 und dessen Variabilität	11
1.3.3 Übertragung durch <i>Polymyxa betae</i>	12
1.3.4 Geografische Verbreitung	14
1.3.5 Resistenzzüchtung.....	16
1.4 Dauerhaftigkeit der Virus-Resistenz.....	18
1.4.1 Dauerhaftigkeit der Rizomania-Resistenz	19
1.4.2 Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten	19
1.4.3 Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Resistenz.....	20
1.4.4 Einfluss des Vektors auf das Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten	21
1.4.5 Einfluss des pflanzlichen Genotyps und des Virus-Isolates auf die Dauerhaftigkeit der Resistenz	21
1.4.6 Einfluss weiterer Faktoren auf die Dauerhaftigkeit der Resistenz.....	22
1.5 Virale Evolution.....	23
1.5.1 Variabilität pflanzlicher Viren	23
1.5.2 Viruspopulationsdynamik und Genetischer Flaschenhals („bottleneck“)	25
2. Ziele der Arbeit	26
3. Manuskript 1	28
4. Manuskript 2	48
5. Manuskript 3	76



Inhaltsverzeichnis

6. Manuskript 4	99
7. Diskussion.....	125
7.1 Die Beladung von <i>Polymyxa betae</i> als Methode zur Identifizierung von resistenzüberwindenden Isolaten.....	125
7.1.1 Nutzung der Beladung von <i>P. betae</i> für weitere Fragestellungen	127
7.2 Standardisierung des Rizomania-Resistenztests im Gewächshaus.....	130
7.3. Einfluss der Temperatur auf die BNYVV-Gehalte in Blatt und Wurzeln von Zuckerrüben.....	131
7.4 Auftreten, Ausbreitung und Charakterisierung von resistenzüberwindenden BNYVV-Isolaten	134
7.5 Zukünftige Bedeutung von Rizomania und mögliche Kontrollstrategien	137
8. Zusammenfassung.....	141
9. Literaturverzeichnis	144
Publikationen und Vorträge	165
Danksagung.....	168
Curriculum Vitae.....	169



Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
Abb.	Abbildung
ANOVA	„analysis of variance“
ATS	„ANOVA-type statistical analysis“
A-Typ	BNYVV-Isolatgruppe, die überwiegend in Südeuropa und
den	USA auftritt
B-Typ	BNYVV-Isolatgruppe, die überwiegend in Mitteleuropa
	auftritt
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
CaCO ₃	Calciumcarbonat
CH ₄	Methan
cM	Zentimorgan
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	„coat protein“
C37	Zückerrübenlinie
C48	Nachkommen einer Kreuzung aus WB41+WB42 und C37
DNA	Desoxyribokukleinsäure
dpi	„days post inoculation“
dsRNA	doppelsträngige RNA
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
et al.	<i>et alii</i>
EU	Europäische Union
GAP	Gemeinsame Agrarpolitik
ha	Hektar
HR	Hypersensitive Reaktion
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change



Abkürzungsverzeichnis

IRS	„Instituut voor Rationele Suikerproductie“
IV	BNYVV-Isolat, das im Imperial Valley (Kalifornien) auftritt
J-Typ	BNYVV-Isolatgruppe, die in Japan und Deutschland auftritt
kDA	Kilodalton
MPN	„most probable number“
NL	BNYVV-Isolat, das in den Niederlanden auftritt
nt	„nucleotide“, Nukleotide
N ₂ O	Distickstoffmonoxid (Lachgas)
ORF	„open reading frame“
PCR	„polymerase chain reaction“
pH	pondus hydrogenii (Säuregrad einer Lösung)
PTGS	„post transcriptional gene silencing“
P-Typ	BNYVV-Isolatgruppe, die in Frankreich, Groß Britannien und Kasachstan auftritt und eine zusätzliche fünfte RNA besitzt
P25	Pathogenitätsfaktor von BNYVV
QTL	„quantitative trait loci“
RISC	„RNA-induced silencing complex“
RNA	Ribonukleinsäure
RT	„read-through“
<i>Rz1</i>	Resistenzgen gegenüber BNYVV (aus der „Holly“ Resistenz)
<i>Rz2</i>	Resistenzgen gegenüber BNYVV (aus der WB42-Resistenz)
<i>Rz3</i>	Resistenzgen gegenüber BNYVV (aus der WB41-Resistenz)
SSCP	„single strand confirmation polymorphism“
siRNA	„short interfering RNA“
SRES	Special Report on Emission Scenarios
TGB	„triple gene block“
u.a.	unter anderem
UNFCCC	United Nations Framework Convention on Climate Change
WB41	<i>Beta maritima</i> Akzession „wild beet 41“
WB42	<i>Beta maritima</i> Akzession „wild beet 42“
WHO	Welthandelsorganisation



Abkürzungsverzeichnis

z.B.	zum Beispiel
ZMO	Zuckermarktordnung

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
L	Leucin
P	Prolin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
Y	Tyrosin

Viren

BaYMV	<i>Barley yellow mosaic virus</i>
BBSV	<i>Beet black scorch virus</i>
BCMV	<i>Bean common mosaic virus</i>
BdMV	<i>Burdock mottle virus</i>



Abkürzungsverzeichnis

BNYVV	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
BOLV	<i>Beet oak-leaf virus</i>
BSBMV	<i>Beet soilborne mosaic virus</i>
BSBV	<i>Beet soilborne virus</i>
BVQ	<i>Beet virus Q</i>
CPsV	<i>Citrus psorosis virus</i>
CymRSV	<i>Cymbidium ringspot virus</i>
MNSV	<i>Melon necrotic spot virus</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
RGSV	<i>Rice grassy stunt virus</i>
RNMV	<i>Rice necrosis mosaic virus</i>
RSNV	<i>Rice stripe necrosis virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TuMV	<i>Tulip mosaic virus</i>



Tabellenverzeichnis

Tabellen in Manuskripten

Manuskript 1

Table 1: Number of infected plants after vortex inoculation, <i>P. betae</i> loading, and the resistance test	46
Table 2: Mean BNYVV ELISA absorption values measured in the small rootlets of sugar beet genotypes grown in the resistance test, and measured total virus content for all replications per treatment.....	46
Table 3: ATS for BNYVV content in small rootlets of sugar beet plants grown in the resistance test (test of effect slices).....	47

Manuskript 2

Tabelle 1: Sequenzvariationen der Aminosäuretetrade AS67-70 des Pathogenitätsfaktors P25 und seine verschiedenen Typen. Grau hinterlegte Aminosäuren kennzeichnen Tetraden-zusammensetzungen von resistenzüberwindenden Isolaten.....	69
Tabelle 2: Mittlere Virusgehalte (n = 32) in Seitenwurzeln anfälliger und resistenter Zuckerrübengenotypen in Abhängigkeit von der Bodentemperatur nach sechs Wochen Kulturdauer	70

Manuskript 3

Table 1: Mean BNYVV ELISA absorption values measured in small rootlets of sugar beet genotypes grown in the greenhouse resistance test at two different locations. The results of the different test locations (IfZ and IRS) are displayed separately.....	94
Table 2: Number of infected plants after vortex inoculation, <i>P. betae</i> loading, and the resistance test	95
Table 3: Mean BNYVV ELISA absorption values measured in the small rootlets of sugar beet genotypes grown in the resistance test, and measured total virus titer for all replications per treatment.....	96
Table 4: ATS for BNYVV content in small rootlets of sugar beet plants grown in the resistance test (test of effect slices).....	97



Tabellenverzeichnis

Manuskript 4

Table 1: BNYVV-infested field soils applied for bait plant test in the greenhouse to produce virus infected roots of a BNYVV susceptible sugar beet genotype for use as inoculums.....	120
Table 2: Frequencies of P25 tetrad compositions in the BNYVV inoculum used in competition experiments, obtained from lateral roots of a susceptible (<i>rz1rz1</i>) sugar beet genotype following deep sequencing analysis. Tetrad variants with frequencies below the calculated sequencing error of 0.229% are not displayed	121
Table 3: BNYVV inoculum combinations used for infection and in competition experiments in the greenhouse in susceptible and <i>Rz1</i> resistant sugar beet plants: Mean BNYVV ELISA absorption values measured in small rootlets of sugar beet genotypes after six weeks of cultivation and infection rate	122
Table 4: BNYVV P25 tetrad compositions following competition of different BNYVV populations in susceptible (<i>rz1rz1</i>) and resistant (<i>Rz1rz1</i>) sugar beet genotypes obtained by means of deep sequencing	123
Table S1: Deep sequencing analysis read numbers obtained in competition experiments with different BNYVV strains and sugar beet genotypes.....	124

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen in der Einleitung und Diskussion

Abbildung 1: Die Jahresmitteltemperatur in Deutschland (gleitendes zehnjähriges Mittel) nach den verschiedenen IPCC-Emissionsszenarien (A-Szenarien = wachstumsorientiert; B-Szenarien = nachhaltig) 4

Abbildung 2: BNYVV-infizierte Zuckerrüben zeigen einen weinglasförmigen Rübenkörper (A, linke Rüben) sowie einen stark ausgeprägten Wurzelbart (A, rechte Rübe). Typische Blattsymptome nach einer mechanischen Inokulation mit BNYVV sind Aufhellungen entlang der Blattadern (B). Im Feld können nach einer Infektion mit BNYVV nesterweise Blattaufhellungen auftreten wie hier zu einem späteren Zeitpunkt in der Vegetationsperiode (C) 8

Abbildung 3: Genomexpressionsstrategie von BNYVV 10

Abbildung 4: Lebenszyklus von *P. betae* 13

Abbildung 5: Lichtmikroskopischer Nachweis (400x Vergrößerung) von *P. betae* in Seitenwurzeln eines anfälligen Zuckerrüben-Genotyps 14

Abbildung 6: Läsionsausbreitung zehn Tage nach mechanischer Blatt-Inokulation einer anfälligen Zuckerrüben-Sorte; Kultivierung bei unterschiedlichen Temperaturen (A = 18°C, B = 24°C, C = 30°C) unter standardisierten Gewächshausbedingungen 133

Abbildungen in Manuskripten

Manuskript 1

Figure 1: Total virus contents induced by three BNYVV isolates in different sugar beet genotypes shown as the range of relative effects; greenhouse resistance test with 10-week-old plants 47

Manuskript 2

Abbildung 1: Geografische Verbreitung von unterschiedlichen BNYVV-Typen in Europa 71

Abbildung 2: Genomorganisation des *Beet necrotic yellow vein virus*, Expressions- und Translationsschema 72

Abbildung 3: P25 und seine funktionellen Domänen: Darstellung des P25 Proteins mit Lokalisationssignalen – Kernlokalisierungssignal (57-62) und Kernexportsignal (AS169-178) sowie Aminosäuretetrade (AS67-70)	73
Abbildung 4: Verbreitung resistenzüberwindender BNYVV-Isolate weltweit.....	73
Abbildung 5: Darstellung der Versuchsdurchführung einer künstlichen Beladung von <i>Polymyxa betae</i>	74
Abbildung 6: Absolute Virusgehalte in Seitenwurzeln anfälliger (KWS3), <i>Rz1</i> -resistenter (Beta4430) und <i>Rz1+Rz2</i> -resistenter (Angelina) Zuckerrüben-Genotypen nach zehn Wochen Kulturdauer in einem BNYVV-Boden, der beladene <i>Polymyxa betae</i> -Zoosporen enthält.....	74
Abbildung 7: Gefäßversuch mit anfälligen und resistenten Zuckerrüben-Genotypen zur Untersuchung der Resistenzstabilität bei unterschiedlichen Bodentemperaturen. Die linken zwei Gefäße werden über eine Bodenheizung beheizt, dabei entsteht eine Temperaturdifferenz zur unbeheizten Variante, die variabel eingestellt werden kann	75
 Manuskript 3	
Figure 1: Total virus titer induced by four BNYVV strains in different sugar beet genotypes shown as the range of relative effects; greenhouse resistance test with ten-week-old plants.....	98



1. Einleitung

1.1 Zuckerrübenanbau in Deutschland

Im Jahr 2011 wurden in Deutschland auf rund 400.000 ha Zuckerrüben angebaut (EUROSTAT, 2012). Dies entspricht einer landwirtschaftlichen Nutzfläche von ca. 2,5%. In den letzten Jahren wurden rund 10t Zucker pro ha bei einem durchschnittlichen Zuckergehalt von 17,7% erzeugt (WIRTSCHAFTLICHE VEREINIGUNG ZUCKER, 2012). Mit der Reform der Zuckermarktordnung (ZMO) im Jahr 2006 als Teil der gemeinsamen Agrarpolitik (GAP) der Europäischen Union (EU) wurde die Zuckerproduktion in Europa um 30% gesenkt. Grund für die Reform war der Protest einzelner Mitgliedsstaaten der Welthandelsorganisation (WTO) im Hinblick auf eine Liberalisierung des europäischen Marktes. Durch die Reform sollte ein Marktgleichgewicht eingestellt werden, welches u.a. durch die Einstellung der Produktion auf weniger effizienten Standorten, die Erhöhung der Effizienz der heimischen Erzeugung sowie die Möglichkeit für am wenigsten entwickelte Länder, zusätzlich Zucker zu importieren, vorsah. Für die europäischen Zuckerrübenanbauer, deren Anzahl von 290.000 vor der Reform auf 164.000 nach der Reform zurückging (WIRTSCHAFTLICHE VEREINIGUNG ZUCKER, 2012), bedeutete die Reform einen festgelegten Mindestpreis für Quotenzuckerrüben, dessen Niveau um 40% niedriger gegenüber dem Preis vor der Reform liegt. Durch die Reform wurden 44% aller europäischen Zuckerfabriken geschlossen und der Selbstversorgungsgrad innerhalb der EU sank von 115% auf 85%. Die EU wurde damit vom zweitgrößten Nettoexporteur zu einem der größten Nettoimporteure (WIRTSCHAFTLICHE VEREINIGUNG ZUCKER, 2012). Trotz der Reform hat die Zuckerrübe noch immer eine große Bedeutung nicht nur im Hinblick auf die monetäre Wertschöpfung, sondern auch innerhalb der Fruchtfolge. Weiterhin ergeben sich neue Nutzungspotentiale bei der Erzeugung von Biogas oder Bioethanol.

OERKE und DEHNE (2004) untersuchten die Auswirkungen des Auftretens von Krankheitserregern auf Ertragsverluste verschiedener landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Für den Anbau von Zuckerrüben kann von einem Verlust von 26-30% durch einen Befall mit Schaderregern und trotz eines Einsatzes von Pflanzenschutzmitteln ausgegangen