

F. PFERDMENGES, R. KOENIG & M. VARRELMANN
Institut für Zuckerrübenforschung, Holtenser Landstr. 77,
D-37079 GÖTTINGEN

ATTEMPTS TOWARDS ARTIFICIAL INOCULATION METHODS OF BNYVV TO DIFFERENTIATE POSSIBLE PATHOTYPES WITH VARIABLE PATHOGENICITY

Abstract

Rhizomania in sugar beet is caused by Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV, Genus Benyvirus) which is transmitted by zoospores of *Polymyxa betae*. BNYVV can be divided in three major subgroups by means of sequence divergence (A, B, P-type) with different geographic distribution. The disease can be controlled by growth of partial resistant sugar beet genotypes which inhibit the spread of the virus from initially infected hair-roots to the main tap root. However the use of only a few resistance sources in sugar beet cultivation exerts a strong selection pressure on the virus population, which may promote the occurrence of resistance breaking isolates. Recent observations have shown that different types of BNYVV possess variability in pathogenicity towards different sources of BNYVV-resistant sugar beet genotypes when grown in naturally infested soil. Moreover BNYVV displays highly variable inoculum concentration in soil, which is interfering with certain resistance sources. Therefore it is important to establish artificial standardized infection methods with and without the natural vector *P. betae* in order to differentiate resistance sources and BNYVV-types.

Virus carrying *P. betae* cystosori from sugar beet roots grown in naturally infested soil (A-, B- and P-type) were isolated using a micromanipulator and zoospore hydroponic culture started. Virus infection was monitored using quantitative ELISA and *P. betae* detected by use of microscopy and PCR. Different BNYVV induced variable leaf symptoms in the susceptible sugar beet cultivar grown in the zoospore culture. Results about zoospore yield and artificial inoculation of sugar beet carrying different sources of resistance will be shown and discussed.

In order to exclude the natural vector of the virus, all three BNYVV-types were propagated on *Chenopodium quinoa* leaves and plant sap used for mechanical inoculation of resistant and susceptible sugar beet seedlings. The infection rate was determined by use of quantitative ELISA after two weeks of hydroponics.

Subsequently young plants were potted and cultivated for additional 10 weeks. Results about the influence of different BNYVV types on root yield and virus distribution applying tissue print immunoassay will be shown.

DEVELOPPEMENT DE METHODES D'INOCULATION ARTIFICIELLE POUR L'ANALYSE DE LA PATHOGENICITE DE DIFFERENTS BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS (BNYVV / RHIZOMANIE)

Abrégé

La Rhizomanie, maladie de la betterave sucrière causée par le Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV, Genus Benyvirus) est transmis par des zoospores d'un

champignon natif du sol, *Polymyxa betae*. On distingue les trois types A, B et P de ce virus d'après des différences de séquence et, en corrélation, une répartition géographique. Jusqu'à présent, on ne peut contrôler cette maladie que par la culture de variétés partiellement résistant, empêchant le virus de se propager des racelles à la racine pivot. Cependant, l'emploi, dans la culture des betteraves sucrières, de deux sources de résistance exerce une forte pression sélective sur les populations virales et peut ainsi encourager l'apparition d'isolats surmonter la résistance. Il est démontré par des observations que des isolats différents du virus possèdent une virulence différente, quand plusieurs sources de résistance des betteraves sucrières sont infectées. Ce phénomène engendre dans un sol infesté par nature une teneur virale élevée et des pertes importantes du rendement. Des symptômes spectaculaires et des suites pour le rendement sont remarqués dans des régions autour de Pithiviers (France, type P), Diamiel (Espagne, type A) et Imperial Valley (Etats-Unis, type A). Jusqu'à présent, on n'a pas pu constater de pertes de rendement sur des variétés compatibles en Allemagne où on n'a pu déceler jusqu'alors que le type B.

D'autres agents pathogènes transmis par le sol (p.e. *Rhizoctonia*, *Fusarium* et *Aphanomyces*), une densité élevée de l'inoculum ou même son vecteur peuvent fortement modifier l'intensité des symptômes et les pertes de rendement. Il est donc important de développer des méthodes d'infection standardisée avec et sans le vecteur *P. betae* pour pouvoir analyser les différences entre les sources de résistance et le type viral respectif.

On a isolé à l'aide d'un micromanipulateur des *P. betae* Cystosori porteur de virus, provenant de racines latérales de betteraves sucrières (élevées dans un sol infesté par nature des types virales A, B et P) pour mettre des zoospores en culture liquide. L'infection virale a été surveillée par un ELISA indiquant les quantités, tandis que la présence de *P. betae* a été détecté par microscope et PCR. Pour des betteraves sucrières sensibles soumises à cette culture de zoospores, les différents types de BNYVV donnaient des symptômes foliaires très divergents. Des résultats de la densité des zoospores obtenue et de l'infection artificielle de betteraves à sucre seront présentés.

Pour pouvoir exclure l'influence du vecteur viral, les trois types de BNYVV ont été multipliés sur des feuilles de *Chenopodium quinoa*. On s'est servi de la sève extraite de ses feuilles pour infecter par voie mécanique les plantules venant de betteraves sucrières aussi bien compatibles que prédisposées. Le taux de l'infection a été déterminé par un ELISA quantitatif après deux semaines de culture hydroponique. Ensuite, les plantules ont été cultivées dans des substrats naturels pendant dix semaines. L'influence des différents types BNYVV sur le rendement et la propagation du virus pour la betterave (« tissues print immunoassay ») sera présentée.

ENTWICKLUNG KÜNSTLICHER INOKULATIONSMETHODEN ZUR PATHOGENITÄTSUNTERSUCHUNG UNTERSCHIEDLICHER BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS (BNYVV)/RIZOMANIA

Kurzfassung

Die Zuckerrübenkrankheit Rizomania, verursacht durch das Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV, Genus Benyvirus), wird durch Zoosporen des bodenbürtigen Pilzes

Polymyxa betae übertragen. Das Virus wird aufgrund von Sequenzunterschieden und einer damit korrelierenden geographischer Verteilung in die drei Typen A, B und P unterteilt. Bisher kann die Krankheit allein durch den Anbau toleranter Sorten, welche eine Ausbreitung des Virus von den Haarwurzeln in die Hauptwurzel verhindern, kontrolliert werden. Allerdings wird durch die Verwendung von nur wenigen Resistenzquellen im Zuckerrübenanbau ein starker Selektionsdruck auf die Viruspopulationen ausgeübt, welcher ein mögliches Auftreten von resistenzbrechenden Isolaten fördern könnte. Beobachtungen zeigen, dass verschiedene Virusisolate unterschiedliche Virulenz bei Infektion verschiedener Resistenzquellen der Zuckerrüben zeigen. Dieses Phänomen führt in natürlich infiziertem Boden zum Teil zu hohen Virustiter/Virusgehalt und Ertragseinbußen. Auffällige Symptome und Ertragsbeeinflussungen treten v. a. in Regionen um Pithiviers (Frankreich, P-Typ), Diamiel (Spanien, A-Typ) und Imperial Valley (USA, A-Typ) auf. Bisher wurden an toleranten Sorten in Deutschland, wo bislang nur der B-Typ nachgewiesen werden konnte, keine Ertragsverluste festgestellt. Durch andere bodenbürtige Pathogene (z.B. Rhizoctonia, Fusarium, und Aphanomyces), eine erhöhte Inokulumdichte, oder den Vektor selbst, können die Symptomstärken und Ertragsverluste stark modifiziert werden. Die Entwicklung von standardisierten Infektionsmethoden mit und ohne den Vektor P. betae ist somit wichtig, um Unterschiede zwischen den Resistenzquellen und dem jeweiligen Virustyp zu analysieren.

Virus tragende P. betae Cystosori aus Zuckerrübenseitenwurzeln (gewachsen in natürlich infiziertem Boden mit den Virustypen A, B und P), wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators isoliert um daraus eine Zoosporenflüssigkultur zu entwickeln. Die Virusinfektion wurde durch einen quantifizierenden ELISA kontrolliert, während das Vorhandensein von P. betae durch Mikroskopie und PCR nachgewiesen wurde. Verschiedene BNYVV-Typen riefen sehr unterschiedliche Blattsymptome an anfälligen Zuckerrüben in dieser Zoosporenkultur hervor. Ergebnisse der erzielten Zoosporendichte und künstlichen Infektion von Zuckerrüben mit den verschiedenen Resistenzgenen werden gezeigt.

Um den Einfluss des Virusvektors ausschließen zu können, wurden alle drei BNYVV-Typen auf Chenopodium quinoa Blättern vermehrt. Der Pflanzensaft aus diesen Blättern wurde für eine mechanische Infektion von toleranten und anfälligen Zuckerrübensämlingen benutzt. Die Infektionsstärke wurde anhand von quantitativen ELISA nach zweiwöchiger Hydrokultur bestimmt. Daraufhin wurden die Jungpflanzen in natürlichen Substraten weitere zehn Wochen kultiviert. Der Einfluss der verschiedenen BNYVV-Typen auf Ertrag und Virusausbreitung in den Rüben („tissue print immunoassay“) wird vorgestellt.
