

# Frühselektion auf Resistenz gegen Barley Yellow Mosaic Virus durch mechanische Inokulation

Early screening for resistance to barley yellow mosaic virus by mechanical inoculation

Von W. Friedt

## Zusammenfassung

Ein Test zur Prüfung auf Resistenz gegen das Gelbmosaikvirus der Wintergerste (Barley Yellow Mosaic Virus, BaYMV) durch mechanische Inokulation wird beschrieben. Dieser Test liefert reproduzierbare Ergebnisse bei vergleichsweise geringem Raum- und Zeitaufwand. Damit sind die Voraussetzungen für eine sichere Prüfung spaltender Kreuzungspopulationen im Rahmen genetischer Untersuchungen und/oder in Zuchtprogrammen geschaffen. Für eine sichere Prüfung homogener Zuchtstämme oder Sorten genügen bereits wenige Pflanzen. Auf einige besondere Probleme bei der Anwendung des Testes wird hingewiesen und seine praktische Brauchbarkeit diskutiert.

## Abstract

A new system of testing winter barley for resistance to barley yellow mosaic virus (BaYMV) by mechanical inoculation is described. This test provides reproducible results with low inputs in space and time. Therewith, the prerequisites for an accurate screening of segregating cross progenies are provided, either for genetic analyses or breeding programmes. Correspondingly, only a few plantlets are needed for the secure estimation of BaYMV-reactions of homogeneous barley lines or cultivars. Finally, some problems in the application of the test and its practical usefulness are discussed.

## 1. Einleitung

Die erheblichen Ertragsausfälle, die in Wintergerstenbeständen an BaYMV-verseuchten Standorten regelmäßig auftreten (vgl. HUTH, 1984), haben die Gelbmosaikvirose zur gefährlichsten Krankheit im Wintergerstenanbau werden lassen. Für

die Wintergerstenzüchter ist Resistenz gegen BaYMV daher zum Zuchtziel Nr. 1 geworden. Die Tatsache, daß zum Zeitpunkt der Entdeckung der Gelbmosaikvirose in der Bundesrepublik Deutschland (HUTH und LESEMANN, 1978) bereits einige resistente Sorten zugelassen waren, ist dem glücklichen Umstand zu verdanken, daß bereits vor Jahrzehnten die dalmatinische Landgerste 'Ragusa' unbewußt als BaYMV-Resistenzspender in unsere einheimischen Gersten eingekreuzt wurde. Die genetische Basis der Resistenz in BaYMV-widerstandsfähigen, einheimischen Wintergerstensorten wie 'Birgit', 'Diana', 'Franka', 'Ogra' und 'Sonate' ist höchstwahrscheinlich identisch und beruht auf nur einem rezessiv wirkenden Gen (FRIEDT und FOROUGH-WEHR, 1984).

Die bisher zugelassenen resistenten Sorten sind in anderen Leistungsmerkmalen nicht voll befriedigend; vor allem die mehrzeiligen Sorten zeigen Mängel in der Kornausbildung. Es kommt daher besonders darauf an, resistente Sorten mit hoher Ertragsfähigkeit zu züchten. Dieses Ziel kann durch die Auslese auf BaYMV-Resistenz in möglichst frühem Stadium, d. h. in jungen Generationen schneller erreicht werden. Vor drei Jahren wurde damit begonnen, eine brauchbare Frühselektionsmethode zu entwickeln (vgl. FRIEDT, 1983), die nach wiederholten Modifikationen und Verbesserungen nunmehr zu einem praxisreifen Verfahren geworden ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Wintergerste-Sorten und Linien

Für die Entwicklung der Methode wurden in erster Linie die mehrzeilige Sorte 'Gerbel' und die zweizeilige Sorte 'Igri'

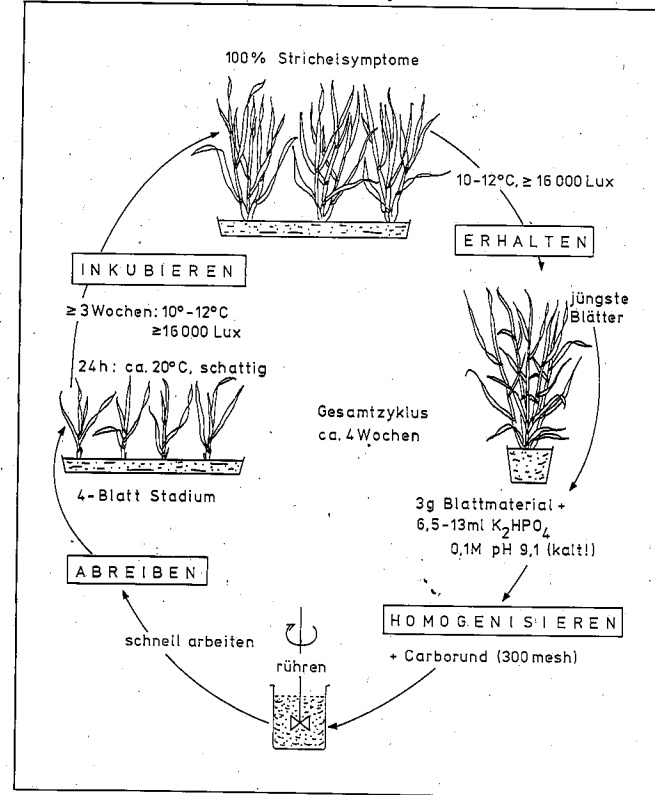
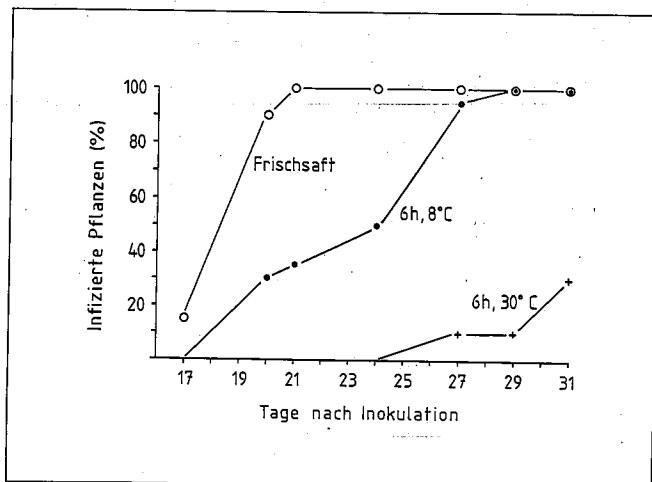


Abb. 1. Übersicht zum BaYMV-Test mit mechanischer Inokulation.

verwendet, die aufgrund der Freilandversuche von HUTH (1982) als hochanfällig gegen BaYMV bekannt waren.

Als resistente Eltern für die Herstellung von Kreuzungen wurden die mehrzeiligen Sorten 'Barbo', 'Birgit', 'Franka', 'Ogra', 'Mokusekko 3' (TAKAHASHI et. al., 1973) sowie die zweizeiligen Sorten 'Diana', 'Sonate' und 'Resistant Ym No. 1' (MURAMATSU, 1976) verwendet. In der vorliegenden Arbeit werden lediglich Kreuzungen eines resistenten mit einem anfälligen Elter behandelt.

Abb. 2. Infektionsverlauf nach Inokulation der Wintergerste cv. 'Gerbel' mit frischem Inokulum (unmittelbar nach der Herstellung) sowie mit Inokulum, das 6h bei 8°C bzw. 30°C gelagert worden war.



## 2.2 Pflanzensucht

Jeweils 50 Gerstensamen wurden in eine Pikierkiste (40 × 60 cm) in Einheitserde ausgesät, bei ca. 20°C angekeimt und bis zum Einblatt-Stadium gehalten. Danach wurden die Pflanzen bis zum vollendeten 4-Blatt-Stadium in einer Klimakammer bei 10 ± 2°C weitergezogen (Lichtintensität 16000 Lux). Die Dauer der Anzucht betrug etwa 4 Wochen.

## 2.3. Inokulum

BaYMV-anfällige Pflanzen aus früheren Tests mit deutlichen Strichelsymptomen dienten als Spendermaterial für die Zubereitung des Inokulums (FRIEDT, 1983). Junge Blätter wurden in etwa 3-5 mm große Stücke zerkleinert, in kaltem Phosphatpuffer gegeben (6,5 g Blattmasse + 13 ml Puffer) und im Bühler-Homogenisator oder im Ultraturrax (JAHNKE & KUNDEL) im Eisbad homogenisiert (vgl. Abb. 1). Die verbliebenen groben Gewebereste (Rohfaser) wurden abgesiebt. Schließlich wurde dem Pflanzenpreßsaft-Puffer-Gemisch noch Carborund (300 mesh) als Abrasiv zugesetzt.

## 2.4. Mechanische Inokulation

Die unter 2.2. beschriebenen Testpflanzen wurden im 4-Blatt-Stadium inokuliert (Abb. 1), wobei das Inokulum anfänglich mit einem Schwamm beidseitig auf alle intakten Blätter abgerieben wurde (FRIEDT, 1983). In späteren Tests wurden Schaumgummi-Fingerlinge für Daumen und Zeigefinger verwendet und damit die jüngeren Blätter gleichzeitig auf Ober- und Unterseite abgerieben. Hierbei wurde darauf geachtet, daß mindestens zwei bis drei Blätter inokuliert wurden. Leichte Welkeerscheinungen, die gelegentlich nach der Behandlung auftraten, führten in der Regel nicht zu nachhaltigen Schäden an den Pflanzen. Es ist darauf zu achten, daß die Abreibung keine Verletzungen und damit bleibende Nekrosen hervorruft.

## 2.5. Inkubation

Inokulierte Pflanzen wurden für etwa 24 h bei 20°C und schattig gehalten und anschließend in einer Klimakammer bei 10 ± 2°C mindestens 3 Wochen inkubiert (Abb. 1); die Tageslänge betrug 12 h bei ca. 16000 Lux Lichtintensität (Philips TL215W/33RS und Sylvania Gro-Lux FR96TI2/GR0235).

## 2.6. Freilandprüfung

Ein Teil des beschriebenen Materials wurde zum Vergleich unter natürlichen Inokulationsbedingungen in einem Feld in Sunstedt bei Königslutter geprüft, um die Übereinstimmung der mechanischen und der natürlichen Infektion zu testen (Herrn RUDERT, Landberatung Königslutter, und Herrn Dr. HUTH, BBA Braunschweig, sei an dieser Stelle für die Bereitstellung einer Feldparzelle gedankt).

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Inokulationsmethode und Infektionserfolg

Etwa drei Wochen nach der Inokulation wurden an anfälligen Pflanzen erste BaYMV-Strichelsymptome sichtbar (vgl. FRIEDT, 1983, s. Abb. 1). Eine Woche später zeigten regelmäßig alle anfälligen Pflanzen die charakteristischen, chlorotischen Strichel (Abb. 1). Der Infektionserfolg wurde stets mit der anfälligen Kontrollsorte 'Gerbel' überprüft.

Reproduzierbare, voll befriedigende Resultate wurden nur bei genauer Beachtung folgender kritischer Punkte erreicht:

(1) Die erste Voraussetzung für ein gutes Infektionsergebnis ist ein möglichst infektiöses Spendermaterial, deutlich erkennbar an den stark ausgeprägten Strichelsymptomen bis

in das jüngste Blatt. Blätter mit schwachen BaYMV-Symptomen enthalten auch geringe Viruskonzentrationen (LESEMANN, pers. Mitt.) und ergeben daher kein vollwirksames Inokulum.

(2) Ebenso wichtig ist die möglichst rasche und schonende Aufarbeitung des Spendermaterials. Die Blätter und vor allem der frische Preßsaft dürfen auf keinen Fall warm werden, die Aufarbeitung muß daher in kaltem Puffer (ca. +4°C) und möglichst im Eisbad durchgeführt werden (FRIEDT, 1983). Das zubereitete Inokulum sollte sofort verarbeitet werden, da seine Infektiosität im Laufe der Zeit abnimmt, insbesondere bei höherer Temperatur. Wenn eine Lagerung des Inokulums unvermeidbar ist, so muß das bei möglichst niedriger Temperatur (mindestens im Kühlschrank) geschehen (vgl. Abb. 2).

(3) Weiterhin hängt das Testergebnis von der Verwendung geeigneter Zusätze zum Preßsaft ab. Frühere Versuche hatten jedoch schon gezeigt, daß hierfür ganz verschiedenartige Substanzen, wie etwa Kaliumphosphat-Puffer oder Natriumsulfid (Antioxidanz) in Frage kommen (FRIEDT, 1983). Weitere Versuche ergaben, daß eine besonders rasche und reproduzierbar starke Infektion mit K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1 M, pH 9,1) als Puffer erreicht wird (Abb. 1, Tab. 1).

(4) Ein weiterer wichtiger Faktor ist das Stadium und der allgemeine Zustand der Testpflanzen. Es hat sich gezeigt, daß das Infektionsergebnis bei zu jungen Pflanzen bis zum 3-Blatt-Stadium oft unbefriedigend ist. Dagegen werden reproduzierbar gute Resultate bei Inokulation im 4- oder 5-Blatt-Stadium erzielt (Abb. 1), vorausgesetzt, daß die Pflanzen kräftig entwickelt und nicht etioliert sind.

### 3.2. Vereinfachungsmöglichkeiten für die Routine-Testung

Während die kritischen Voraussetzungen (1) bis (4) unbedingt erfüllt sein müssen, kann der Test in folgender Weise vereinfacht werden:

a) Die Inokulation muß nicht an jedem Blatt der Pflanze einzeln vorgenommen werden; es reicht aus, die beiden jüngsten Blätter gleichzeitig wie oben beschrieben (2.4.) abzureiben.

b) Um eine ständige, platzaufwendige Vorratshaltung infizierter Pflanzen (die im Sommer noch dazu nur im Phytotron möglich ist) zu vermeiden, können Blätter mit deutlichen BaYMV-Stricheln bei -20°C eingefroren und über mehrere Monate gelagert werden (Tab. 2).

c) Die Inokulumzubereitung kann durch eine größere Verdünnung, d. h. Verwendung größerer Puffermengen pro Gewichtseinheit Blattwerk wesentlich vereinfacht und beschleunigt werden; bei stark infiziertem Blattmaterial wurde bis zur fünffachen Puffermenge (3 g Blattwerk + 15 ml Puffer) noch eine vollständige Infektion erzielt (Tab. 2).

### 3.3. Vergleich von mechanischer und natürlicher Infektion

Die vergleichsweise in einem bekanntermaßen stark mit BaYMV verseuchten Feld (RUDERT, pers. Mitt.) in Sunstedt/Königslutter durchgeführten Prüfungen zeigten in allen Fällen Übereinstimmung mit den Ergebnissen des mechanischen Labortests (Tab. 3).

### 3.4. 'Screening' spaltender Kreuzungspopulationen

Der weiterentwickelte Labortest auf BaYMV-Resistenz erlaubt die serienmäßige Prüfung spaltender Kreuzungsnachkommenschaften, die in Grünbach schon praktiziert wird. Tests mit umfangreichen F<sub>2</sub>-Populationen, die auf Kreuzungen mit jeweils einem einheimischen Resistenzelter zurückgingen, zeigten eine sehr gute Übereinstimmung mit dem erwarteten

Tab. 1. BaYMV-Infektionsverlauf bei Verwendung verschiedener Phosphat-Puffer für die Inokulum-Herstellung; Sorte 'Gerbel'.

Puffer	Anzahl Pflanzen	Infizierte Pflanzen Tage nach Infektion					
		16	18	20	23	28 %	
K-Na-Phosphat-Gemisch pH 7,0	38	10	34	36	37	37	97,4
K-Phosphat-Gemisch pH 7,0	38	10	31	32	37	38	100,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1 M pH 9,1	37	29	37	37	37	37	100,0

\*) Erste Symptome nach 15 Tagen am 4. Blatt, im 5-Blatt-Stadium.

Tab. 2. Infektionsrate bei Homogenisation frischer oder gefrorener Blätter in etwa 5- oder 10facher Puffermenge; Wintergerste cv. 'Igri'.

Puffer/3 g Blattmaterial	Blätter	
	frisch	gefroren
15 ml K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40/41 (98%)	47/47 (100%)*
30 ml K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	18/35 (51%)	35/43 (80%)

\*) Infizierte/inokulierte Pflanzen (Infektionsrate %).

Tab. 3. BaYMV-Reaktion verschiedener Gersten-Sorten und Stämme auf natürliche und mechanische Inokulation.

Sorte oder Stamm	Feld		Phytotron Grünbach
	Sunstedt (1-9)*	(1-9)*	
Barbo, Birgit, Franka, Ogra, Sonate, Dea, Wigo, Asahi 9 (J), Nirakei 31 (J), Mokusekko 3, Res. Ym No. 1, Nittakei 1, Kanto nijo 19 (alle J)	1		resistent
Ishukushirazu (J), FIRLBECK-Stämme 1-17, FRANCK-Stämme 4-25	3		resistent
Gerbel, Igri, Kanagawa 9 (J)	7		anfällig
	9		anfällig

\*) 1 = ohne Strichelsymptome und Vergilbung, 9 = stark vergilbt, (J) = Sorte aus Japan.

Tab. 4. Reaktion spaltender Kreuzungspopulationen auf mechanische Inokulation mit BaYMV.

Kreuzung (F <sub>2</sub> )	Anzahl Pflanzen			χ <sup>2</sup>	P
	Gesamt	anfällig	resistent		
Ingrid × FRANKA	211	165	46	1,152	0,10-0,30
Igri × SONATE	127	95	32	0,003	> 0,95
DEA × Igri	348	255	93	0,552	0,30-0,50
OGRA × Igri	208	153	55	0,231	0,50-0,70
FRANKA × Corona	252	184	68	0,402	0,50-0,70
FRANKA × Alpha	83	64	19	0,197	0,50-0,70
WIGO × Igri	339	255	84	0,009	0,90-0,95
Summe					
Beobachtet	1568	1171	397		
Erwartet (3:1)		1176	392		

Großbuchstaben kennzeichnen den jeweiligen resistenten Elter

Spaltungsverhältnis, bei Annahme eines rezessiven Resistenzgens (Tab. 4).

Wegen seines vergleichsweise geringen Raum- und Zeitaufwandes ist der Labortest daher besonders geeignet für genetische Untersuchungen zur BaYMV-Resistenz (vgl. FRIEDT und FOROUGH-WEHR, 1984). Aber vor allem ist es nunmehr auch der praktischen Züchtung möglich, schon in der F<sub>2</sub>-Genera-

tion und wesentlich einfacher und zuverlässiger auf BaYMV-Resistenz zu selektieren als im Feldversuch.

#### 4. Diskussion

Die hier beschriebenen Methoden und Ergebnisse verdeutlichen, daß mit der mechanischen Inokulation ein einfacher und relativ schneller Test auf Resistenz gegen das Gelbmosaikvirus der Wintergerste zur Verfügung steht.

Die generelle Aussagefähigkeit des Tests schien jedoch in Frage gestellt, als HUTH et. al. (1984) berichteten, daß es mindestens zwei Virustypen gibt, die sich u. a. auch in ihrer Übertragung unterscheiden; nur einer davon ist mechanisch übertragbar.

Diese Ergebnisse haben es zunächst fraglich erscheinen lassen, ob der Labortest über die mechanische Inokulation auch die Reaktion der Sorten auf das im Freiland vorkommende, und damit praktisch relevante Virus erfaßt. Die vergleichenden Versuche zeigen jedoch, daß die Ergebnisse der mechanischen Inokulation in allen bisher untersuchten Fällen mit den Feldversuchsergebnissen übereinstimmen. Außerdem erwies sich der Test mit mechanischer Inokulation als einfacher und zuverlässiger als der Feldversuch. Im Winterhalbjahr kann die Resistenzprüfung ohne Beeinträchtigung der Ergebnisse statt in der Klimakammer auch im kühlen Gewächshaus durchgeführt werden.

Diese Labortestmethode kann daher auch weiterhin vor allem für ein frühes 'screening' empfohlen werden. Um einen vollen Erfolg sicherzustellen sind jedoch einige wesentliche Faktoren besonders zu berücksichtigen: (1) das Spender-Blattmaterial für die Inokulumzubereitung muß deutliche BaYMV-Symptome aufweisen, (2) es muß rasch und schonend in (3) geeignetem Puffer homogenisiert und (4) frühestens im 4-Blatt-Stadium auf gut entwickelte Testpflanzen abgerieben werden.

Dagegen können die übrigen Schritte je nach gegebenen Möglichkeiten modifiziert oder vereinfacht werden, ohne die Aussagekraft des Tests zu gefährden.

#### Danksagung

Frau Dr. Bärbel FROUGHI-WEHR danke ich für ihre Unterstützung bei der Entwicklung der Tests und Frau Anna HUBER und Herrn Josef BRANDLMEIER für ihre gewissenhafte Hilfe bei der praktischen Durchführung.

#### Literatur

- FRIEDT, W., 1983: Mechanical transmission of soil-borne barley yellow mosaic virus. *Phytopath. Z.* **106**, 16-22.
- FRIEDT, W., B. FROUGHI-WEHR und W. HUTH, 1983: Züchtung auf Gelbmosaikvirus-Resistenz der Wintergerste. *Votr. Pflanzenzüchter* **3**, 169-179. *Arbeitsgem. Pflanzenzüchtg.*
- FRIEDT, W. und B. FROUGHI-WEHR, 1984: Zur Genetik der Resistenz gegen barley yellow mosaic virus in europäischen und asiatischen Gersten und deren Eignung für die Wintergerstenzüchtung. *Ber. Arbeitstag. Saatzuchtleiter, Gumpenstein* **34** (im Druck).
- HUTH, W., 1982: Evaluation of sources of resistance to barley yellow mosaic virus in winter barley. *Z. Pflanzenzüchtg.* **89**, 158-164.
- HUTH, W., 1984: Die Gelbmosaikvirose der Gerste in der Bundesrepublik Deutschland - Beobachtungen seit 1978. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **36**, 49-55.
- HUTH, W. und D. LESEMANN, 1978: Eine für die Bundesrepublik Deutschland neue Virose der Wintergerste. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **30**, 184-185.
- HUTH, W., D.-E. LESEMANN and H. L. PAUL, 1984: Barley yellow mosaic virus: purification, electron microscopy, serology, and other properties of two types of the virus. *Phytopath. Z.* **111**, 37-54.
- MURAMATSU, M., 1976: Breeding of malting barley variety which is resistant to barley yellow mosaic virus. In: *Barley Genetics III, Proc. 3rd Int. Barley Genet. Symp., Garching 1975*, 476-485.
- TAKAHASHI, R., J. HAYASHI, T. INOUE, I. MORIYA and C. HIRAO, 1973: Studies on resistance to yellow mosaic disease in barley. I. Tests for varietal reactions and genetic analysis of resistance to the disease. *Ber. Ohara Inst.* **16**, 1-17.
- USUGI, T. and Y. SAITO, 1976: Purification and serological properties of barley yellow mosaic virus and wheat yellow mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **42**, 12-20.