

Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz

Molekulare Phytomedizin

Untersuchungen
zur Wirtseignung toleranter Zuckerrübensorten für
den Rübenzystennematoden *Heterodera schachtii*

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften (Dr. agr.)

der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

von

Marie Reuther

aus

Dresden

Bonn 2019

Erstprüfer: Professor Dr. Florian M.W. Grundler

Zweitprüfer: Professor Dr. Jens Léon

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2019

Angefertigt mit Genehmigung der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn

“If all the matter in the universe except the nematodes were swept away, our world would still be dimly recognizable, and if, as disembodied spirits, we could investigate it, we should find mountains, hills, valleys, rivers, lakes and oceans represented by a thin film of nematodes.

The location of towns would be decipherable, since for every massing of human beings there would be a corresponding massing of certain nematodes. Trees would still stand in ghostly rows representing our streets and highways.

The location of the various plants and animals would still be decipherable, and, had we sufficient knowledge, in many cases even their species could be determined by an examination of their erstwhile nematode parasites.”

NATHAN AUGUSTUS COBB 1859-1932

Nematodes and their relationships, 1915

Zusammenfassung

Untersuchungen zur Wirtseignung toleranter Zuckerrübensorten für den Rübenzystennematoden *Heterodera schachtii*

Der Rübenzystennematode *Heterodera schachtii* ist der bedeutendste Schädling der Zuckerrübe. Anfällige Zuckerrübensorten zeigen eine hohe Wirtseignung für diesen Wurzelparasiten, sodass sich dieser besonders stark vermehren kann. Infolgedessen kann ein *H. schachtii*-Befall an anfälligen Sorten zu Ertragseinbußen von bis zu 25% führen. Im Gegensatz zu anfälligen Sorten ist die Wirtseignung für *H. schachtii* in den seit dem Jahr 2000 existierenden resistenten Sorten stark eingeschränkt. An einer resistenten Sorte sterben die meisten Juvenilen vor dem Erreichen des Adultstadiums ab. Wenn überhaupt, entwickeln sich an diesen Sorten eher Männchen als Weibchen. Resistente Zuckerrübensorten haben ein generell geringes Ertragspotential und sind im Anbau bisher ohne Bedeutung. Anders, die seit 2003 existierenden toleranten Zuckerrübensorten: Diese reagieren auf den Nematodenbefall tolerant, so dass auch auf Befallsstandorten hohe Erträge erzielt werden können. Die Wirtseignung toleranter Sorten für *H. schachtii* ist bisher weitgehend unbekannt und soll in dieser Arbeit untersucht werden.

In offiziellen Sortenversuchen wurden Bodenproben entnommen, um den Ausgangs- und Endbefall (Pi und Pf) von *H. schachtii* mittels der sogenannten „Schlupfstestmethode“ zu analysieren. So konnte die Reproduktionsrate (Pf/Pi) von *H. schachtii* an fünf toleranten Sorten (*Adrianna*, *BTS 440*, *Kleist*, *Lisanna*, *Vasco*) mit der einer anfälligen (*Beretta*) und der einer resistenten Sorte (*Nemata*) verglichen werden. Basierend auf den dreijährigen Ergebnissen der Pf/Pi im Feld wurde eine Klassifizierung der Wirtseignung von Zuckerrübensorten vorgeschlagen. Dabei wurden resistent wirkende Sorten in hoch und moderat resistent (HR bzw. MR) und anfällig wirkende Sorten in hoch und moderat anfällig (HS bzw. MS) unterteilt. Die Wirtseignung toleranter Sorten konnte überwiegend als MR charakterisiert werden und war um 40% gegenüber der anfälligen Sorte verringert. Um ein nachhaltiges Management des Parasiten zu gewährleisten, wäre eine Bewertung der Wirtseignung zukünftiger Sorten nötig.

Erste Hinweise für die geringe Wirtseignung von toleranten Sorten lieferte die *in vitro* - Untersuchung der Nematodenentwicklung - vom Zeitpunkt der Infektion bis zur Zystenbildung. Anders als an der resistenten Sorte (*Nemata*, HR) war es *H. schachtii* an der toleranten Sorte (*Lisanna*, MR) möglich, Synzytien zu etablieren und sich zu vermehren. Im Gegensatz zur anfälligen Sorte (*Beretta*, HS) entwickelten sich an der toleranten Sorte weniger Weibchen, was auf eine geringe Wirtseignung hinweist. Die

Weibchen an der toleranten Sorte waren kleiner, aber induzierten größere Synzytium als an der anfälligen Sorte. Anscheinend muss *H. schachtii* an der toleranten Sorte ein größeres Synzytium ausbilden, um sich mit Nährstoffen für die Entwicklung zum Weibchen zu versorgen. Deshalb wird vermutet, dass ein noch unbekannter Resistenzfaktor in toleranten Sorten die Funktion des Synzytiums negativ beeinflusst. Während sich 62% der Weibchen an der anfälligen Sorte zu Zysten entwickelten, sind es an der toleranten Sorte nur 55%. An der toleranten Sorte wurden 65% weniger Zysten als an der anfälligen Sorte beobachtet. Zudem enthielten die Zysten an der toleranten Sorte weniger Eier.

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob die Ausprägung des Wurzelsystems der Sorten Hinweise auf die Wirtseignung und Toleranz gibt. Verschiedene Wurzelwachstumsparameter der anfälligen (*Beretta*, HS), der resistenten (*Nemata*, HR) und der drei toleranten Zuckerrübensorten (*Adrianna* und *Lisanna*, MR; *Kleist*, MS) mit und ohne *H. schachtii*-Befall wurden in mit Erde gefüllten Rhizotrongefäßen verglichen. Die Haupt-, Seiten- und Gesamtwurzellänge, die Wurzelsystemtiefe und die Anzahl Seitenwurzeln 1. Ordnung der untersuchten Sorten waren unter Befall gegenüber Nichtbefall reduziert. Sie eignen sich somit als Indikatoren, einen Befall durch den Wurzelparasiten früh zu erkennen. Es konnte gezeigt werden, dass das Wurzelsystem der Genotypen unterschiedlich auf den Befall mit *H. schachtii* reagiert. Die durch den Befall verursachte Reduktion der Parameter war bei den toleranten Sorten stets geringer, als bei der anfälligen Sorte. Demnach konnte gezeigt werden, dass tolerante gegenüber anfälligen Sorten ein resilienteres Wurzelsystem unter Befall aufzeigen. Während dies bereits für tolerante und anfällige Sorten anderer Kulturen berichtet wurde, zeigt diese Arbeit erstmals, dass tolerante und nicht tolerante Zuckerrübensorten durch die Parameter der Hauptwurzellänge und Wurzelsystemtiefe unterschieden werden können. Diese Parameter wurden in toleranten Sorten weniger stark durch den Befall reduziert, als in den nicht toleranten Sorten. Ein Screening der Hauptwurzellänge oder Wurzelsystemtiefe könnte genutzt werden, um die Toleranz und die Wirtseignung in Zuckerrübensorten bereits zu einem jungen Pflanzenstadium schnell und einfach abzuschätzen.

Studies of host status of tolerant sugar beet varieties to the beet cyst nematode *Heterodera schachtii*

The beet cyst nematode *Heterodera schachtii* (BCN) is the most important pest of sugar beet. Susceptible sugar beet varieties are good hosts, which leads to strong development and reproduction of that root parasite. The infection of susceptible sugar beet varieties by BCN can compromise yield up to 25%. Existing resistant varieties are poor hosts for BCN as development and reproduction of the parasite is hindered. In these varieties, most juveniles that invade the plants will die before reaching the adult stage. Even if they develop, most of them become males. Resistant sugar beet varieties have a low yield potential, which makes them less attractive to use for cultivation. Fortunately, tolerant sugar beet varieties are available since 2003. Although high yields can be achieved by using tolerant varieties under BCN attack, the host status of these varieties is largely unknown. In this thesis, it will be determined, whether tolerant varieties are susceptible or resistant to BCN.

Soil samples were collected in the official cultivar field trials to determine the initial and final infestations (pi and pf) of BCN via the so called hatching test. In this way, the reproductive value (pf/pi) of BCN of five tolerant varieties (*Adrianna*, *BTS 440*, *Kleist*, *Lisanna*, *Vasco*) was compared to a susceptible (*Beretta*) and a resistant (*Nemata*) variety. Based on the three-year results of pf/ pi, a classification of host status of sugar beet varieties was proposed. Resistant varieties were designated as highly or moderately resistant (HR or MR), and susceptible varieties were designated as highly and moderately susceptible (HS or MS). The host status of tolerant varieties was predominantly characterized as MR and was reduced by 40% compared to the susceptible variety. In order to ensure a sustainable pest management, a characterization of host status of future sugar beet varieties is recommended.

The development and reproduction of BCN on different sugar beet varieties *in vitro* gave first indications for the poor host status of tolerant varieties. However unlike the resistant variety (*Nemata*, HR), nematodes were able to establish and reproduce on the tolerant variety (*Lisanna*, MR). Nevertheless, less females developed in the tolerant variety compared to susceptible variety (*Beretta*, HS). Further, females in the tolerant variety were smaller, but induced larger syncytia than in the susceptible variety. Based on these observations, we suggest that BCN needs to form a larger syncytium in the

tolerant variety to catch essential nutrients for female development. We also assumed that an unknown resistance factor influences the functionality of a syncytia in tolerant varieties. Nematode females will only form cysts after successful fertilization by the mobile males. In the susceptible variety, 62% of females developed into cysts, but only 55% in the tolerant variety. In the tolerant variety, the number of cysts was reduced by about 65% compared to the susceptible variety. In addition, the cysts developed on the tolerant variety contained less eggs. The lower BCN development parameters were investigated for the first time in a tolerant variety and explain the lower host status (and pf/pi) compared to the susceptible variety.

Further indications for host status and tolerance of varieties are suspected in the root system. For a fundamental study, different root growth parameters of the susceptible (*Beretta*; HS), the resistant (*Nemata*, HR) and the three tolerant sugar beet varieties (*Adrianna and Lisanna*, MR; *Kleist*, MS) were compared in soil-filled rhizotrons with and without BCN infection. The tap, lateral and total root length, root system depth and number of first-order lateral roots of all varieties tested were reduced under infestation compared to non-infected plants. These parameters can be used as early indicators of an attack by the root parasite. In conclusion, it could be shown that the root system of the varieties reacts differently to the infection with BCN. The reduction of all parameters caused by the infestation was always lower for the tolerant varieties than for the susceptible variety. It could be shown that tolerant show a more resilient root system under BCN attack compared to susceptible varieties. While similar reports have already been made for tolerant varieties of other crops, this thesis shows for the first time that tolerant and intolerant sugar beet varieties can be distinguished by the parameters of tap root length and root system depth. These parameters were less severely reduced by the BCN infection in tolerant varieties than in the intolerant varieties. Screening of the tap root length or root system depth could be used to quickly and easily identify host status and tolerance in sugar beet varieties already at a young plant stage.

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1: Allgemeine Einleitung.....	1
Kapitel 2: Hintergrund und Zielsetzungen des Projektes.....	19
Kapitel 3: Nematode-tolerant sugar beet varieties - resistant or susceptible to the Beet Cyst Nematode <i>Heterodera schachtii</i> ?.....	25
Kapitel 4: <i>In vitro</i> development of the Beet Cyst Nematode <i>Heterodera schachtii</i> in susceptible, tolerant and resistant sugar beet varieties.....	35
Kapitel 5: Non-invasive phenotyping reveals differences in sugar beet root growth related to tolerance and resistance to the Beet Cyst Nematode <i>Heterodera schachtii</i>	63
Kapitel 6: Allgemeine Diskussion & Schlussfolgerungen.....	977
Danksagung	

Kapitel 1: Allgemeine Einleitung

Nematoden sind die häufigsten und am weitest verbreiteten, vielzelligen Lebewesen unserer Erde. **Phytopathogene Nematoden** sind eine kleine Untergruppe im Stamm der Nematoden, die wie zahlreiche Pilze, Bakterien und Viren, Pflanzen durch Überwinden der pflanzlichen Abwehr parasitieren können.

Die weltweit verursachten Ertragsschäden durch diese sich obligat biotroph ernährenden Nematoden liegen bei 12,3% (Sasser & Freckman, 1987), was einen wirtschaftlichen Schaden von jährlich mindestens 125 Milliarden US-Dollar ausmachen dürfte (Chitwood, 2003). Je nach Verseuchungsgrad, Art der Nematoden, Witterungsbedingungen sowie der Anbauhäufigkeit ihrer Wirtspflanzen treten Schäden unterschiedlichen Ausmaßes auf. Gegenüber den Blüten-, Stängel- und Blattnematoden stellen die Wurzelnematoden die ertragsrelevanteste Gruppe dar.

Der Körper aller Nematoden ist vermiform (wurmformig) und wird von einer mehrschichtigen, äußerst widerstandsfähigen Kutikula geschützt (Abb. 1). Diese wird von der darunterliegenden Hypodermis produziert. Die Kutikula ist nicht dehnbar und muss bei den vier Häutungen vom ersten Juvenilstadium (J1) bis zum adulten Tier (J1 → J2 → J3 → J4 → adult) abgelegt werden. Die erste Häutung erfolgt meist noch im Ei (Siddiqi, 2000). Die aus den Eiern geschlüpften Nematoden des zweiten Juvenilstadiums (J2) parasitieren die Wirtspflanze und lassen nach Abschluss ihres Lebenszyklus neue Eier im Boden zurück (Sembdner, 1968). Die Reproduktion von Nematoden kann obligat sexuell, fakultativ sexuell oder durch mitotische oder meiotische Parthenogenese geschehen (Chitwood & Perry, 2009). Die Folge des Nematodenbefalls ist oft eine langjährige Schädigung von Wirtspflanzen, welche auf der Überdauerungsfähigkeit der J2 in Eiern beruht.

Phytopathogene Nematoden sind von ihren Wirtspflanzen als Nahrungsquelle abhängig (Wyss, 1997). Um diese zu erreichen, müssen die J2 aus den Eiern schlüpfen und die komplexe Rhizosphäre durchqueren. Alle phytopathogenen Nematoden besitzen einen speziellen Mundstachel (Abb. 1) mit dem sie mechanisch und mit Hilfe von Sekreten biochemisch das Pflanzengewebe parasitieren (Kämpfe, 1952; Sembner, 1968; Hussey, 1989). Das heißt, durch Sekretion ist es dem Parasiten möglich die Pflanzenabwehr zu umgehen und den Stoffwechsel der Pflanze durch

Eingriff in deren Genexpression (Gheysen & Fenoll, 2002) für die eigene Ernährung und Reproduktion zu steuern (Wyss, 1997; Vanholme et al., 2004).

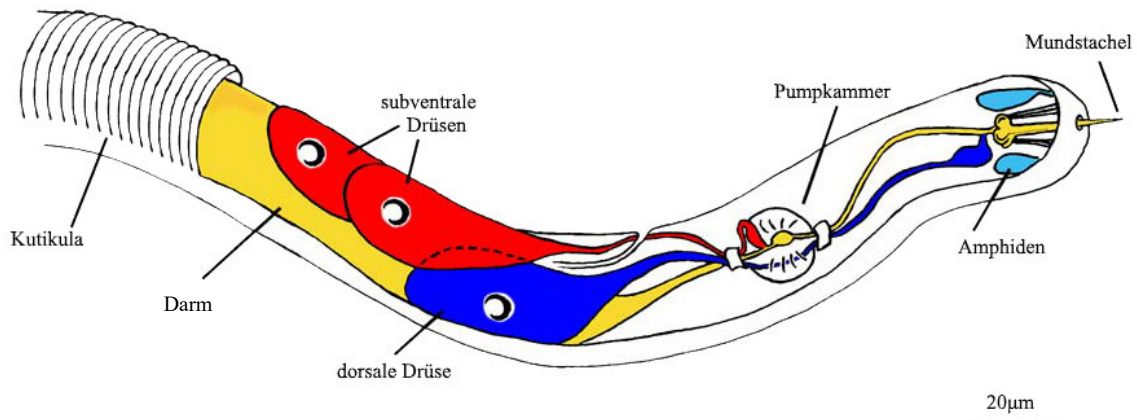


Abb. 1: Schematische Darstellung des vorderen Corpus eines phytopathogenen Nematodens am Beispiel eines sedentären Nematodens im zweiten Juvenilstadium (J2). Gezeigt werden die wichtigsten Sekretionsorgane von phytopathogenen Nematoden. Verändert nach Vanholme et al., 2004.

Die für die Interaktion mit der Pflanze notwendigen Sekrete stammen hauptsächlich aus einer dorsalen und zwei subventralen pharyngalen Drüsen (Abb. 1), den als Begleitzellen bezeichneten Drüsen der Amphiden (Abb. 1), den Hypodermisdrüsen sowie den rektalen Drüsen der Nematoden (Vanholme et al., 2004). Die Sekrete der Hypodermisdrüsen werden über die Kutikula abgegeben (Bird, 1979) (Abb. 1).

Nach dem Ort und der Art der Ernährung (Abb. 2) werden ektoparasitische, wandernde endoparasitische sowie nicht wandernde (sedentäre) endoparasitische **Wurzel nematoden** unterschieden. Ektoparasitische Nematoden nutzen ihren Mundstachel, um sich zeitweise von außen, aus spezifischen Wurzelgeweben zu ernähren (Hussey, 1989). Im Vergleich zu den endoparasitischen Nematoden verursachen sie geringe Schäden am Wurzelsystem (Escobar et al., 2015). Nematoden mit kurzem Mundstachel, wie beispielsweise *Cephalenchus* (Abb. 2, 1.), erreichen nur Pflanzenzellen der Wurzelhaare oder Epidermis, wohingegen zum Beispiel *Hemicycliophora* (Abb. 2, 13.) mittels eines langen Mundstachels tief ins Wurzelinnere gelangen (Siddiqi, 2000). Im Gegensatz dazu dringen endoparasitische Nematoden zur Nahrungsaufnahme in die Wurzel ein. Wandernde Endoparasiten, wie

beispielsweise *Hirschmanniella* (Abb. 2, 20.), können die Wurzel auch wieder verlassen (Siddiqi, 2000).

Die ökonomisch wichtigste Gruppe unter den phytopathogenen Wurzelnematoden sind die **sedentären Endoparasiten**. Die infektiöse J2 eines sedentären Endoparasiten dringt ins Wurzelinnere vor und verbleibt (sedentär; festsitzend) bis zur Vollendung ihres Lebenszyklus am infizierten Gewebe innerhalb der Wurzel (Escobar et al, 2015).

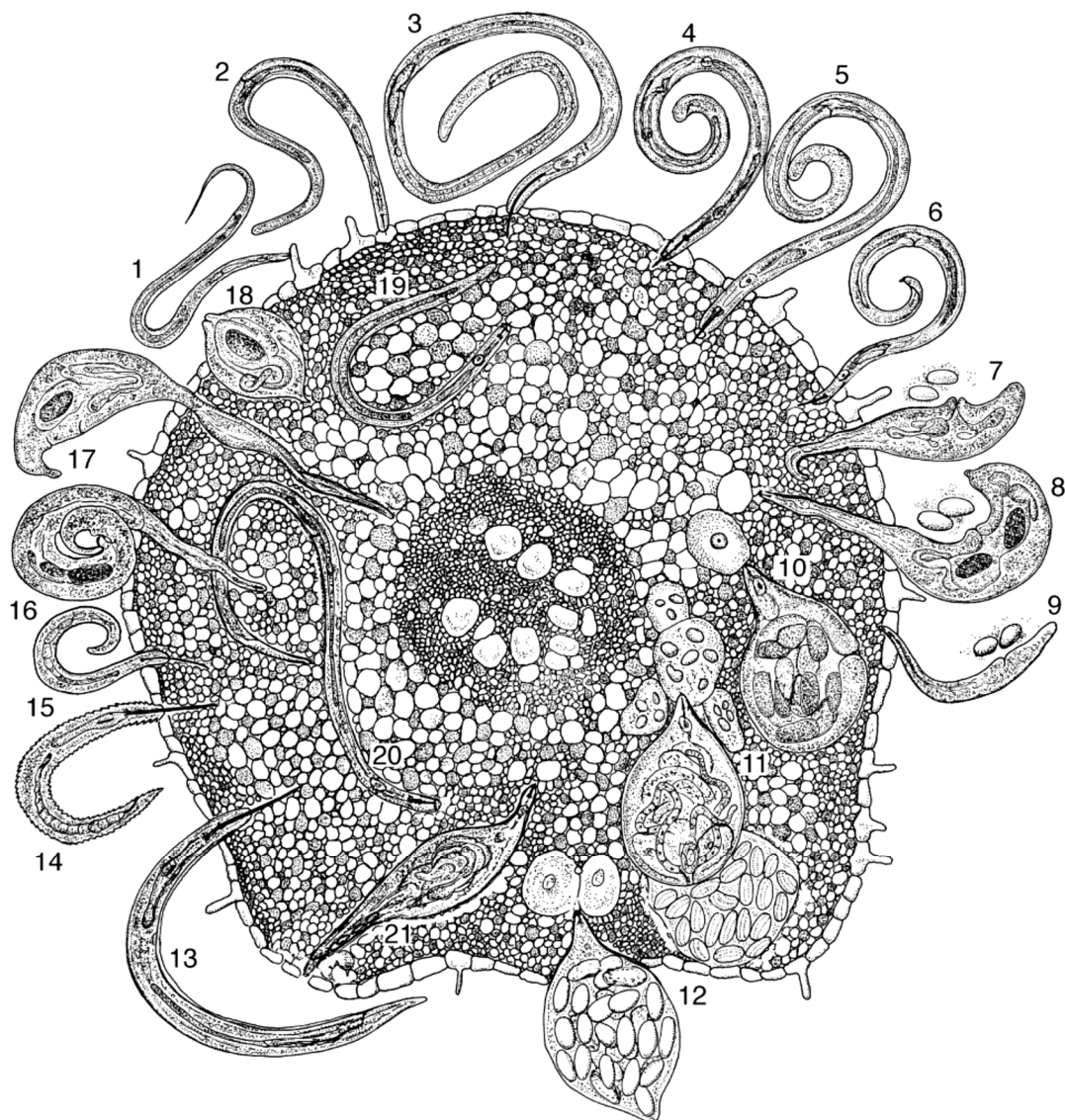


Abb. 2: Übersicht verschiedener Wurzelnematoden und der zur Ernährung aufgesuchten Wurzelgewebe. 1. *Cephalenchus*. 2. *Tylenchorhynchus*. 3. *Belonolaimus*. 4. *Rotylenchus*. 5. *Hoplolaimus*. 6. *Helicotylenchus*. 7. *Verutus*. 8. *Rotylenchulus*. 9. *Acontylus*. 10. *Meloidodera*. 11. *Meloidogyne*. 12. *Heterodera*. 13. *Hemicycliophora*. 14. *Macroposthonia*. 15. *Paratylenchus*. 16. *Trophotylenchulus*. 17. *Tylenchulus*. 18. *Sphaeronema*. 19. *Pratylenchus*. 20. *Hirschmanniella*. 21. *Nacobbus*. Siddiqi, 2000.

Sedentäre Nematoden

Die wichtigsten und bisher am besten beschriebenen sedentären Nematoden stellen die **Wurzelgallennematoden** der Gattung *Meloidogyne* (Abb. 2, 11.) (*M. incognita* beispielsweise an Tomate) und die **Wurzelzystennematoden** der Gattungen *Heterodera* (Abb. 2, 12.) (*H. schachtii* an Zuckerrübe) und *Globodera* (*G. rostochiensis* und *G. pallida* an Kartoffel) dar.

Die J2 sedentärer Nematoden dringen bis zum Zentralzylinder der Wurzel vor, um genau eine Pflanzenzelle (die sogenannte initiale Infektionszelle) zu infizieren (Wyss, 1992). Bereits wenige Stunden nach der Infektion (Gheysen & Fenoll, 2002) induzieren die Juvenilen ein gattungsspezifisches, komplexes Nährzellensystem, das ihrer Ernährung dient. Vom Mundstachel ausgehend bildet sich innerhalb von 24 Stunden ein Speichelröhrchen im Zytoplasma der initialen Infektionsstelle aus (Rumpfenhorst, 1984; Wyss & Grundler, 1992; Sobczak et al., 1999). Das kristalline Speichelröhrchen dient als molekulares Sieb zur selektiven Aufnahme von Nährstoffen (Razak & Evans, 1976; Davis et al., 2004). Mit Hilfe der Pumpkammer (Abb. 1) gelangt die Nährstofflösung über den Mundstachel in den Darm des Nematodens (Abb. 1). Schließlich fördern die Nährzellensysteme große Mengen pflanzlicher Nährstofflösung für die Ernährung des Parasiten und dienen als deren alleinige Nahrungsquelle (Kyndt et al., 2013). Verläuft die Induktion des Nährzellensystems nicht erfolgreich, wird die Juvenile sterben (Goverse et al., 2000). Das Nährzellensystem von Gallen- und Zystennematoden unterscheidet sich. Gallennematoden induzieren miteinander verbundene, mehrkernige und hypertrophierte Riesenzellen (Moens et al., 2009), währenddessen das von Zystennematoden induzierte Synzytium durch die Vereinigung des Protoplasmas vieler Zellen entsteht (Wyss & Zunke, 1986). Beide Nährzellensysteme besitzen die Eigenschaft der Hypertrophie und tragen mehrfache Zellkerne und eine erhöhte Anzahl an Zellorganellen (Wyss et al., 1992; Gheysen und Fenoll, 2002; Vanholme et al., 2004).

Die Nährzellensysteme entstehen durch (Re-)Differenzierung von Pflanzenzellen, die vom Nematoden gesteuert wird. In Folge der gattungsspezifischen (Re-)Differenzierung vergrößert sich die Membranoberfläche durch Ausstülpungen zum Xylem hin, wodurch der Import von Wasser und Nährstoffen aus dem Xylem

erleichtert wird. Zusätzliche Phloemzellen um die Nährzellensysteme verbessern die Versorgung der Nematoden mit Assimilaten (Hofmann & Grundler, 2007).

Die Parasitierung, begonnen bei der Penetration der Wurzel, über die Migration des Wurzelgewebes und schließlich der Infektion der Wurzel zur Induktion, Etablierung und Aufrechterhaltung des Nährzellensystems, wird durch die verschiedenen Sekrete des Nematodens gesteuert. Bei erfolgreicher Parasitierung kann der Lebenszyklus mit der Entwicklung von Adulten und der Produktion von Eiern abgeschlossen werden. Zysten und Gallen beschreiben die im Boden verbleibenden, eiträgenden Überdauerungsformen der Zysten- und Gallennematoden (Vanholme et al., 2004).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem **Rübenzystemnematoden** *Heterodera schachtii*, welcher der bedeutendste Schaderreger der **Zuckerrübe** (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) in Zentraleuropa ist (Müller, 1999).

Die Zuckerrübe

In Deutschland werden jährlich 3 Millionen Tonnen Zucker aus den Zuckerrüben von rund 29.500 landwirtschaftlichen Betrieben in 20 Zuckerrübenfabriken gewonnen (WVZ). Bis Anfang des 19. Jahrhunderts war der kostenaufwändig transportierte koloniale Zucker aus Zuckerrohr ein exotisches Genussmittel. Mitte des 18. Jahrhunderts begann unter Einfluss der Königlich Preußischen Akademie der Wissenschaften die Suche nach zuckerreichen mitteleuropäischen Kulturpflanzen, welche geeignet wären den Zucker aus Zuckerrohr zu ersetzen. Andreas Sigismund Marggraf (1709-1882) charakterisierte schließlich 1747 den weißen sowie roten Mangold (*Beta alba* und *B. rubra*) und die Zuckerwurzel (*Sisarum dodonae*) als besonders zuckerreich. Er erbrachte den Nachweis, dass Zucker aus einheimischen Pflanzen gewonnen werden kann und dieser die gleiche Beschaffenheit und Verwendungsfähigkeit wie der Rohrzucker aufweist. Sein Schüler Franz Carl Achard (1753-1821) züchtete aus den zuckerreichsten Runkelrüben durch Massenauslese die „weiße schlesische Rübe“ (*var. altissima*) mit einem

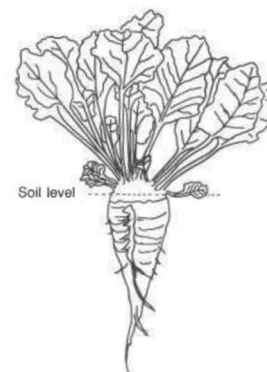


Abb. 3: Erntereife Zuckerrübe zu Ende des ersten Jahres. Elliott & Weston, 1993.

Zuckergehalt von 5%. 1801 errichtete er unter anderen mit finanzieller Unterstützung von König Friedrich Wilhelm II. die erste Rübenzuckerfabrik für die industrielle Zuckergewinnung in Kunern (Schlesien) (Kuster, 1998). Durch Züchtung liegt der Zuckergehalt heutiger Zuckerrüben bei 16-25%.

Die Zuckerrübe ist eine zweijährige Kultur. Nach der Aussaat im Frühjahr zum frühestmöglichen Zeitpunkt und der epigäischen Keimung folgt im ersten Jahr eine kontinuierliche Blattproduktion (Rosette). Als Folge der Einlagerung fotosynthetisch gebildeter Saccharose verdicken das Hypokotyl und der obere Teil der Pfahlwurzel bis zur Ausbildung eines Rübenkörpers (vegetative Phase) (Abb. 3). Durch die Ernte der Zuckerrüben zu Vegetationsende des ersten Jahres wird der Übergang in die generative Phase unterbunden.



Nach Vernalisation über den Winter würde die Rübe im zweiten Jahr in die generative Phase übergehen (Abb. 4). Mit Hilfe der in der Rübe eingelagerten Reservestoffe würde sich dann ein Samenträger mit

Abb. 4: Blühende Zuckerrübenpflanze im zweiten Jahr. Verändert nach Elliott & Weston, 1993.

zahlreichen, zweihäusigen unscheinbaren Blüten ausbilden (Elliott & Weston, 1993). Die Ernte der Zuckerrübe erfolgt mit der „technologischen Reife“ ab dem BBCH-Stadium 49 (Abb. 5), 180-220 Tage nach der Aussaat. Der Anteil des zu gewinnenden Zuckers wird durch die technische Qualität der Rübe bestimmt. Vor allem zu hohe Gehalte an α -Aminostickstoff, Kalium und Natrium wirken sich negativ auf den Ertrag des Rübenzuckers aus. Neben dem Masseertrag der geernteten Rübe ist deshalb besonders der bereinigte Zuckerertrag (BZE) von Interesse, um die Rübenqualität zu bestimmen.

Der Rübenzystennematode

Besonders in der Vergangenheit erfolgte der Zuckerrübenanbau in fabriknahen Gebieten, zudem in meist eng gestellten Fruchtfolgen. Dies förderte schon Mitte des 19. Jahrhunderts den für die Rübenmüdigkeit verantwortlichen, aber noch unbekanntem Wurzelparasiten.

1859 erkannte Hermann Schacht (1814-1864) (Franklin, 1951), dass den Wurzeln von an der Rübenmüdigkeit erkrankten Zuckerrüben stecknadelkopfgroße „weiße Pünktchen“ anhaften, in welchen er zahllose Eier vermutete. Diese „weißen Pünktchen“ konnten 1868 von Julius Kühn (1825-1910) als Nematodenweibchen und Ursache der Rübenmüdigkeit identifiziert werden. 1871 wurde dieser Nematode von Adolf Schmidt (1806-1889) zu Ehren Schachts in *Heterodera schachtii* benannt (Schmidt, 1871; Siddiqi et al., 2000).

Die Wurzelexsudate der Wirtspflanzen, insbesondere der Zuckerrübe, induzieren auf die in Eiern befindlichen J2 des **Rübenzystemnematoden** einen Schlupfreiz (Baunacke, 1922). Nach Erreichen der Zuckerrübenwurzel bewegen sich die J2 intrazellulär durch die Wurzel zum Zentralzylinder und hinterlassen in der Wurzelcortex einen nekrotisierten Penetrationsgang (Yu & Steele, 1981). Mit dem Auffinden einer geeigneten initialen Infektionszelle im Zentralzylinder der Wurzel und Induktion des Synzytiums werden die Nematoden schließlich sedentär. Die Ausbildung des Synzytiums wird durch die partielle Auflösung der Zellwände und die anschließende Verschmelzung benachbarter hochproduktiver Zellen realisiert (Wyss & Zunke, 1986). Schließlich kann das Synzytium aus etwa zweihundert verschmolzenen Einzelzellen bestehen (Jones, 1981).

Die Parasitierung wird durch verschiedene Sekrete des Nematodens ermöglicht. Die als Begleitzelle beschriebene Drüse produziert Sekrete, die über einen Amphiden-Kanal an die Kopfoberfläche gelangen (Abb. 1). Sie benetzen den Kopfbereich des Nematodens, und dienen bei der Penetration der Wurzel vermutlich als biochemischer Schutzfilm vor der Pflanzenabwehr (Bird & Bird, 1991). Aber auch über den Mundstachel abgegebene Speichelsekrete (der pharyngalen Drüsen) und über die Nematodenkutikula abgegebene Sekrete (der Hypodermis) verhelfen den J2 in die Wurzel vorzudringen (Vanholme et al., 2004). Bis zum Erreichen der initialen Infektionsstelle dominieren die Sekrete der subventralen Drüsen (Hussey, 1989), zu denen beispielsweise die an die Zellwand gerichtete Zellulasen und Pektinasen gehören (Smant et al., 1998; Davis et al., 2004). Die subventralen Drüsen werden im Alterungsprozess von *H. schachtii* reduziert (Hussey, 1989; Davis et al., 2004), währenddessen sich die dorsale Drüse ab der Induktion und Aufrechterhaltung des Synzytiums zunehmend vergrößert, was wesentlich zum Anschwellen der Juvenilen beiträgt (Hussey, 1989) (Abb. 5). Die Sekrete der dorsalen Drüse führen zu

metabolischen, proteomischen und transkriptomischen Veränderungen, die maßgeblich für die Ausbildung des Synzytiums verantwortlich sind (Davis et al., 2004).

Das Geschlecht von *H. schachtii* entwickelt sich in Abhängigkeit vom Ernährungsstatus (Stelter, 1963; Kämpfe & Kerstan, 1964; Müller et al., 1981). Für die Entwicklung zum Weibchen wird die etwa 29-fache Menge an Nährstoffen als für die Entwicklung zum Männchen benötigt (Müller et al., 1981). Deshalb ist das Synzytium eines Weibchens größer (Müller et al., 1981) und komplexer strukturiert (Sobczak et al., 1997). Wird der Rübenzystemematode also durch sein Synzytium ausreichend gut ernährt, schwillt er besonders stark an und entwickelt sich zu einem Weibchen (Ellenby, 1954; Stelter, 1963; Kämpfe & Kerstan, 1964). Nicht ausreichend ernährte Juvenile schwellen nur geringfügig an und verlassen mit der letzten Häutung die Wurzel als vermiformes und mobiles Männchen.

Die Reproduktion von *H. schachtii* erfolgt obligat sexuell. Während die angeschwollenen, weißen Weibchen weiterhin am Nährzellengewebe verankert bleiben, suchen die Männchen die aus der Wurzel herausragenden Hinterteile der Weibchen zur Fortpflanzung auf. Nach Befruchtung und Abschluss der Eientwicklung stirbt das Weibchen ab und ihre Körperhülle verfärbt sich braun und verhärtet sich zur Zyste (Abb. 5). Die stecknadelkopfgröße, zitronenförmige braune Zyste enthält hunderte Eier, die bis zu fünfzehn Jahre im Boden überdauern können (Kämpfe, 1952).

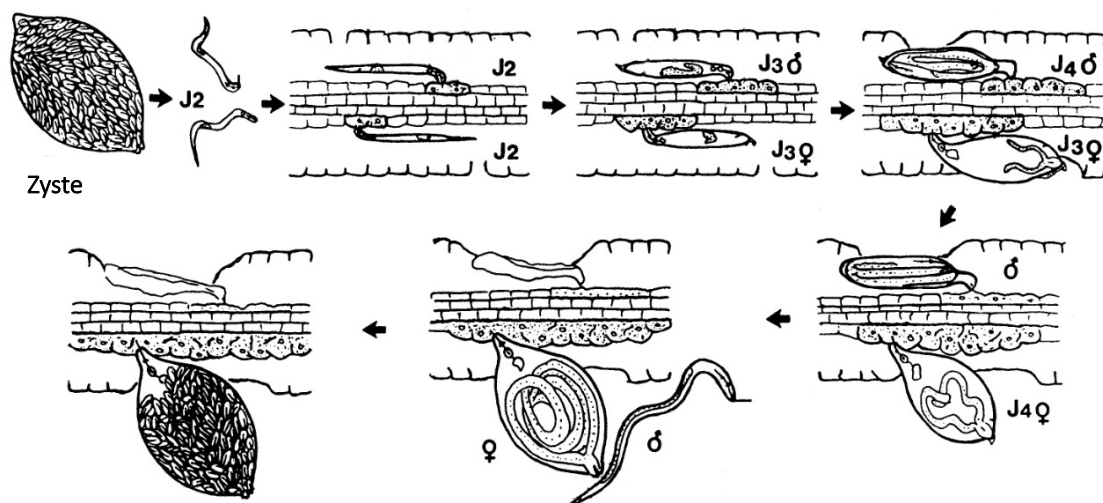


Abb. 5: Generationszyklus des Rübenzystematodens *Heterodera schachtii*, vom zweiten (J2), dritten (J3) und vierten (J4) Juvenilstadium bis zu den Adulttieren. Verändert nach Grundler, 1984.

Neben der Zuckerrübe (Gattung *Beta*, Familie *Chenopodiaceae*) können 80% der Arten aus den Familien *Chenopodiaceae* (Spinat, Mangold) und *Brassicaceae* (Senf, Raps, Kohl) durch den Rübenzystennematoden *H. schachtii* befallen werden. Auch einige Unkräuter, wie beispielsweise Gänsefuß, Vogelmiere, Ackerhellerkraut sowie der ampferblättrige Knöterich gelten als Wirtspflanzen (Jones, 1950). Die Infektion, die Etablierung des Synzytiums und die Anzahl produzierter Eier hängt von der jeweiligen Wirtspflanze ab (Grundler et al., 1991; Lelivelt & Hoogendoorn, 1993; Cai et al., 1997).

Da die Entwicklung von *H. schachtii* temperaturabhängig ist, kann die theoretische Anzahl an Generationen je Vegetationsperiode mit Hilfe der Temperatursumme berechnet werden. Dazu werden die Tagesmitteltemperaturen in 10 cm Bodentiefe über der für *H. schachtii* spezifischen Basistemperatur von 8°C (Kämpfe, 1952) aufsummiert. Für den Abschluss einer theoretischen Generation wird eine Temperatursumme von 464°C angenommen (Curi & Zmoray, 1966). In Südwestdeutschland sind im Mittel vier *H. schachtii*-Generationen je Vegetationsperiode möglich (Fischer & Reuther, 2015) (Abb. 6).

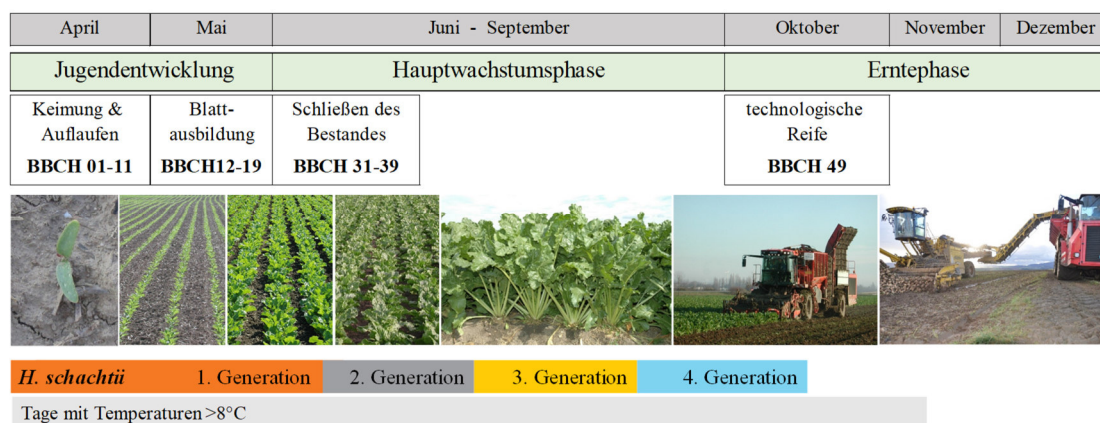


Abb. 6: Schema der Zuckerrübenentwicklung über die Vegetationsperiode und die Anzahl theoretisch abgeschlossener Generationen *Heterodera schachtii* (für 1 Generation wird eine benötigte Wärmesumme von 456°C, als Summe aller Tagesmitteltemperaturen >8°C, angenommen). Eigene Darstellung.

Das allgemeine **Schadbild**, welches durch *H. schachtii* an der Zuckerrübe verursacht wird, ist im Feld oft schwer von anderen Schadursachen zu differenzieren. Die älteren, äußeren Blätter vergilben und welken, währenddessen junge Blätter kleiner und

weniger grün nachgebildet werden (Kämpfe, 1952). Die heterogene Verteilung der Nematoden im Feld führt dazu, dass die Schadstellen meist nesterweise auftreten (Cooke, 1987). Durch den Befall mit Rübenzystennematoden kommt es zu Gewebeerstörungen in der Wurzel. Das Wachstum der Pfahlwurzel ist gehemmt und eine vermehrte Seitenwurzelbildung führt im schlimmsten Fall zur Ausbildung des sogenannten Wurzelbarts (Kämpfe, 1952; Moriarty, 1964). Die Ertragsverluste richten sich nach der Befallsstärke und können unter mitteleuropäischen Bedingungen bis zu 25% ausmachen (Müller, 1999).

Maßnahmen des Nematodenmanagements

Die jahrelange Überdauerungsfähigkeit der Eier im Boden macht eine Bekämpfung von *H. schachtii* im Feld nahezu unmöglich. Die Maßnahmen des Nematodenmanagements können aber dazu beitragen, den Befall im Feld zu reduzieren, sodass ein Zuckerrübenanbau weiterhin rentabel ist. Zur Eindämmung der Nematodenvermehrung wurden in der Vergangenheit überwiegend Nematizide angewandt. In Deutschland sind diese jedoch seit den 80er Jahren besonders aus ökotoxologischen Gründen nicht mehr zugelassen. Maßnahmen des Nematodenmanagements sind eine weitgestellte, mindestens dreijährige Fruchtfolge sowie der Anbau resistenter Zwischenfrüchte (resistenter Ölrettich und Senf) (Riggs & Schuster, 1998). Die Population mit *H. schachtii* kann jedoch nur bei gutem Aufwuchs mit einer genügend hohen Pflanzendichte durch resistente Zwischenfrüchte reduziert werden (Cooke, 1987). Seit dem Jahre 2000 existieren auch resistente Zuckerrübensorten, die auf Grund eines Resistenzgens die Entwicklung und Vermehrung von *H. schachtii* hemmen (Stelter, 1963; Cook & Evans, 1987; Holtmann et al. 2000).

Resistenzen gegenüber *H. schachtii* sind aus den drei Wildrüben der Sektion Procumbentes (*Patellifolia* (ehemals *Beta* (Scott et al., 1977) *procumbens*, *P. patellaris*, *P. webbiana*) bekannt (Jung & Wricke, 1987). *Hs1* und *Hs2* sind bekannte Resistenzgene aus *P. procumbens* (Lange et al., 1990; Cook & Evans, 1987; Jung et al., 1998), wohingegen *Hs3* aus *P. webbiana* stammt (Jung et al., 1998). Savitsky gelang es 1973 den resistenztragenden Chromosomenabschnitt aus *P. procumbens* ins Genom der Zuckerrübe (*B. vulgaris*) zu integrieren (Savitsky, 1977). Existierende resistente Zuckerrübensorten tragen die monogene

Resistenz durch HSI^{pro-1} (Kleine et al., 1995; Cai et al. 1997), die zu einem Eingriff in das Endomembransystem im Synzytium und dem Absterben der Juvenilen führt (Holtmann et al., 2000).

Im Gegensatz zu einer resistenten Sorte, ist die Entwicklung und Vermehrung von *H. schachtii* an einer anfälligen Sorte begünstigt (hohe Wirtseignung). So baut sich eine Ausgangspopulation durch den Anbau einer anfälligen Sorte über die Vegetationsperiode auf, während beim Anbau einer resistenten Sorte eine Reduktion der Ausgangspopulation im Boden erzielt wird (Cai et al., 1997; Holtmann et al., 2000).

Die existierenden anfälligen und resistenten Zuckerrübensorten reagieren empfindlich (nicht tolerant) auf den Befall mit Nematoden, das heißt, der Ertrag wird im Zuge des Nematodenbefalls reduziert. Besonders hohe Ertragseinbußen werden vor allem durch den Befall an anfälligen Sorten beobachtet. Mit dem Resistenzgen aus *P. procumbens* werden immer auch unerwünschte Merkmale (linkage drag) mit übertragen. Das ist der Grund weshalb resistente Sorten ein generell geringeres Ertragspotential und deshalb kaum Bedeutung im Anbau haben (Panella & Lewellen, 2007; Zhang et al., 2008). Seit 2003 existieren auch nematodentolerante Zuckerrübensorten auf dem Markt. Diese Sorten erzielen selbst unter Nematodenbefall stabile und sichere Erträge.

Tab. 1: Vierfeldertafel zur Beschreibung von anfälligen, resistenten und toleranten Zuckerrübensorten hinsichtlich ihrer möglichen Ertragsleistung unter *H. schachtii*-Befall und Wirtseignung (am Maß der Reproduktion) für *H. schachtii*. Verändert nach Cook, 1974.

		Ertrag	
		Hoch	Gering
Reproduktion von <i>H. schachtii</i>	Hoch	tolerant & anfällig	nicht tolerant & anfällig
	Gering	tolerant & resistent	nicht tolerant & resistent

Zusammengenommen, können die vorherrschenden Bezeichnungen der drei Genotypen (anfällig, resistent und tolerant) zwei verschiedenen Phänomenen zugeordnet werden. Während sich anfällig und resistent auf das Phänomen der

Wirtseignung beziehen, wird das Phänomen der Ertragsbildung unter Nematodenbefall durch tolerant (oder nicht tolerant) beschrieben. Die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der Wirtseignung und der Ertragsreaktion unter Befall von Zuckerrübensorten sind in der Vierfeldertafel dargestellt (Schafer, 1971; Cook, 1974; Trudgill, 1986) (Tab. 1). Es ist weitgehend unbekannt, inwieweit tolerante Sorten *H. schachtii* vermehren bzw. wie deren Wirtseignung für diesen Parasiten ist. Wie der Vierfeldertafel entnommen werden kann (Tab. 1), können tolerante Sorten theoretisch anfällig oder resistent gegenüber *H. schachtii* reagieren.

Wirtseignung toleranter Sorten

Es ist beschrieben, dass auch tolerante Zuckerrübensorten eine Resistenz gegen *H. schachtii* besitzen. Anders als bei den resistenten Zuckerrübenorten, bleiben die genetischen Hintergründe der aus *B. maritima* stammenden, vermutlich polygen wirkenden Resistenz (Heijbroek, 1977) in toleranten Zuckerrübensorten verborgen. Bisher ist nur HsBvm-1 als eines der Gene, das Resistenz in toleranten Zuckerrübensorten gegenüber *H. schachtii* vermittelt, charakterisiert wurden (Stevanato et al., 2014). Die Gefahr eines Resistenzbruches für polygen wirkende Resistenzen wird als sehr unwahrscheinlich eingestuft (Heijbroek, 1977), was einen Vorteil der Resistenz durch tolerante Sorten darstellen würde.

Bisher wurde die Wirtseignung toleranter Sorten im Feld nicht ausreichend untersucht. Nach den ersten Untersuchungsergebnissen des Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauerverbandes e.V. zu urteilen, ist es *H. schachtii* anders als an resistenten Sorten möglich sich an toleranten Sorten zu vermehren (Liesenfeld et al., 2014). Dies würde bedeuten, dass tolerante Sorten anfällig sind. Wenn die Reproduktion geringer als an der anfälligen Sorte wäre, könnte man die Wirtseignung toleranter Sorten als teilresistent bezeichnen (Van der Zaag, 1959; Parleviet & Van Ommeren, 1975). Die Wirtseignung nematodentoleranter Sorten anderer Kulturen (beispielsweise Kartoffel, Reis, Baumwolle) wird häufig als teilresistent bezeichnet. Eine wissenschaftliche und statistisch abgesicherte Untersuchung der *H. schachtii*-Reproduktion an aktuellen Zuckerrübensorten sowie eine Bewertung und Benennung der Wirtseignung toleranter Sorten für *H. schachtii* fehlt bisher.

Toleranz

Die Mechanismen die zur Toleranz in toleranten Zuckerrübensorten führen, sind noch unbekannt. Es wird allgemein vermutet, dass Toleranz gegenüber *H. schachtii* mit dem Ort der Synzytiuminduktion in der Wurzel, der Pflanzenphysiologie oder dem Wurzelwachstum zusammenhängen könnte.

Bei toleranten Sojasorten (Johnson et al., 1993) und einer toleranten Zuckerrübensorte (Gierth, 2005) wurden die Synzytien von Zystennematoden außerhalb des Zentralzylinders induziert, sodass der Wasser- und Nährstofffluss der Pflanze wahrscheinlich weniger beeinträchtigt wird als in anfälligen Sorten. Eine trotz des Befalls ungestörtere Wasser- und Nährstoffversorgung der Pflanze könnte den höheren Ertrag toleranter Sorten gegenüber anfälligen Sorten unter Befall erklären.

Aber auch physiologische Unterschiede der Sorten werden unter Befall erwartet. Durch berührungslose Techniken im Feld zeigte sich erst kürzlich, dass die Chlorophyll-, Stickstoff- und Wassergehalte verschiedener Zuckerrübenotypen unter Befall, positiv mit der Ausprägung der Toleranz korrelieren (Joalland et al., 2018). Nematodenbefall verursacht pflanzenphysiologischen Stress, der beispielsweise durch einen Anstieg der Abscisinsäuregehalte nachgewiesen werden kann. Erleidet eine Pflanze Stress, bewirkt die Abscisinsäure beispielsweise die Schließung der Stomata, was zu vermindertem Gasaustausch und geringerer Fotosyntheseleistung führt. Im Gegensatz zu anfälligen, zeigen beispielsweise tolerante Kartoffelsorten einen geringeren Anstieg dieses Hormons nach Nematodenbefall (Evans & Haydock, 1990). Verallgemeinert scheinen tolerante Pflanzen weniger Stress durch den Nematodenbefall zu erleiden als anfällige Sorten, was sich wiederum in einem größeren Wurzelsystem zeigen kann. So wird oft das Wurzelsystem toleranter Sorten vermutet für die Toleranz verantwortlich zu sein.

Stanton & Fisher (1988) fassten bereits mehrere Hypothesen zusammen, die die Toleranz gegenüber Nematoden durch besondere Eigenschaften des Wurzelsystems toleranter Kultursorten erklären sollen. Neben der Möglichkeit die Beschädigung des Wurzelsystems durch Nematoden mit Kompensationswachstum auszugleichen, wird auch ein tieferes Wurzelsystem unter Befall angenommen. Ein besonders ausgeprägtes Wurzelsystem soll zudem dazu verhelfen, die Beschädigung des Wurzelsystems zu tolerieren. Zudem könnten die Wurzeln toleranter Sorten durch den Befall mit Nematoden in ihrer Funktionalität weniger gestört sein.

Bisher konnte ein größeres Gesamtwurzelsystem für tolerante Kartoffelsorten (Evans & Haydock, 1990) und ein größeres Seitenwurzelsystem für tolerante Hafersorten (Volkmar, 1989) unter Nematodenbefall gezeigt werden. Das Wurzelsystem toleranter Zuckerrübensorten wurde bisher von Gierth (2005) unter Befall und von Wright et al. (2018) unter Nichtbefall untersucht. Während bei Gierth (2005) eine tolerante Sorte ein tiefer gehendes Wurzelsystem als eine anfällige Sorte aufwies, zeigten Wright et al. (2018) keine Unterschiede der Haupt- und Seitenwurzellänge von toleranten, anfälligen und resistenten Zuckerrübensorten. Ein größeres und tiefergehendes Wurzelsystem könnte den Ertragsvorteil toleranter Zuckerrübensorten unter Befall erklären.

Referenzen

- Baunacke, W. (1922): Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung des Rübenmagnetoden *Heterodera schachtii* Schmidt. Arb. Biol. Reichsanst. Land- und Forstwirtschaft. 11:185-288.
- Bird, A. F. (1979): Morphology and ultrastructure. In: Lamberti, F. & C.E. Taylor (eds). Rootknot Nematodes (*Melodogyne* species); Systematics, Biology and Control. Academic Press, London & New York. 59-84.
- Bird, A. F. & J. Bird (1991): The structure of nematodes. San Diego. Academic Press. 316.
- Cai, D.; Kleine, M.; Kifle, S.; Harloff, H.; Sandal, N. N.; Marcker, K. A.; Klein-Lankhorst, R. M.; Salentijn, E. M. J.; Lange, W.; Stiekema, W. J.; Wyss, U.; Grundler, F. M. W. & C. Jung (1997): Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275:832-834.
- Chitwood, D. J. (2003): Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. *Pest Management Science* 59:748-753.
- Chitwood, D. J. & R. N. Perry (2009): Reproduction, Physiology and Biochemistry. In: Perry, R.N., Moens, M. & J.L. Starr (eds.). Root-knot Nematodes. CAB International Publishing, Wallingford, UK. 182-200.
- Cook, R. (1974): Nature and inheritance of nematode resistance in cereals. *Journal of Nematology* 6(4):165-174.
- Cook, R. & K. Evans (1987): Resistance and Tolerance. In: Brown, R.H. & B.R. Kerry Principles and Practice of Nematode Control in Crops. Academic Press Australia 179-231.
- Cooke, D. A. (1987): Beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schmidt) and its control on sugar beet. *Agricultural Zoology Reviews* 2:135-183.

- Curi, J., & I. Zmoray (1966): Beziehung klimatischer Faktoren zur Entwicklungsdauer von *Heterodera schachtii* in der Slowakei (CSSR). *Helminthologia* (Bratisl.) 7:49-63.
- Davis, E. L.; Hussey, R. S. & T. J. Baum (2004): Getting to the roots of parasitism by Nematodes. *Trends in Parasitology* 20(3):134-141.
- Ellenby, C. (1954): Environmental determination of the sex ratio of a plant parasitic nematode. *Nature*, Lond. 174:1016-1017.
- Elliott, M. C. & G. D. Weston (1993): Biology and physiology of the sugar-beet plant. In: Cooke, D.A. & R.K. Scott. *The Sugar Beet Crop: Science into practice*. London: Chapman & Hall. Cambridge, University Press 37-65.
- Escobar, C.; Barcala, M.; Cabrera, J. & C. Fenoll (2015): Overview of Root-Knot Nematodes and Giant Cells. In: Escobar, C. & C. Fenoll. *Advances in Botanical Research, Plant Nematode Interactions: A View on Compatible Interrelationships*. Academic Press. 259-292.
- Evans, K. & P. P. J. Haydock (1990): A review of tolerance by potato plants of cyst nematode attack, with consideration of what factors may confer tolerance and methods of assaying and improving it in crops. *Ann. Appl. Biol.* 117:703-740.
- Fischer, J. & M. Reuther (2015): Nematoden-Management auf Witterung abstimmen. *dzz.* 4:24.
- Franklin, M. T. (1951): *The cyst-forming species of Heterodera*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal. UK. 147.
- Gheysen, G. & C. Fenoll (2002): Gene Expression in Nematode Feeding Sites, *Annual Review, Phytopathology*. 40:191-219.
- Gierth, K. (2005): Pflanzenmorphologische und -physiologische Untersuchungen zur Toleranz in der Wirt-Parasit-Interaktion *Beta vulgaris* - *Heterodera schachtii*. Dissertation. Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.
- Goverse, A.; Overmars, H.; Engelbertink, J.; Schots, A.; Bakker, J. & J. Helder (2000): Both induction and morphogenesis of cyst nematode feeding cells are mediated by auxin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1121-1129.
- Grundler, F. M. W. (1984): Untersuchungen zur Geschlechtsdetermination und Gonadenentwicklung bei *Heterodera schachtii* Schmidt. Diplomarbeit. Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Grundler, F.; Betka, M. & U. Wyss (1991): Influence of changes in the nurse cell system (syncytium) on sex determination and development of the cyst nematode *Heterodera schachtii*: total amounts of proteins and amino acids. *Phytopathology* 81(1):70-74.
- Heijbroek, W. (1977): Partial resistance of sugarbeet to beet cyst eelworm (*Heterodera schachtii* SCHM.). *Euphytica* 26:257-262.
- Hofmann, J. & F. M. W. Grundler (2007): How do nematodes get their sweets? Solute supply to sedentary plant-parasitic nematodes. *Nematology* 9(4):451-458.
- Holtmann, B.; Kleine, M. & F. M. W. Grundler (2000): Ultrastructure and anatomy of nematode-induced syncytia in roots of susceptible and resistant sugar beet. *Protoplasma* 211:39-50.
- Hussey, R. S. (1989): Disease-inducing secretions of plant-parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27:123-141.

- Joalland, S., Screpanti, C., Varella, H. V., Reuther, M., Schwind, M., Lang, C., Walter, A. & F. Liebisch (2018): Aerial and ground based sensing of tolerance to beet cyst nematode in sugar beet. *Remote Sensing* 10(787):1-21.
- Johnson, A. B.; Kim, K. S.; Riggs, R. D. & H. D. Scott (1993): Location of *Heterodera glycines*-induced syncytia in soybean as affected by soil water regimes. *Journal of Nematology* 25(3):422-426.
- Jones, F. G. W. (1950): Observation of the beet eelworm and other cyst-forming species of *Heterodera*. *Annals of Applied Biology* 37:407-440.
- Jones, M. G. K. (1981): The development and function of plant cells modified by endoparasitic nematodes. In: B.M. Zuckerman & R.A. Rohde, *Plant Parasitic Nematodes*. Academic Press, New York. 255–279.
- Jung, C. & G. Wricke (1987): Selection of Diploid Nematode-Resistant Sugar Beet from Monosic Addition Lines. *Plant Breeding* 98:205-214.
- Jung, C.; Cai, D. & M. Kleine (1998): Engineering nematode resistance in crop species. *Trends Plant Science* 3:266-271.
- Kämpfe, L. (1952): *Rüben- und Kartoffelälchen*. Akad: Verlagsgesellsch. Geest & Portig K.-G., Leipzig. 40.
- Kämpfe, L. & U. Kerstan (1964): Die Beeinflussung des Geschlechtsverhältnisses in der Gattung *Heterodera* Schmidt. *Nematologica* 10:388-398.
- Kleine, M.; Cai, D; Elbl, C.; Herrmann, R. G. & C. Jung (1995): Physical mapping and cloning of a translocation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) carrying a gene for nematode (*Heterodera schachtii*) resistance from *B. procumbens*, *Theor. Appl. Genet.* 90:399–406.
- Kuster, T. (1998): 500 Jahre kolonialer Rohrzucker – 250 Jahre europäischer Rübenzucker. *VSWG (Vierteljahrschrift für Sozial-und Wirtschaftsgeschichte)* 85(4):477-512.
- Kyndt, T.; Vieira, P.; Gheysen, G. & J. de Almeida-Engler (2013): Nematode feeding sites: unique organs in plant roots. *Planta* 238, 807–818.
- Lange, W.; Jung, C. & W. Heijbroek (1990): Transfer of beet cyst nematode resistance from *Beta* species to the section *Patellares* to cultivated beet. *Proceedings of the 53rd winter congress IIRB* 89-102.
- Lelivelt, C. L. C. & J. Hoogendoorn (1993): The development of juveniles of *Heterodera schachtii* in roots of resistant and susceptible genotypes of *Sinapis alba*, *Brassica napus*, *Raphanus sativus* and hybrids. *Neth. J. Pl. Path.* 99:13-22.
- Liesenfeld, S., Reuther, M., Bauer, H., Müller, K. & C. Lang, (2014): Wirkung verschiedener Zuckerrübensortentypen auf die Populationsdynamik von *Heterodera schachtii* in Südwestdeutschland. Posterbeitrag, Arbeitskreis Nematologie. 18.-19.03.2014. Görlitz.
- Moens, M.; Perry, R. N. & L. S. James (2009): Meloidogyne Species – a Diverse Group of Novel and Important Plant Parasites. In: Perry, R.N., Moens, M. & J.L. Starr (eds.). *Root-knot Nematodes*. CAB International Publishing, Wallingford, UK 182-200.
- Moriarty, F. (1964): The monoxenic culture of beet eelworm (*Heterodera schachtii* Schm.) on excised roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Parasitology* 54:289–293.

- Müller, J.; Rehbock, K. & U. Wyss (1981): Growth of *Heterodera schachtii* with remarks on amounts of food consumed. *Revue de Nématol.* 4:227-234.
- Müller, J. (1999): The economic importance of *Heterodera schachtii* in Europe. *Helminthologia* 36:205–213.
- Panella, L. & R. T. Lewellen (2007): Broadening the genetic base of sugar beet: introgression from wild relatives. *Euphytica* 154:383-400.
- Parleviet, J. E. & A. van Ommeren (1975): Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. II. Relationship between field trials, microplot tests and latent period. *Euphytica* 24:293-303.
- Razak, A. R. & A. A. F. Evans (1976): An intracellular tube associated with feeding by *Rotylenchulus reniformis* on cowpea root. *Nematologica* 22:182-189.
- Reuther, M. & C. Lang (2015): Nematoden: Wie gut sind tolerante Sorten? *top agrar* 10:60-63.
- Riggs, R. D. & R. P. Schuster (1998): Management. In: Sharma, S.B. *The Cyst Nematodes*. Dordrecht, Boston, London. Kluwer Academic Publisher 388-416.
- Rumpfenhorst, H. J. (1984): Intracellular feeding tubes associated with sedentary plant parasitic nematodes. *Nematologica* 30:77-85.
- Sasser, J. N. & D. W. Freckmann (1987): A world perspective on nematology: the role of society. In: J.A. Veech & D.W. Dickson, *Vistas on nematology*. Society of Nematologists, Hyattsville, Md. 7-14.
- Savitsky, H. (1977): Nematode (*Heterodera schachtii*) resistance and meiosis in diploid plants from interspecific *Beta vulgaris* x *B. procumbens* hybrids. *Can. J. Genet. Cytol.* 20:177-186.
- Schafer, J. F. (1971): Tolerance to plant disease. *Ann. Rev. Phytopath.* 9: 235-225.
- Schmidt, A. (1871) Über den Rüben-Nematoden. *Zeitschrift Ver. Rübenzuckerindustrie Zollver.* 21:1-19.
- Scott A.J.; Ford-Lloyd, B. V. & J. T. Williams (1977): *Patellifolia, nomen novum (Chenopodiaceae)*. In: *Taxon.* 26:284.
- Sembdner, G. (1968): Biochemische Aspekte der parasitären Wechselbeziehungen zwischen Nematoden (*Heterodera* A. Schmidt, 1871 und *Meloidogyne* Goeldi, 1887) und Pflanzengewebe. *Genetic Resources and Crop Evolution* 16(1):173-187.
- Siddiqi, M. R. (2000): *Tylenchida: parasites of plants and insects*. Wallingford, UK, CABI Publishing. 804.
- Smant, G.; Stokkermans, J.P.W.G.; Yan, Y.; De Boer, J.M.; Baum, T.J.; Wang, X.; Hussey, R.S.; Gommers, F.J.; Henrissat, B.; Davis, E.L.; Helder, J.; Schots, A. & J. Bakker (1998): Endogenous cellulases in animals: Isolation of β -1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:4906-4911.
- Sobczak, M. J.; Golinowski, W. & F. M. W. Grundler (1997): Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* roots induced during development of males of the plant parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *European Journal of Plant Pathology.* 103:113-124.
- Sobczak, M. J.; Golinowski, W. & F. M. W. Grundler (1999): Ultrastructure of feeding plugs and feeding tubes formed by *Heterodera schachtii*. *Nematology* 1:363-374.

- Stanton, J. M. & J. M. Fisher (1988): Factors of early growth associated with tolerance of wheat to *Heterodera avenae*. *Nematologica* 43:188-197.
- Stelter, H. (1963): Die Vermehrung der Rasse B des Kartoffelnematoden, *Heterodera rostochiensis* Woll., an der A-anfälligen Sorte Aquila und der A-resistenten Sorte Spekula. *Nematologica* 9:237-240.
- Stevanato, P.; Trebbi, D.; Panella, L.; Richardson, K.; Broccanello, C.; Pakish, L.; Fenwick, A. L. & M. Saccomani (2014): Identification and Validation of a SNP Marker Linked to the Gene HsBvm-1 for Nematode Resistance in Sugar Beet. *Plant Mol Biol Rep.* 33, 474–479.
- Trudgill, D. L (1986): Concepts of resistance, tolerance and susceptibility in relation to cyst nematodes. In: Lamberti, F. & C. E. Taylor. *Cyst Nematodes*. New York and London Plenum Press. 179-187.
- Van der Zaag, D. E. (1959): Some observations on breeding for resistance to *Phytophthora infestans*. *Eur. Potato Journal* 2(4):278-286.
- Vanholme, B.; De Meutter, J.; Tytgat, T.; Van Montagu, M.; Coomans, A. & G. Gheysena (2004): Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. *Gene* 332:13-27.
- Volkmar, K. M. (1991): Nematode tolerance increase drought stress in young oat plants. *Nematologica* 37:304-311.
- Wright, A. J. D.; Bussell, J. S.; Stevens, M.; Back, M. A. & D. L. Sparkes (2018). Physiological differences between sugar beet varieties susceptible, tolerant or resistant to the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii* (Schmidt) under uninfested conditions. *European Journal of Agronomy* 98:37-45.
- WVZ Wirtschaftliche Vereinigung Zucker e.V. / Verein der Zuckerindustrie. e.V.
<http://www.zuckerverbaende.de/zuckermarkt/zahlen-und-fakten/zuckermarkt-deutschland/ruebenanbau-zuckererzeugung.html> [15.02.2017]
- Wyss, U. (1992): Observations on the feeding behaviour of *Heterodera schachtii* throughout development, including events during moulting. *Fundam. Appl. Nematol.* 15(1):75-89.
- Wyss, U. & F. M. W Grundler (1992): Feeding behavior of sedentary plant parasitic nematodes. *Neth. J. Pl. Path.* 98(2):165-173.
- Wyss, U. & U. Zunke (1986): Observations on the behaviour of second stage juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. *Revue Nématol.* 9(2):153-165.
- Wyss, U. (1997): Root parasitic nematodes: an overview. In: Fenoll, C; Grundler, F.M.W. & S.A. Ohl, *Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions*. Kluwer Acad. Publisher. Dordrecht, Boston & London 5–22.
- Yu, M. H. & A. E. Steele (1981): Host-Parasite Interaction of Resistant Sugarbeet and *Heterodera schachtii*. *Journal of Nematology* 13(2):206-212.
- Zhang, C. L.; Xu, D. C.; Jiang, X. C.; Zhou, Y.; Cui, J.; Zhang, C. X.; Chen, D. F.; Fowler, M. R.; Elliott, M. C.; Scott, N. W.; Dewar, A. M. & A. Slater (2008): Genetic approaches to sustainable pest management in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Ann. Appl. Biol.* 152 (2), 143–156.

Kapitel 2: Hintergrund und Zielsetzungen des Projektes

Die vorliegende Dissertation zur Charakterisierung der Wirtseignung toleranter Zuckerrübensorten für den Rübenzystemnematoden *Heterodera schachtii* wurde im Rahmen des Projektes „Zukunft Zuckerrübe“ beim **Verband der Hessisch Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V.** (Verband) und dem Institut für Molekulare Phytomedizin an der **Rheinischen Friedrich-Wilhelm Universität Bonn** verfasst.

Der Verband betreut den Zuckerrübenanbau in den Regionen Rheinhessen, Pfalz und Südhessen. 50 der 67 Agenturen des Verbandgebietes (regionale Strukturen des Verbandes) beteiligten sich in einem 2016 durchgeführten Monitoring des Nematodenbefalls in der Region. Es zeigte sich, dass mehr als die Hälfte aller Agenturen auf über 80% ihrer Flächen Befall mit *H. schachtii* aufweisen (Abb. 8). Dies verdeutlicht, dass der Rübenzystemnematode der Hauptschädling der Zuckerrübe in Südwestdeutschland ist. In der Region wäre der Anbau von resistenten Zwischenfrüchten auf Grund der trockenen Witterung nur durch künstliche Bewässerung zu realisieren.

Durch die Verfügbarkeit toleranter Sorten (seit 2003) kann der Ertrag auf mit *H. schachtii* befallenen Flächen gesichert werden. In der Region nimmt der Anbau dieser Sorten stark zu (Abb. 7). Regionen mit einem hohen Anteil befallener Flächen profitieren besonders durch den Anbau toleranter Sorten. Das Ertragspotential des Standorts und die Wirtschaftlichkeit des Rübenanbaus können somit bereits auf über 80% Rübenanbaufläche im Verbandsgebiet durch tolerantes Saatgut gesichert werden (Abb. 7).

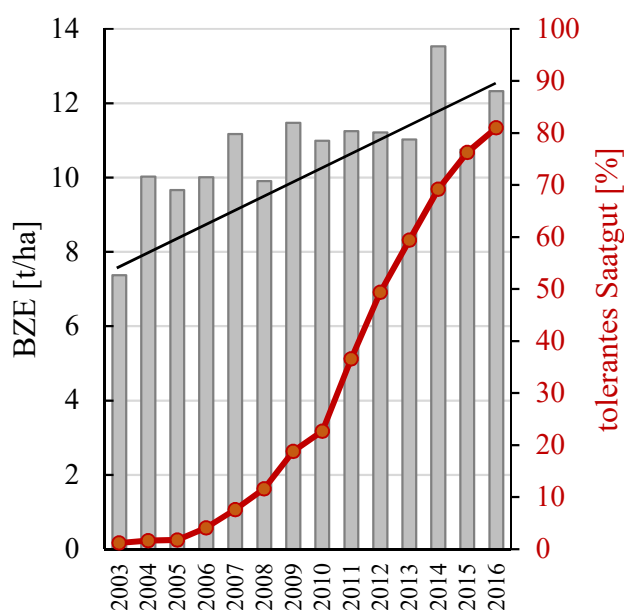


Abb. 7: Im Verbandsgebiet erzielter jährlicher Bereinigter Zuckerertrag (BZE) bei jährlich ansteigendem Einsatz toleranten Saatgutes. Schütthelm, persönliche Mitteilung, 2017.

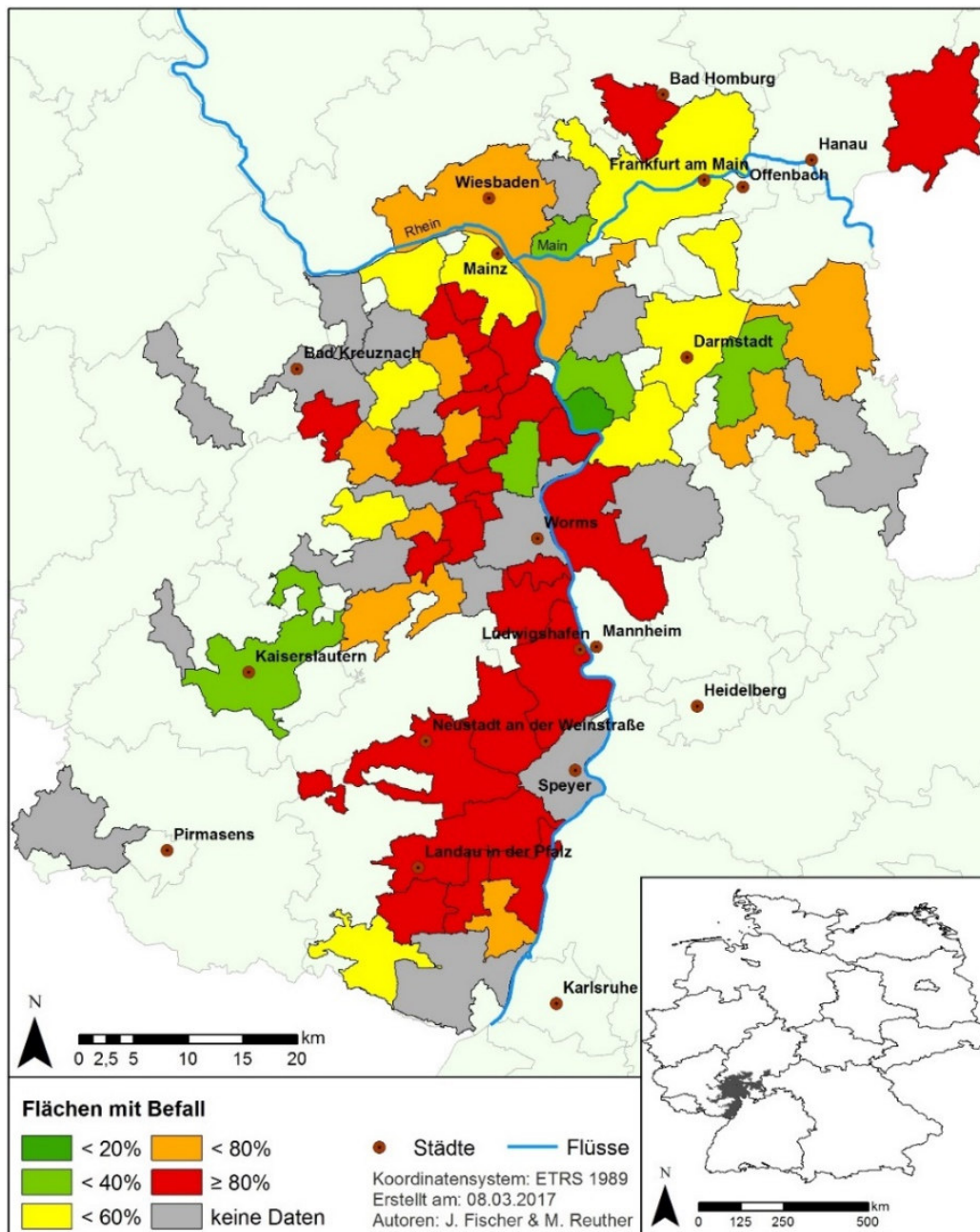


Abb. 8: Anteil der mit *H. schachtii* befallenen Flächen je Agentur des Verbandsgebietes (markierte Flächen in Rheinland-Pfalz und Hessen). Verändert nach Fischer, 2016.

Im Jahre 2016 waren bereits 19 tolerante Zuckerrübensorten gegenüber *H. schachtii* zugelassen (BSA, Bundessortenliste 2016). Um als neue tolerante Sorte zugelassen zu werden, ist nur die Ertragsleistung nicht aber die Höhe der *H. schachtii*-Reproduktion durch eine Sorte entscheidend. Im Gegensatz dazu besteht für eine neue resistente Sorte ein Resistenztest, in dem nachgewiesen werden muss, dass keine Reproduktion

des Parasiten stattfindet. Die eher niedrig einzustufende Ertragsleistung resistenter Sorten rückt für die Sortenzulassung in den Hintergrund.

Um einen nachhaltigen Zuckerrübenanbau zu gewährleisten, sollte es für Regionen mit Rübenzystennematoden von höchstem Interesse sein, die Höhe der *H. schachtii*-Reproduktion (Wirtseignung) durch eine Sorte zu kennen. Die Untersuchung und Charakterisierung der Wirtseignung toleranter Zuckerrübensorten für *H. schachtii* soll Gegenstand dieser Arbeit sein. Auf der Suche nach Hinweisen für die Mechanismen von Anfälligkeit, Resistenz und Toleranz soll auch das Wurzelsystem verschiedener Zuckerrübensorten mit und ohne *H. schachtii*-Befall verglichen werden. In dieser Arbeit wurde den folgenden drei Versuchsansätzen nachgegangen.

1. Feldversuch: Charakterisierung der Reproduktionsrate

Durch einen ersten Versuchsansatz im Feld wurde die Reproduktionsrate von *H. schachtii* an fünf toleranten Sorten im Vergleich zu einer anfälligen und einer resistenten Sorte in den Sortenversuchen-Nematoden im Verbandsgebiet in den Jahren 2013 bis 2015 untersucht. Dabei soll die Wirtseignung toleranter Sorten charakterisiert werden, um die Frage zu beantworten, ob tolerante Sorten anfällig oder resistent gegenüber *H. schachtii* reagieren. Zudem soll das Risiko der Schädlingsvermehrung und die Anbaueignung toleranter Sorten im Vergleich zu anfälligen und resistenten Sorten bewertet werden.

Die Sortenversuche wurden von der Arbeitsgemeinschaft Zuckerrübe Südwest auf Befallsstandorten angelegt. Die Untersuchung der *H. schachtii*-Reproduktion an den verschiedenen Sorten gelang durch eine parzellengenaue Bodenprobenentnahme und der anschließenden Nematodenanalyse aus den Bodenproben.

Die Bodenprobenentnahme und Nematodenanalyse erfolgte zur Bestimmung des Ausgangsbefalls zum Zeitpunkt der Aussaat (P_i - *population initial*) und zur Bestimmung des Endbefalls zum Zeitpunkt der Ernte (P_f - *population final*). Aus dem Quotienten konnte schließlich die an den einzelnen Zuckerrübensorten verursachte Reproduktionsrate P_f/P_i von *H. schachtii* ermittelt werden (Oostenbrink, 1968).

Da die Wurzeln der Zuckerrübe bis zu zwei Meter tief in den Boden reichen können (Elliott & Weston, 1993), ist davon auszugehen, dass *H. schachtii* bis mindestens zu dieser Bodentiefe vorkommt. Mittels eines maschinellen Bodenprobennahmegerätes

(Nietfeld, DUOPROB 60-UP, Quakenbrück, Deutschland) konnte der *H. schachtii*-Befall bis zur Bodentiefe von 60cm analysiert werden. Dies bedeutet einen technischen und analytischen Mehraufwand, aber auch höheren Kenntnissgewinn gegenüber der praxisüblichen Beprobung bis zur Bodentiefe von 30cm.

Zur Bestimmung des Befalls wurde im Labor des Verbands die Acetox-Schlupftest-Methode (Große et al., 1985; Große & Decker, 1989) verwendet, bei der die chemisch (Acetoxy-2-ethylhexa-1,3-dien, 2% in Aceton) zum Schlüpfen angeregten J2 aus der Bodenprobe extrahiert und durch Auszählen erfasst werden.

2. *In vitro*-Versuch: Untersuchung des Lebenszyklus von *H. schachtii*

Ein zweiter Versuchsansatz erlaubte die Beobachtung der Entwicklung von *H. schachtii* von der Infektion bis zur Zystenbildung in Abhängigkeit des Genotyps (anfällig, tolerant, resistent) in *in vitro*-Kultur. Die Untersuchung wurde am Institut für Molekulare Phytomedizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelm Universität Bonn durchgeführt. Dabei wurde der in der Arbeitsgruppe verwendete infection assay mit der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* für die Zuckerrübe weiterentwickelt. Durch *in vitro*-Kultur in Petrischalen mit transparentem Nährmedium konnte die Entwicklung einer kompletten Generation von *H. schachtii* an den verschiedenen Genotypen am Stereomikroskop beobachtet werden. Dadurch soll erstmals die Entwicklung von *H. schachtii* an einer toleranten Zuckerrübensorte beschrieben werden.

3. Gewächshausversuch: Phänotypisierung von Wurzelparametern unter Nichtbefall und *H. schachtii*-Befall

Ein dritter Versuchsansatz im Gewächshaus thematisierte die vergleichende Phänotypisierung des Wurzelsystems der verschiedenen Genotypen unter Nichtbefall bzw. unter Befall. In Kooperation mit dem Forschungszentrum Jülich (IBG-2) wurden die verschiedenen Genotypen in Rhizotrongefäßen angezogen. Rhizotrone erlauben der Pflanze tiefer zu wurzeln (hier 60 cm) als in üblichen Pflanzgefäßen. Da die Wurzeln entlang der transparenten Rhizotronwand wachsen, war eine nicht destruktive Phänotypisierung des Wurzelsystems zu mehreren Zeitpunkten möglich.

Verschiedene Wurzelwachstumsparameter sollten analysiert werden, um herauszufinden, ob diese im Jungpflanzenstadium durch *H. schachtii* beeinflusst

werden. Da Wurzeln schnell auf sich ändernde Umweltbedingungen reagieren, sollten sich Wurzelparameter, wie beispielsweise die Wurzellänge oder Wurzelsystemtiefe, als Indikatoren eignen (Nagel et al., 2006; Walter & Nagel, 2006; Mühlich et al., 2008), einen Befall mit dem Wurzelparasiten *H. schachtii* anzuzeigen. In dieser Arbeit sollten sortenspezifische Wurzelparameter untersucht werden, die bereits im Jungpflanzenstadium Hinweise auf die Mechanismen von Anfälligkeit, Toleranz und Resistenz liefern könnten.

Referenzen

- BSA Bundessortenamt. Beschreibende Sortenliste 2016
https://www.bundessortenamt.de/internet30/fileadmin/Files/PDF/bsl_getreide_2016.pdf
 [16.02.2017]
- Große, E.; Banasiak, L.; Lyr, H. & M. Jock (1985): Neuer Labortest zum Nachweis des Rübennematoden (*Heterodera schachtii*). Nachr. -Bl. Pflanzenschutz DDR 39:111-112
- Große, E. & H. Decker (1989): Untersuchungen zur Eignung von Biotest und Schlupftest für den quantitativen Nachweis des Rübenezystenälchen (*Heterodera schachtii*) in Bodenproben. Nachr. -Bl. Pflanzenschutz DDR 43:227-230
- Mühlich, M.; Truhn, D.; Nagel, K. A.; Walter, A.; Scharr, H. & T. Aach (2008): Measuring plant root growth. In: Pattern Recognition: 30th DAGM Symposium, Munich, Germany, June 2008 Proceedings, Lect. Notes Comput. Sci. 5096 (Ed. Rigoll, G.) Berlin, Springer. 497–506.
- Nagel, K. A.; Schurr, U. & A. Walter (2006): Dynamics of root growth stimulation in *Nicotiana tabacum* in increasing light intensity. Plant Cell Environ 29:1936–1945.
- Schütthelm, V. (2017) Persönliche Mitteilung. Südzucker AG.
- Walter, A. & K. A. Nagel (2006): Root growth reacts rapidly and more pronounced than shoot growth towards increasing light intensity in tobacco seedlings. Plant Signaling & Behavior 1(5):225–226.

Kapitel 3:

Nematode-tolerant sugar beet varieties - resistant or susceptible to the Beet Cyst Nematode *Heterodera schachtii*?

Marie Reuther^{1,2}, Christian Lang¹, Florian M.W. Grundler^{2,*}

¹ Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V., Rathenaustraße 10,
67547 Worms

² INRES-Molekulare Phytomedizin, Karlrobert-Kreiten Straße 13, 53113 Bonn

* grundler@uni-bonn.de

Eingereicht am 17. Februar 2017;

Erschienen am 28. April 2017 SugarIndustry

Marie Reuther, Christian Lang, Florian M.W. Grundler

Nematode-tolerant sugar beet varieties – resistant or susceptible to the Beet Cyst Nematode *Heterodera schachtii*?

Nematoden-tolerante Zuckerrübensorten – resistent oder anfällig gegenüber dem Rübenzystennematoden *Heterodera schachtii*?

The beet cyst nematode *Heterodera schachtii* (BCN) is an important parasite compromising yield of sugar beet. Standard sugar beet varieties are susceptible to BCN and strongly support BCN reproduction. Another type of variety is resistant to BCN. Although resistance leads to reduced nematode infestation levels, the yield potential of available resistant varieties is low. Tolerant varieties form a third type; high yield is produced with and without BCN infestation. However, so far it has remained unknown whether tolerant sugar beet varieties support or reduce BCN infestation and reproduction under field conditions. In order to address this question, the impact of five tolerant beet varieties on BCN population levels was investigated at 15 locations during a period of three years and compared to a resistant and a susceptible variety. The results demonstrate that all tolerant varieties led to population levels that ranged between that of the susceptible and that of the resistant variety. According to the respective BCN reproduction, the different varieties were classified as moderately susceptible (MS) or highly susceptible (HS) or as moderately resistant (MR) or highly resistant (HR). Tolerant varieties differed in their host status but tended to respond moderately resistant. In conclusion, it is suggested to include the analysis of resistance level either in the official registration procedure for BCN-tolerant sugar beet varieties or to perform this analysis for all registered varieties as a kind of risk assessment.

Der Rübenzystennematode *Heterodera schachtii* ist ein bedeutender Schädling an der Zuckerrübe, der zu erheblichen Ertragsverlusten führen kann. Standardsorten der Zuckerrübe sind anfällig gegenüber *H. schachtii*. Sie lassen die Entwicklung und Vermehrung des Parasiten zu, sodass beim Anbau einer anfälligen Sorte die Ausgangspopulation über die Vegetationsperiode aufgebaut wird. Demgegenüber stehen resistente Sorten, welche aufgrund eines Resistenzgens die Reproduktion von *H. schachtii* hemmen, wodurch eine Reduktion der Ausgangspopulation erzielt werden kann. Jedoch haben sie aufgrund ihres geringen Ertrags bisher keine Anbaubedeutung erlangt. Durch den Einsatz toleranter Sorten können hingegen höchste Erträge unter Befall erzielt werden. Toleranz beschreibt also das Ertragspotenzial unter Nematodenbefall, aber grundsätzlich nicht die Wirtseignung gegenüber *H. schachtii*. Um die Frage zu beantworten, ob tolerante Sorten eher anfällig oder resistent gegenüber *H. schachtii* reagieren, wurde die Reproduktion von *H. schachtii* an fünf toleranten Sorten im Vergleich zu einer anfälligen und einer resistenten Sorte dreijährig an insgesamt 15 Standorten im Feld untersucht. Die Wirtseignung toleranter Sorten ist gegenüber der anfälligen Sorte reduziert und gegenüber der resistenten Sorte erhöht. Zudem wurde erstmals gezeigt, dass tolerante Sorten auch Unterschiede in der Wirtseignung gegenüber *H. schachtii* aufweisen können. Basierend auf den Ergebnissen wird eine Klassifizierung der Wirtseignung vorgeschlagen, bei welcher resistent wirkende Sorten in hoch und moderat resistent (HR bzw. MR), und anfällig wirkende Sorten in hoch und moderat anfällig (HS bzw. MS) unterteilt werden. Die meisten toleranten Sorten zeigen eine moderat resistente Wirtseignung. Die Untersuchung der Resistenz toleranter Sorten sollte Bestandteil im Sortenzulassungsverfahren werden. Mindestens sollten bereits registrierte Sorten für ein Risikomanagement untersucht werden, um einen nachhaltigen Zuckerrübenanbau zu gewährleisten.

Key words: reproduction rate, pf/π , pf , π , partial resistance

Schlagwörter: Vermehrungsrate, Pf/Pi -Wert, Pf , Pi , Teilresistenz

1 Introduction

The beet cyst nematode *Heterodera schachtii* (BCN) is a major problem in all sugar beet growing regions, since it can cause serious yield reduction (Müller, 1999). Shoot symptoms are yellowing and reversibly wilting leaves, whereas infested root systems are often malformed and exhibit proliferation of secondary roots (Kämpfe, 1952).

Roots of sugar beet release exudates, which induce activation and hatching of second stage infective juveniles (J2) resting in the cysts. After hatching, J2 move towards the host roots which they penetrate in the region behind the root tip. After invasion, they migrate through the root tissue until they reach the vascular cylinder. There, they initiate a feeding site that consists of modified plant cells merged to a syncytium by partial cell wall dissolutions (Wyss and Zunke, 1986). A set of

molecules including effector proteins and plant hormones are secreted by the nematodes into the host tissues to aid syncytium formation (Siddique et al., 2015; Gardner et al., 2015). Plant defense responses are either strongly suppressed or overcome during syncytium formation (Holbein et al., 2016). Once the feeding site is established, the juveniles lose the ability of locomotion, become sedentary and remain in the root. After three molts they reach the adult stage.

The sex of J2 is not genetically determined but depends on environmental factors; favorable conditions in susceptible host-plants promote female formation, whereas adverse conditions in resistant hosts support development of males (Ellenby, 1954; Stelster, 1963; Kämpfe and Kerstan, 1964). The enlarged bodies of the lemon-shaped females brake through the root cortex, but remain attached to the feeding site, whereas the vermiform adult males leave the roots searching for females to mate with. After fertilization, several hundred eggs develop inside the female body. The cuticles of dying females form durable cysts protecting the eggs from environmental impacts. The embryos develop to J2s within the eggs, but remain within the cysts and may stay viable for more than 10 years (Kämpfe, 1952).

BCN usually completes two to three (Müller, 1979), under favorable conditions even four generations per year (Daub and Westphal, 2012). The number of generations correlates with the sum of temperatures above 8 °C basic temperature (Hallmann et al., 2009). Fischer and Reuther (2015) confirmed that BCN mostly completed four generations per year in the relatively warm and dry region of Southwest Germany.

Since chemical control of BCN is not permitted in Europe, crop rotation and catch crop cultivation with BCN-resistant oilseed radish and mustard are favored. However, in relatively warm and dry regions, catch crop cultivation is limited by the lack of precipitation during late summer and autumn. Crop rotation with breaks of more than four years between sugar beet cultivation is usually not performed for economic reasons. Consequently, nematode management mostly relies on the availability and use of adequate sugar beet varieties.

Currently, there are three types of sugar beet varieties, which are referred to as susceptible, resistant and tolerant, respectively. Susceptible varieties do not possess resistance against BCN and therefore support high BCN reproduction rates (Müller, 1989). The yield of susceptible varieties is usually high but strongly decreases under BCN infestation. Resistant plants are infected by BCN but do not support female development; mostly males are able to reach the adult stage (Stelster, 1963; Kämpfe and Kerstan, 1964). Therefore, they restrict BCN reproduction. The available resistant varieties have a generally lower yield level and perform weaker compared to the susceptible varieties. However, their cultivation reduces the infestation level in contaminated soil through the activation of resting J2 and the inhibition of female formation. As a matter of fact, susceptible and resistant varieties are not tolerant to infection by BCN (Trudgill, 1986; Cook and Evans, 1987). The third type, tolerant varieties, exhibits yield levels that are at least comparable with susceptible varieties (Anon., 2016). Through so far unknown mechanisms, they perform well regardless of whether they are infected or not infected by BCN. Although purchase costs of seeds are relatively high,

farmers tend to grow tolerant varieties since they minimize the risks of yield losses due to BCN. So far it is not known, whether tolerant varieties support or reduce nematode reproduction and therefore increase or reduce BCN infestation of soils.

BCN levels are usually determined by counting the number of J2s in defined soil samples. In order to analyze the host status of a crop variety, BCN infestation levels are determined before and after culturing sugar beet. In this way, an initial population level (π) and a final population level (ρ) are established. Dividing ρ by π results in the reproduction rate ρ/π (Oostenbrink, 1966), which reflects the capacity of a crop variety to multiply or reduce a given initial population. Values above “1” indicate nematode reproduction through a crop variety; the variety is designated as “susceptible”. Values below “1” indicate nematode reduction through a crop variety; it is designated as “resistant”. This concept of resistance differs considerably from the definition of resistance against e.g. microbial pathogens, which is based on the actual response of a host and the effect on the pathogen (Caldwell et al., 1958; Schafer, 1971; Trudgill, 1986).

Monogenetic nematode resistance is known from wild relatives *Patellifolia* (formerly *Beta* [Scott et al., 1977]) *procumbens*, *P. webbiana* and *P. patellaris* (Jung and Wricke, 1987), whereas polygenetic nematode resistance is known from *B. maritima* (Heijbroek, 1977). *Hs1* and *Hs2* are two known resistance genes originating from *P. procumbens* (Lange et al., 1990; Cook and Evans, 1987; Jung et al., 1998), *Hs3* originates from *P. webbiana* (Jung et al., 1998). Tolerant sugar beet varieties contain *P. webbiana* background, whereas resistant varieties and their accessions result from successful transmission of resistance gene (*HS 1^{pro-1}*) from *P. procumbens* into *B. vulgaris* (Savitsky, 1977; Kleine et al., 1995; Cai et al., 1997).

According to the official German seed registration, successful candidate varieties for registration have to have improved traits. Generally “yield” is the main trait that has to be improved. However, additional traits such as specific resistance to a pathogen can also be considered as an improvement. In this way, currently existing varieties with resistance to BCN have been registered. According to Müller (1989), resistant varieties should reach ρ/π values <1 in standardized official trials. These trials are presently performed in pot cultures under greenhouse conditions. Five plants are grown in 1.5 L pots filled with standard soil infested with about 1000 eggs and juveniles per 100 g of soil. Plants are grown until an accumulated temperature of 465 °C (>10 °C basic soil temperature). A susceptible variety is used as control. Two weeks after termination of the trial, ρ/π value is analyzed from a subsample of 800 g of soil (out of three pots representing one replication). A variety is approved as resistant when the ρ/π value is <1 in four replications (M. Daub, personal communication).

Tolerant varieties were registered due to higher yield with BCN infection compared to standard susceptible varieties. BCN-tolerant varieties may either be susceptible or resistant, but this trait is currently not tested, neither during the official registration procedure nor after registration. Accordingly, there is no standardized procedure to determine the host status of tolerant sugar beet varieties. Therefore it has remained

unknown, whether tolerant varieties promote or reduce BCN development.

Here, it is reported on field trials that were conducted in South-west Germany to investigate the host status on five tolerant sugar beet varieties (BTS 440, Kleist, Kristallina, Lisanna, Vasco) in comparison to a resistant (Nemata) and a susceptible (Beretta) variety. The analyses are based on pf/pi values that were calculated from soil samples taken from the top soil level at 0–30 cm and from the subsoil level at 30–60 cm.

2 Material and methods

2.1 Plant material

Five different tolerant varieties (BTS 440, Kleist, Kristallina KWS, Lisanna KWS, Vasco) were tested and compared to a susceptible (Beretta) and a resistant (Nemata) variety (Table 1). Kristallina KWS and Lisanna KWS will be short-named in the following as Kristallina and Lisanna.

Variety	Year of approval	Breeder	Host status	Effect on yield
Beretta	2006	KWS Saat AG	susceptible	sensitive
Kleist	2012	Strube Co.KG	?	tolerant
Kristallina KWS	2011	KWS Saat AG	?	tolerant
Lisanna KWS	2013	KWS Saat AG	?	tolerant
Vasco	2013	SESVanderHave	?	tolerant
BTS 440	2013	Betaseed GmbH	?	tolerant
Nemata	2010	Syngenta Seeds	resistant	sensitive

2.2 Experimental design

Different sugar beet varieties (Table 1) were randomized in block design with 4 replications at 15 locations during a period of three years (5 in 2013, 6 in 2014 and 4 in 2015) (Table 2). The field trials were performed by Arbeitsgemeinschaft für Versuchswesen und Beratung im Zuckerrübenanbau Südwest (ARGE Zuckerrübe Südwest) and Arbeitsgemeinschaft für Versuchswesen und Beratung im Zuckerrübenanbau Franken (ARGE Franken).

2013	2014	2015
Hefloch-1	Treschklingen-1	Herxheim-3
Ingersheim-1	Uندنheim-1	Grombach-1
Mainz-1	Hefloch-2	Uندنheim-1
Herxheim-1	Nordheim-1	Nordheim-1
Geroldshausen-1	Herxheim-2	
	Geroldshausen-2	

2.3 Determination of yield

Sugar beet were harvested and analyzed per plot. The technical quality was analyzed to calculate the recoverable sugar on beet \hat{m}_{RS} in % by the “New Brunswick Formula” (Buchholz et al., 1995) at Südzucker AG (Ochsenfurt).

$$\hat{m}_{RS} = \hat{m}_{S,B} - \hat{m}_{MS} - 0.6$$

$$= \hat{m}_{S,B} - (0.12 \cdot w'_{(K+Na),B} + 0.24 \cdot w'_{\alpha-N,B}) - 1.08$$

\hat{m}_{RS}	Recoverable sugar on beet in g/100 g beet
$\hat{m}_{S,B}$	Sugar content of beet (polarization) in g/100 g beet
\hat{m}_{MS}	Sugar in molasses in g/100 g beet
0.6	Standard loss by factory in g/100 g beet

$$\hat{m}_{MS} = 0.12 \cdot w'_{(K+Na),B} + 0.24 \cdot w'_{\alpha-N,B} + 0.48$$

$w'_{(K+Na),B}$	Potassium and sodium content in mmol/100 g beet
$w'_{\alpha-N,B}$	α -amino nitrogen content in mmol/100 g beet
0.48	Constant

Afterwards the sugar yield m''_{SY} was calculated in t/ha per plot and variety.

$$m''_{SY} = (m''_{BY} \cdot \hat{m}_{RS}) / 100$$

m''_{SY}	Sugar yield in t/ha
m''_{BY}	Sugar beet yield in t/ha

Beet were washed (3 bar, 30 s) and weighed per plot. Afterwards they were macerated and the beet brei was frozen (−20 °C) in portions of 26 g. Sugar content and content of α -amino nitrogen, sodium and potassium were analyzed. Sugar content was analyzed by polarimetry, determination of α -amino nitrogen content was done by the copper method (Stanek and Pavlas, 1934; Kubadinow and Wieninger, 1972). Flame photometry was used to determine potassium and sodium content (Carruthers and Oldfield, 1962; Kubadinow and Wieninger, 1973; Kubadinow, 1974).

2.4 Collection of soil samples

Soil samples were taken during sowing and during harvesting of sugar beet from all 15 field trials. 8–10 samples (0–60 cm) were taken with a hydraulic soil sampler (Nietfeld, DUOPROB 60-UP, Quakenbrück, Germany) alongside each plot. The samples were separated automatically in topsoil sample (0–30 cm) and subsoil sample (30–60 cm). All samples were mixed to one topsoil and one subsoil sample. Every sample was placed in a plastic bag and stored in the dark at 4 °C.

2.5 Determination of initial and final population by hatching test

Grosse et al. (1985) described a method to determine the amount of BCN in soil samples. It is based on 1 acetoxy-2-ethylhexa-1,3-dien (Acetox), which is volatile and induces hatching of J2 from the eggs (Banasiak et al., 1985). Afterwards J2s are extracted by a sieve tray (modified Oostenbrink dishes) from soil samples (Grosse and Decker, 1989) (Fig. 1).

After homogenization of the soil samples and removing large particles with a metal sieve (mesh width = 0.5 cm), 500 g of each sample was incubated with 0.5 mL Acetox (2% in acetone) for 3 days at 26 °C. After incubation, two subsamples of 150 g

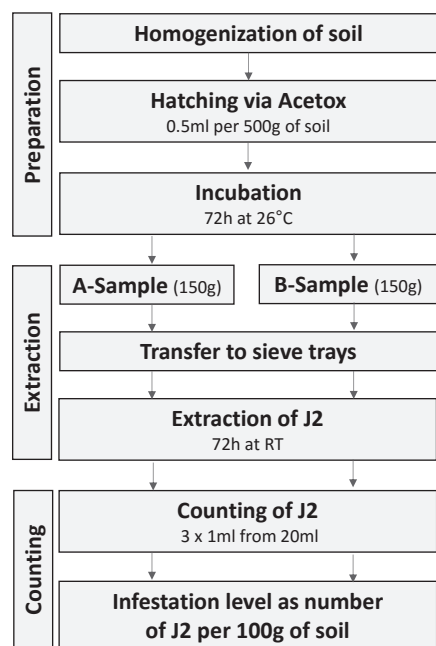


Fig. 1: Diagram of the procedure to determine the BCN infestation level

three subsamples of 1 mL under a dissecting microscope and averaged. Finally, the infestation level was calculated as number of J2 per 100 g of soil. Based on the observation that 60% of the dormant J2s will hatch, calculated infestation levels were multiplied by a correction factor (Grosse and Decker, 1989). Here a correction factor of 2 was used. Afterwards the variety-specific pf/pi value was calculated per plot.

2.6 Statistical analysis

SigmaPlot 12.5 (SYSTAT) was used for statistical analysis. The triannual variety-specific m_{SY}'' was analyzed by non-parametric *Kruskal-Wallis* ANOVA on Ranks and multiple comparison *Dunn's* test (Table 3). Per location, per year and over the period of three years the pi levels from topsoil and subsoil (Table 4) were analyzed by *Mann-Whitney* Rank Sum Test; $P \leq 0,05$. The variety-specific pf/pi values of different soil depths 0–30 cm and 30–60 cm and 0–60 cm were compared for single years (Fig. 2 A-D) and the trial period (2013–2015) (Fig. 3 A-D) by non-parametric *Kruskal-Wallis* ANOVA on Ranks and multiple comparison *Dunn's* test.

The results of pf/pi values are shown as boxplots. The box (beginning in quartile 25% (Q1), ending in 75% quartile (Q3)) represents 50% of data and is called interquartile range (IQR). The boxplot whiskers starts at 5% and ends at 95%. In addition, outliers outside of interval $[Q1-3 \times IQR]; [Q3+3 \times IQR]$ were excluded.

From regression the coefficients of determination (R^2) were built between the following data sets:

- pi & pf/pi
- pi & m_{SY}''
- pi & pf
- pf & pf/pi and
- pf & m_{SY}''

for the plot-specific data per soil depths (0–30 cm, 30–60 cm and 0–60 cm) and variety (Beretta, BTS 440, Kleist, Kristal-

lina, Lisanna, Vasco, Nemata). R^2 values between pi & pf/pi and between pi & m_{SY}'' are given in Table 5.

The number of J2 was counted in

lina, Lisanna, Vasco, Nemata). R^2 values between pi & pf/pi and between pi & m_{SY}'' are given in Table 5.

3 Results

3.1 Comparison of variety-specific m_{SY}''

In order to determine the general yield response of the tested varieties under BCN infection, the data of the different location and three years were pooled to mean m_{SY}'' . Both Beretta and Nemata show lower values than most tolerant lines. The yield of Vasco was not different from the yield of Beretta and the yield of Kleist was not significantly different from Beretta and Nemata. In conclusion, most tolerant varieties showed higher m_{SY}'' compared to the sensitive (intolerant) varieties (Beretta and Nemata) under BCN infestation (Table 3).

Table 3: Mean of sugar yield (m_{SY}'') per variety of 15 locations in three years of field trials 2013–2015 ($n = 60$ per variety)

Variety	m_{SY}'' in t/ha
Beretta	12.63 ac
Kleist	14.51 abc
Kristallina	14.84 b
Lisanna	15.48 b
Vasco	14.84 ab
BTS 440	15.16 b
Nemata	11.36 c

Different letters indicate statistically significant differences with $P \leq 0.05$.

3.2 Nematode infestation at different locations and soil depths

The following data show the infestation levels of the different locations at the different years (Table 4).

14 of 15 locations showed higher pi of the soil depth 30–60 cm. pi of the subsoil was significantly increased per year and over a period of three years, compared to pi of the topsoil (Table 4).

3.3 Comparison of variety-specific pf/pi values

In order to determine the host status of the selected varieties the pf/pi values were analyzed for the single years and soil depth of 0–60 cm. Data from locations per year were pooled (2013: 5, 2014: 6, 2015: 4). pf/pi values of Beretta were highest, whereas those of Nemata were lowest for all three years. Nematode reproduction on tolerant varieties ranged in between the values of the susceptible and resistant varieties. All tolerant varieties showed less potential to support BCN reproduction compared to the susceptible variety (Fig. 2 A-C). Whereas the pf/pi values of Beretta increased from year to year (2013: 3.58; 2014: 4.87; 2015: 5.10), the other varieties did not show this effect.

Values of the tolerant lines Lisanna and Vasco turned out to range clearly between the susceptible Beretta and the resistant Nemata, whereas there was no significant difference between BTS 440 and Nemata on one side and between Kleist and Beretta on the other side.

Table 4: Median initial infestation levels (pi) in number of J2 of 0–30 cm and 30–60 cm soil depths per location, per year and over the period of three years of field trials

Year	Location	pi of 0–30 cm	pi of 30–60cm
2013	Geroldshausen-1	271	298
	Hessloch-1	409	*
	Herxheim-1	347	*
	Ingersheim-1	702	880
	Mainz-1	513	*
	Total 2013	469	*
2014	Geroldshausen-2	160	*
	Hessloch-2	198	*
	Herxheim-2	144	*
	Nordheim-1	133	*
	Treschklingen-1	694	762
	Total 2014	177	*
2015	Grombach-1	658	624
	Herxheim-3	338	*
	Nordheim-2	138	*
	Undenheim-2	209	*
	Total 2015	231	*
Total 2013–2015	262	*	

28 plots per location. Asterisk indicates statistically significant differences with $P \leq 0.05$.

Kleist was not statistically different from Beretta in 2013 and 2014, whereas Kristallina and BTS 440 in 2013 and Lisanna, Vasco and BTS 440 in 2014 were not significantly different from Nemata. In 2014 four of five tolerant and the resistant variety showed similar low pf/pi values. In 2015

susceptible and resistant variety showed the highest variety-specific pf/pi values, compared to other test years. In 2015 the pf/pi values BTS 440, Kristallina were not significantly different neither from susceptible nor from resistant reference variety.

3.4 Triannual comparison of variety-specific pf/pi values at different soil depths

The distribution of triannual variety-specific pf/pi values are shown for 0–30 cm (Fig. 3 A), 30–60 cm (Fig. 3 B) and 0–60 cm (Fig. 3 C).

The variety-specific pf/pi values tended to be higher in top-soil than in subsoil for all single test years. For both tested soil depths, Beretta showed the maximum pf/pi value, whereas Nemata showed the lowest pf/pi value. The tolerant varieties showed moderate BCN reproduction with medium values ranging from 1.42 to 2.17 (in 0–30 cm), from 0.78 to 1.69 (in 30–60 cm) and from 1.21 to 2.00 (in 0–60 cm) (Fig. 3 A-C). In general, the triannual variety-specific pf/pi values were higher in 0–30 cm than in 30–60 cm soil depth.

3.5 Dependency of m_{SY}'' and of pf/pi value from pi

It is generally accepted that pi is important to establish damage threshold. This presumes significant R^2 values of the regression between plot-specific pi and variety-specific pf/pi and plot-specific pi and variety-specific m_{SY}'' . Only with Beretta higher R^2 values are achieved (Table 5).

R^2 between pf/pi & m_{SY}'' and pf & m_{SY}'' were negligibly less (maximum R^2 of 0.08, 0.27 respectively) for all varieties and soil depths (not shown).

4 Discussion

In this study yield and host status of different sugar beet varieties were analyzed under field conditions with a moderate natural BCN infestation in top and subsoil (Table 4). The aim of this study was to compare the host status of tolerant sugar beet varieties with susceptible and resistant varieties. As expected, susceptible varieties increase BCN infestation, whereas resistant varieties reduce it. BCN reproduction on tolerant sugar beet varieties was shown to be low; most of the tested tolerant varieties were resistant.

Tolerant varieties are expected to produce high yield regardless of nematode infection. In fact, it was found that tolerant varieties to show higher m_{SY}'' compared to the susceptible and the resistant varieties (Table 3). This result

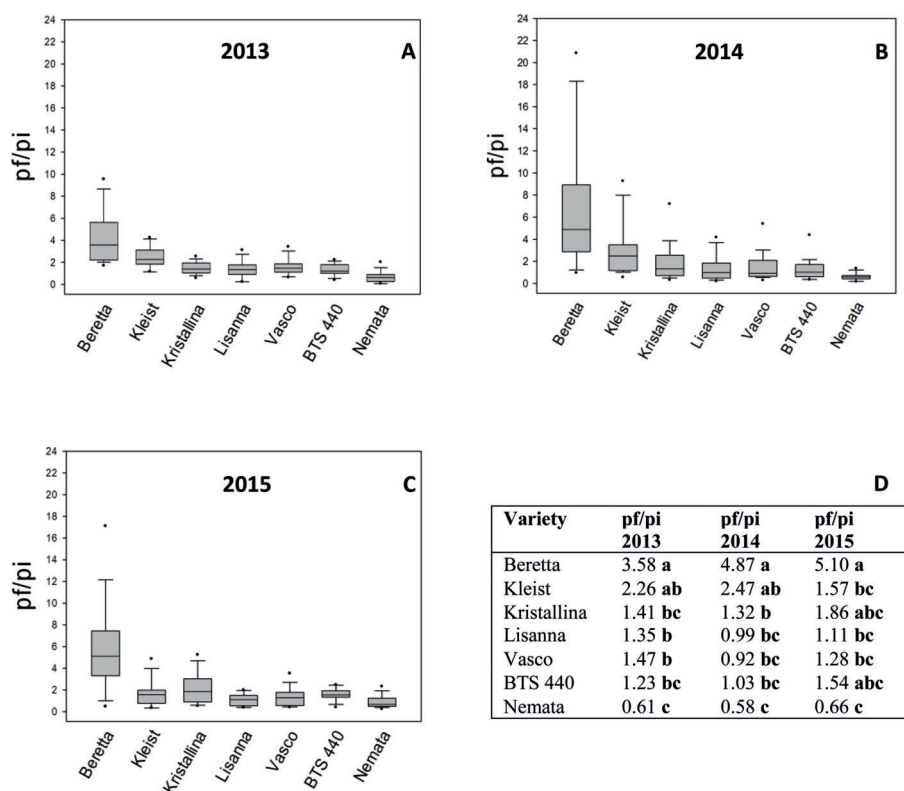


Fig. 2 A–D: Box plot graph of median pf/pi values of different sugar beet varieties in 0–60 cm soil depth in A) 2013, 5 locations, $n = 20$ per variety B) 2014, 6 locations, $n = 24$ per variety C) 2015, 4 locations, $n = 16$ per variety D) overview of the variety-specific pf/pi median values during three years

Different letters indicate statistically significant differences with $P \leq 0.05$

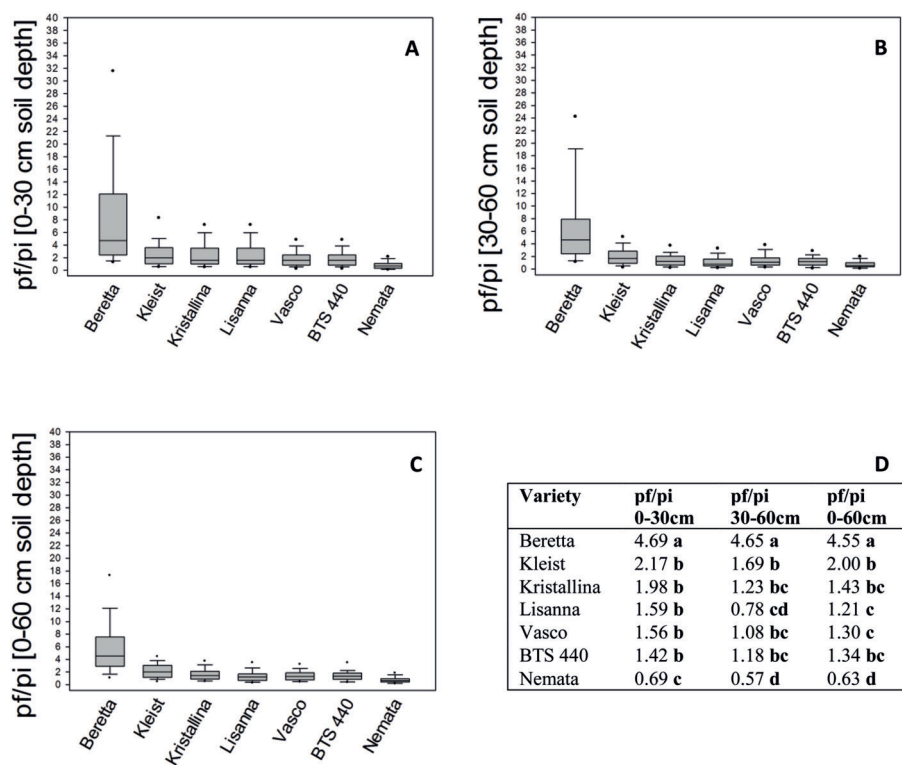


Fig. 3 A-D: pf/pi values on different sugar beet varieties in A) topsoil, B) subsoil and C) top-and subsoil as box plots with median line at 15 locations in three years of field trials. D) overview of variety-specific median pf/pi values per soil depths at different soil depths $n = 60$ per variety and soil depth

Different letters indicate statistically significant differences with $P \leq 0.05$

Table 5: Variety-specific coefficient of determination (R^2) from regression between initial population to pf/pi value (pi & pf/pi) and of initial population to sugar yield (pi & m_{SY}^n) in 0–30 cm, 30–60 cm and 0–60 cm soil depths

Variety	R^2 of pi & pf/pi			R^2 of pi & m_{SY}^n		
	0–30 cm	30–60 cm	0–60 cm	0–30 cm	30–60 cm	0–60 cm
Beretta	0.61	0.54	0.50	0.28	0.18	0.14
Kleist	0.14	0.29	0.38	0.13	0.14	0.16
Kristallina	0.40	0.02	0.11	0.23	0.20	0.22
Lisanna	0.30	0.19	0.13	0.21	0.13	0.16
Vasco	0.17	0.12	0.18	0.21	0.11	0.19
BTS 440	0.32	0.02	0.02	0.11	0.15	0.13
Nemata	0.21	0.05	0.05	0.31	0.16	0.30

Data include three years of field trials (15 locations)

was also found in the coordinated national field tests (Anon., 2016).

The analyses show that pf/pi values vary specifically among the tested tolerant varieties (Fig. 2; Fig. 3). Triannual trials (Fig. 3C) revealed that all tolerant varieties were significantly different from the resistant and the susceptible variety. However, pf/pi values of two varieties (Lisanna and Vasco) were significantly different from Kleist. pf/pi values of BTS 440 and Kristallina were low, but not significantly different from Lisanna and Vasco on one hand and Kleist on the other hand. pf/pi values of Kleist are the highest among all tolerant varieties and were not significantly different from Beretta in 2013 and 2014 (Fig. 2).

In order to facilitate the evaluation of sugar beet varieties regarding their host status for BCN, a classification with four

different groups is proposed (Table 6). Resistant varieties are differentiated into highly resistant (HR) and moderately resistant (MR), and susceptible varieties into highly susceptible (HS) and moderately susceptible (MS).

In the study the resistant variety (Nemata) is HR, the susceptible variety Beretta is HS, whereas the tolerant varieties BTS 440, Kristallina, Lisanna and Vasco are MR. Kleist is classified as MS (Fig. 4).

The data from single years support this new classification, which considers the effect of tolerant varieties on BCN populations in the field.

It is important to analyze, which factors contribute to host status and BCN reproduction in the field. In fact, there are only few publications on the genetic basis of nematode resistance of tolerant varieties. In opposite to monogenic resistance, as observed in classical resistant varieties, the gradual resistance of tolerant varieties is probably polygenic (Heijbroek, 1977). However, the fact that breeders meanwhile provide numerous different tolerant, i.e. gradually resistant, varieties, shows that they have

established breeding lines with a stable genetic background. The mode of action of the gradual resistance of tolerant varieties has never been studied in detail and remains therefore obscure. Kleist (MS) and Vasco (MR) showed lower m_{SY}^n compared to the other tolerant varieties. In addition, the yields of both varieties were not statistically different from the susceptible reference variety (Table 3). Therefore, tolerance and resistance seem to be different traits that are not necessarily linked.

The data show that the pf/pi values of the tested varieties fluctuate during the years. This might be due to different pi values (Table 4). In general, a reciprocal relation is expected: higher pi values result in lower pf/pi values (Oostenbrink, 1968); this is particularly true for susceptible sugar beet varieties (Heijbroek et al., 2002; Heinicke and Warnecke, 2006; Krüssel and Warnecke, 2009; Daub and Westphal, 2012; Westphal, 2013; Reuther and Lang, 2015). Daub and Westphal (2012) observed significantly higher pf/pi values on tolerant varieties in field trials when the infestation level was lower than 500 eggs and J2, compared to more than 500 eggs and J2 per 100 mL soil. This relation could not be found by Reuther and Lang (2015). In the present

Table 6: Classification of pf/pi values of the different types of sugar beet varieties

Current classification		New classification	Class
Resistant	→	Highly resistant	HR
Tolerant	→	Moderately resistant	MR
		Moderately susceptible	MS
Susceptible	→	Highly susceptible	HS

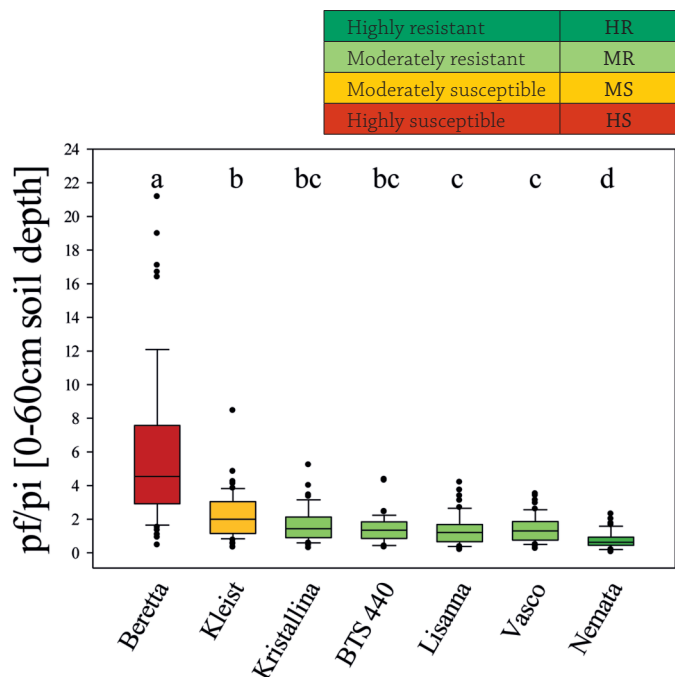


Fig. 4: Triannual pf/pi values on different sugar beet varieties in top- and subsoil at 15 locations as box plots with median line. Colors and shortcuts indicate host status (HR highly resistant; MR moderately resistant; MS moderately susceptible; HS highly susceptible) based on statistical analysis. $n = 60$ per variety. Different letters indicate statistically significant differences with $P \leq 0.05$

study, pf/pi values on tolerant and resistant varieties were not dependent on pi (Table 5). For the use of tolerant varieties, it is therefore important to determine whether soils are infested rather than to determine the exact infestation level.

In the future, it would be ideal to further optimize both traits, tolerance and resistance, and combine them in one variety. Such a variety could be the key element of integrated BCN management in efficient and sustainable sugar beet cropping systems.

5 Conclusion

The analysis of the host status of BCN-tolerant sugar beet revealed clear differences between the different varieties. According to the measured levels of nematode reproduction or reduction four classes were proposed consisting of two levels of resistance (MR moderately resistant; HR highly resistant) and two levels of susceptibility (MS moderately susceptible; HS highly susceptible). In order to facilitate classification a so-called tacho-diagram was designed which depicts the relative reproduction levels of the analyzed varieties (Fig. 5). The diagram is based on the median values and is related to the most susceptible variety (Beretta = 100%). In the analyses, tolerant varieties tended to be resistant (MR or HR) rather than susceptible (MS or HS).

It is obvious that farmers need clear information on the host status of the available sugar beet varieties. Therefore it is suggested to establish a regulatory procedure that includes the analysis of nematode reproduction for all varieties. At least BCN-tolerant varieties should be included in resistance tests. In this way, farmers can decide whether and how they want to

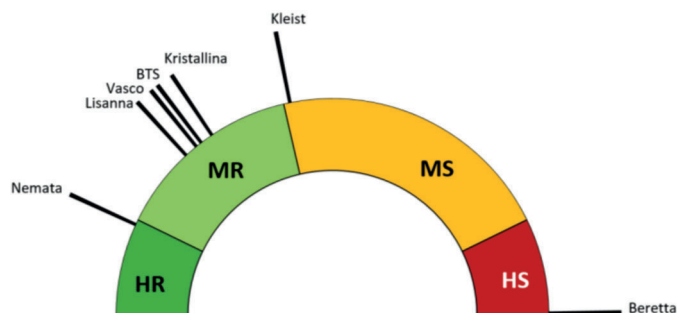


Fig. 5: Tacho-diagram classifying susceptible, tolerant and resistant sugar beet varieties based on the relative median values of BCN reproduction (Beretta = 100%). Data include three years of field trials (15 locations, soil depth 0–60 cm)

consider BCN management in their choice of sugar beet variety. Since not all tolerant varieties clearly reduce BCN in the field, this approach also contributes to avoid hidden increase of BCN levels that might cause problems in the future.

Acknowledgement

The authors acknowledge Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Ernährung, Weinbau und Forsten Rheinland-Pfalz, Kuratorium für Versuchswesen und Beratung im Zuckerrübenanbau, Hessisches Ministerium für Umwelt, Klimaschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Kuratorium, Strube Research GmbH & Co. KG, Stiftung Südwestdeutscher Zuckerrübenanbau for financial, educational and logistical support. Authors are grateful to *Harald Bauer*, *Axel Siekmann*, *Jürgen Fiest* (ARGE Zuckerrübe Südwest) and *Martina Anselstetter* (ARGE Franken) for technical support in field trials, and *Swenja Wach*, *Sabrina Cappel*, *Mareike Grüter* and *Irina Dementjew* (Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V.) for assistance in nematode analysis.

References

- Anon. (2016): Anbauinformationen 2016. Arbeitsgemeinschaft für Versuchswesen und Beratung im Zuckerrübenanbau in Baden-Württemberg, Hessen und Pfalz. Worms. http://www.ruebe.info/uploads/media/Anbauinformationen_2016.pdf [10/01/17]
- Banasiaik, L.; Grosse, E.; Jock, M.; Lyr, H. (1985): Mittel zur Larvenschlupf-induktion bei zystenbildenden Nematoden, insbesondere Rübenmematoden. DD-Patent 279 602
- Buchholz, K; Märlander, B.; Puke, H.; Glatkowski, H.; Thielecke, K. (1995): Neubewertung des technischen Wertes von Zuckerrüben. Zuckerind. 120, 113–121
- Cai, D.; Kleine, M.; Kifle, S.; Harloff, H.; Sandal, N.N.; Marcker, K.A.; Klein-Lankhorst, R.M.; Salentijn, E.M.J.; Lange, W.; Stiekema, W.J.; Wyss, U.; Grudler, F.M.W.; Jung, C. (1997): Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275, 832–834
- Caldwell, R.M.; Schafer, J.F.; Compton, L.E.; Patterson, F.L. (1958): Tolerance to cereal leaf rusts. *Science*, 128, 714–715
- Carruthers, A.; Oldfield, J.F.T. (1962): Methods for the assessment of beet quality. Proceedings of the XIth Session of the Commission Internationale Technique de Sucrierie (The Technological Value of the Sugar Beet), Elsevier, Amsterdam, 224–248
- Cook, R.; Evans, K. (1987): Resistance and tolerance. In: *Brown, R.H.; Kerry, B.R.* (1987): Principles and practice of nematode control in crops. Academic Press Australia, 179–231

- Curi, J.; Zmoray, I. (1966): Beziehung klimatischer Faktoren zur Entwicklungsdauer von *Heterodera schachtii* in der Slowakei (ČSSR). *Helminthologia* (Bratisl.) 7, 49–63
- Daub, M.; Westphal, A. (2012): Integrated nematode management at crop rotation systems with sugar beets. *Sugar Industry/Zuckerind.* 137, 110–119
- Ellenby, C. (1954): Environmental determination of the sex ratio of a plant parasitic nematode. *Nature*, Lond. 174, 1016–1017
- Fischer, J.; Reuther, M. (2015): Nematoden-Management auf Witterung abstimmen. *dzz*, 4, 24
- Gardner, M.; Verma, A.; Mitchum, G. (2015): Emerging roles of cyst nematode effectors in exploiting plant cellular processes. In: Escobar, C.; Fenoll, C. (2015): *Advances in botanical research, plant nematode interactions: A view on compatible interrelationships*. Academic Press, 259–292
- Griffith, G.D. (1988): Factors affecting the biology and pathogenicity of *Heterodera schachtii* on sugarbeet. *Journal of Nematology* 20 (3), 396–404
- Grosse, E.; Banasiak, L.; Lyr, H.; Jock, M. (1985): Neuer Labortest zum Nachweis des Rübennematoden (*Heterodera schachtii*). *Nachr.-Bl. Pflanzenschutz DDR* 39, 111–112
- Grosse, E.; Decker, H. (1989): Untersuchungen zur Eignung von Biotest und Schlupftest für den quantitativen Nachweis des Rübenezystenälchen (*Heterodera schachtii*) in Bodenproben. *Nachr.-Bl. Pflanzenschutz DDR* 43, 227–230
- Heijbroek, W. (1977): Partial resistance of sugarbeet to beet cyst eelworm (*Heterodera schachtii* SCHM.). *Euphytica* 26, 257–262
- Heijbroek, W.; Munting, R.G.; Swaaij, A.C.P.M. van (2002): The effect of different levels of beet cyst nematodes (*Heterodera schachtii*) and beet necrotic yellowvein virus (BNYVV) on single and double resistant sugar beet cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 735–744
- Heinicke, D.; Warnecke, H. (2006): Erfolgreiche Produktion von Zuckerrüben trotz Nematoden – ein weiter Weg. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirtschaft*, 404, 48–54
- Holbein, J.; Grundler, F.M.W.; Siddique, S. (2016): Plant basal resistance to nematode: An update. *Journal of Experimental Botany* 2, 1–13
- Jung, C.; Cai, D.; Kleine, M. (1998): Engineering nematode resistance in crop species. *Trends Plant Sci.* 3, 266–271
- Kämpfe, L. (1952): Rübennematode. *Akad. Verlagsgesellschaft Geest & Portig K.-G.*, Leipzig, 40
- Kämpfe, L.; Kerstan, U. (1964): Die Beeinflussung des Geschlechtsverhältnisses in der Gattung *Heterodera* Schmidt. *Nematologica* 10, 388–398
- Kleine, M.; Cai, D.; Elbl, C.; Herrmann, R.G.; Jung, C. (1995): Physical mapping and cloning of a translocation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) carrying a gene for nematode (*Heterodera schachtii*) resistance from *B. procumbens*. *Theor. Appl. Genet* 90, 399–406
- Krüssel, S.; Warnecke, H. (2009): Zystennematoden und Sortenwahl in Zuckerrüben. *Zuckerrübe* 58, 120–124
- Kubadinow, N.; Wieninger, L. (1972): Bestimmung des Alpha-Aminostickstoffs in Zuckerrüben und Betriebsäften der Zuckerproduktion. *Zucker* 25, 43–47
- Kubadinow, N.; Wieninger, L. (1973): Zur Bestimmung der Alkalien und Erdalkalien in der Zuckerrübe. *Jahresbericht Zuckerforschungsinstitute. Österreich*, 7, 65–67
- Kubadinow, N. (1974): Die flammenphotometrische Natrium- und Kaliumbestimmung in Zuckerrüben und Betriebsäften der Zuckerproduktion. *Jahresbericht Zuckerforschungsinstitute. Österreich*, 8, 83–94
- Lange, W.; Jung, C.; Heijbroek, W. (1990): Transfer of beet cyst nematode resistance from *Beta* species to the section *Patellares* to cultivated beet. *Proceedings of the 53rd winter congress IIRB*, 89–102
- Müller, J. (1979): Über die Generationenzahl von *Heterodera schachtii* unter Feldbedingungen an Zuckerrüben. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* 31, 92–95
- Müller, J. (1989): Zur Definition von Resistenz und anderer Fachbegriffe in der Nematologie. *Nachrichtenblatt. Deutscher Pflanzenschutzdienst*, 41, 137–139
- Müller, J. (1999): The economic importance of *Heterodera schachtii* in Europe. *Helminthologia* 36, 205–213
- Oostenbrink, M. (1966): Major characteristics of the relations between nematodes and plants. *Reports of the 8th International Symposium of nematology*, 8–10
- Reuther, M.; Lang, C. (2015): Nematoden: Wie gut sind tolerante Sorten? *top agrar* 10, 60–63
- Savitsky, H. (1977): Nematode (*Heterodera schachtii*) resistance and meiosis in diploid plants from interspecific *Beta vulgaris* x *B. procumbens* hybrids. *Can. J. Genet. Cytol.* 20, 177–186
- Schafer, J.F. (1971): Tolerance to plant disease. *Ann. Rev. Phytopath.* 9, 225–235
- Scott A. J.; Ford-Lloyd, B.V.; Williams, J.T. (1977): *Patellifolia, nomen novum* (Chenopodiaceae). In: *Taxon* 26 (2–3), 284
- Siddique, S.; Radakovic, Z.; De La Torre, C.M.; Chronis, T.; Novák, O.; Raireddy, W.; Holbein, J.; Matera, C.; Hütten, M.; Gutbrod, P.; Anjam, M.S.; Rozanska, E.; Habash, S.; Elashry, A.; Sobczak, M.; Kakimoto, T.; Strnad, M.; Schmölling, T.; Mitchum, M.G.; Grundler, F.M.W. (2015): A parasitic nematode releases cytokinin that controls cell division and orchestrates feeding site formation in host plants. *PNAS*. 112 (4), 12669–12674
- Stanek, V.; Pavlas, P. (1934): Über eine schnelle, informative Methode zur Bestimmung des schädlichen Stickstoffes, der Amide und der Aminosäuren in der Rübe. *Zuckerind. Cechoslov. Rep.* 59, 129–142
- Stelter, H. (1963): Die Vermehrung der Rasse B des Kartoffelnematoden, *Heterodera rostochiensis* Woll., an der A-anfälligen Sorte Aquila und der A-resistenten Sorte Spekula. *Nematologica* 9, 237–240
- Trudgill, D.L. (1986): Concepts of resistance, tolerance and susceptibility in relation to cyst nematodes. In: *Lamberti, F.; Taylor, C.E.* (eds.): *Cyst Nematodes*. New York and London Plenum Press, 179–187
- Westphal, A. (2013): Vertical distribution of *Heterodera schachtii* under susceptible, resistant or tolerant sugar beet cultivars. *Plant Dis.* 97, 101–106
- Wyss, U.; Zünke, U. (1986): Observations on the behaviour of second stage juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. *Revue Nématol.* 9 (2), 153–165

Received on February 17, 2017.

Authors' addresses: Marie Reuther^{1,2}, Dr. Christian Lang¹, Prof. Dr. Florian M.W. Grundler^{2*}

¹ Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V., Rathenaustraße 10, 67547 Worms, Germany;

² INRES. Department of Molecular Phytomedicine, University of Bonn, Karlrobert-Kreiten Straße 13, 53113 Bonn, Germany;

* e-mail: grundler@uni-bonn.de

Kapitel 4:

In vitro development of the Beet Cyst Nematode *Heterodera schachtii* in susceptible, tolerant and resistant sugar beet varieties

Marie Reuther^{1,2,*}, Christian Lang¹, Florian M.W. Grundler²

¹ Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V., Rathenaustraße 10,
67547 Worms, Germany

² INRES-Molekulare Phytomedizin, Karlrobert-Kreiten Straße 13,
53113 Bonn, Germany

* grundler@uni-bonn.de

***In vitro* development of the Beet Cyst Nematode *Heterodera schachtii* in susceptible, tolerant and resistant sugar beet varieties**

Marie Reuther^{1,2}, Christian Lang¹, Florian M. W. Grundler^{2,*}

¹Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V., Rathenaustraße 10, 67547 Worms, Germany

²Universität Bonn, INRES-Molekulare Phytomedizin, Karlrobert-Kreiten Straße 13, 53113 Bonn, Germany

* grundler@uni-bonn.de

Abstract

The beet cyst nematode *Heterodera schachtii* (BCN) is a major biotrophic parasite of sugar beet, causing extensive yield losses in the field. The management of BCN generally relies on the availability of tolerant or resistant sugar beet varieties. Although natural host resistance is a preferred strategy, existing resistant sugar beet varieties have a low yield potential, which makes it unattractive to use for cultivation. The use of tolerant sugar beet varieties is an important tool of nematode management in the field as they provide high yield regardless of the BCN infection. However, studies about the development of nematodes on these tolerant varieties are lacking. In current study, we have established a non-destructive technique for evaluating infection assays on susceptible, tolerant and resistant varieties of sugar beet. The plants were grown on solidified media in Petri dishes (Ø 12cm), and inoculated with infective second stage juveniles of BCN (J2). The *in vitro* performance of infection assays enabled us to phenotype sugar beet-nematode interaction at high resolution. Therefore, several factors of BCN life cycle –from infection to reproduction- were analyzed over time. We observed lowest infection rate and strongly restricted development of the nematodes in the roots of resistant variety. Whereas infection rate was similar in susceptible and tolerant varieties, the ability to host BCN was reduced in tolerant compared with the susceptible variety. In the resistant and tolerant varieties high male to female ratio was observed as compared to susceptible variety. Moreover, smaller size of females was observed in the tolerant variety whereas female-associated syncytia were larger than in the susceptible variety. Furthermore, a reduced number of females which turned into cysts was shown for the tolerant variety. Therefore, a

smaller number of cysts were produced in the tolerant variety. The cysts also contained lower number of eggs compared to the susceptible variety. The fundamental reasons of low host status of tolerant varieties are assumed due to a limitation of the function of the female-associated syncytia. Therefore, it seems quite likely that the tolerant variety have another resistance mechanism than the resistant variety.

Key words: host status, moderately resistance, reproduction, infection assay, syncytia, hatching, sex ratio

Introduction

The beet cyst nematode *Heterodera schachtii* (BCN) is a major pest in all sugar beet growing areas across the world. It infects the roots of sugar beet and interfere the development of the tap root which results into branched and stunted growth of the root system. In sever conditions symptoms may include the wilting and yellowing of the leaves (Kämpfe, 1952). The usually high yield of susceptible variety is reduced up to 25% upon BCN infestation, particularly when BCN infects the young root system (Müller, 1999).

Host plants such as sugar beet releases root exudates, which induce the hatching of the resting second stage juveniles (J2s; Fig. 1a) present in the cysts. After hatching, the infective J2s move towards the host roots and penetrate at the elongation zone of the root (Fig. 1b). After invasion, they migrate through the root tissue until they find the vascular cylinder (Wyss & Zunke, 1986). Usually a pericycle or procambium cell is selected as the starting point for induction of a feeding cell (Wyss, 1992). There, BCN induces a specialized feeding structure consisting of plant cells merged to a syncytium by partial cell wall dissolution (Wyss & Zunke, 1986) (Fig. 1c). The nematode releases peptide secretions of the esophageal glands that facilitate the formation of the syncytium (Davis et al., 2004; Gardner et al., 2015). Once the feeding site is established, the juveniles become sessile. Since, the syncytium is the only food source during the life cycle of the sedentary parasite (Kyndt et al., 2013), the moment a syncytium becomes non-functional the nematode dies. After molting the third time, the juveniles reach the adult stage. Females and males of BCN showing strong dimorphism and reproduction is obligate sexual. The females remain attached to the

syncytium, and finally assume a lemon shaped appearance, while males are vermiform and mobile in order to mate with the females (Fig. 1d). After death, females turn into cysts (Fig. 1e) containing hundreds of eggs. The cysts may remain in the soil for more than 10 years and under favorable conditions J2s hatch from the cysts (Fig. 1a) (Kämpfe, 1952).

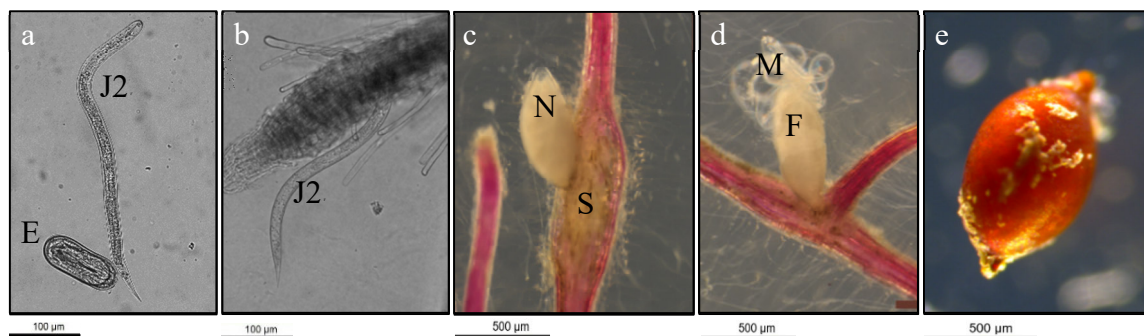


Fig. 1a-e: Life cycle of *Heterodera schachtii* in sugar beet.

a) second stage juvenile within an egg and a freshly hatched second stage juvenile, b) second stage juvenile penetrating the sugar beet root, c) sedentary juvenile nematode and induced syncytium within the root, d) mating of female (attached to the root) and numerous vermiform males, e) female converted into cyst with eggs inside. (Picture ‘a’ provided by S.J. Shah).

Abbreviations: E-egg, J2-second stage juvenile, N-sedentary juvenile nematode, S-syncytium, M-male, F-female.

Susceptible varieties serve as good hosts to BCN since they serve good nutritional conditions. Consequently, BCN reproduction is highly supported by susceptible sugar beet varieties. Resistant sugar beet varieties will also be infected by BCN, but as they are poor hosts for BCN, development and reproduction of the parasite is hindered (Holtmann, 2000). The sex of BCN is not genetically determined but depends on environmental factors; favourable conditions in susceptible host plants promote female formation, whereas adverse conditions, i.e. in resistant hosts support development of males (Ellenby, 1954; Stelter, 1963; Kämpfe & Kerstan, 1964). Since more nutrients are necessary for female development (Müller et al., 1981); mostly males will reach the adult stage at resistant sugar beet (Yu & Steele, 1981).

Although natural host resistance is a preferred strategy, existing resistant varieties generally have a low yield potential, which makes it unattractive to use for cultivation. Consequently, BCN management relies on the availability of sugar beet varieties performing high yield when infested with nematodes. Fortunately, tolerant varieties were released to the market 15 years ago. These varieties perform well regardless of whether they are infected or not infected. Therefore, cultivation of tolerant sugar beet varieties are used as BCN management tool.

In field trials, the BCN reproduction value pf/pi (Oostenbrink, 1966) was shown to be lower in tolerant varieties than susceptible ones. Therefore, tolerant varieties were characterized as moderately resistant (Reuther et al., 2017). Limited information exists pertaining to the impact of assumed resistance in tolerant sugar beet varieties. Keeping in view the lower reproduction value (pf/pi) in tolerant varieties, we assumes that the development of BCN might be interfered by the tolerant variety. Therefore, the specific focus of this study is to investigate the interaction between BCN and a tolerant sugar beet variety, compared to the interaction of BCN with a resistant and a susceptible variety, respectively.

In general, reproduction factors e.g. number of cysts, eggs or J2s are result of single BCN development factors as infection, number of females and males, function of female-associated syncytia (e.g. indicated by its size) and success of mating remains unknown in field or pot trials. In our study, an established non-destructive technique with sugar beet plants was adopted. The plants grown on solidified media in Petri dish (\varnothing 12cm) enabled a high-resolution phenotyping of the parasite-host interaction. Since medium used is transparent, several factors involved in the development of BCNs were recognizable in three commercial sugar beet varieties: one susceptible, one tolerant and one resistant. These *in vitro* assays enabled us to determine:

- the BCN **infection** into the roots of different sugar beet varieties,
- the **numbers of stagnating juveniles, males, females,**
- the **sizes of females and female-associated syncytia**
- the **numbers of cysts and eggs** for each cultivar
- the **hatching rate** of the next generation

All of these factors which influence the development of BCNs were compared among susceptible, tolerant and resistant cultivars.

Material and methods

The experiments were conducted under sterile laboratory conditions in Petri dishes in the absence of soil.

Plant material and growth conditions

A susceptible (*Beretta*), a tolerant (*Lisanna*) and a resistant (*Nemata*) sugar beet variety (Tab. 1) were used to study the interaction with BCN in infection assays. The naked seed material was obtained from single breeder companies (Tab. 1).

Tab. 1: Sugar beet varieties used for infection assay

Variety	Year of approval	Breeder	Host status	Effect on Yield
<i>Beretta</i>	2006	KWS Saat AG	Susceptible	Intolerant
<i>Lisanna</i>	2013	KWS Saat AG	Moderately resistant	Tolerant
<i>Nemata</i>	2010	Syngenta Seeds	Resistant	Intolerant

Host status and effect on yield according to Reuther et al., 2017

The seed caps of 100 seeds per variety were removed (Fig. 2a) for sterilization with 3% NaOCl₂ followed by 30 minutes shaking at 450rpm. Afterwards, the seeds were washed seven times with sterile water.

To induce germination, 4-8 seeds were transferred on two layers of moistened filter paper (3ml sterile water, containing 0.03% ProClin (Sigma Aldrich)) in Petri dishes (Ø 9cm) for 7 days at 22°C in darkness. The sterilization protocol was provided by KWS Saat AG (personal communication, Plant Cell & Transformation Technology). The germinated seedlings were transferred to Petri dishes (Ø 12cm) agar medium supplemented with modified Knop's nutrient solution (Sijmons et al., 1991; Table A1) (Fig. 2b). After 7 days growth in controlled conditions (16h light/8h dark, 22°C), the plants inoculated with nematodes.

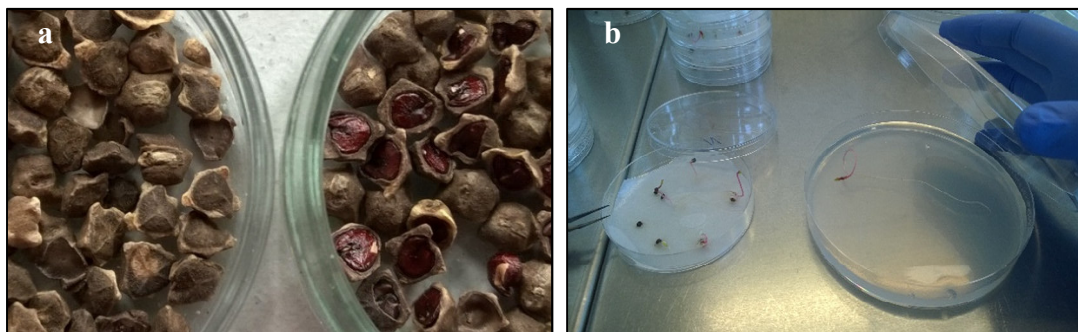


Fig. 2 a-b: a) left: Sugar beet seeds with caps, right: sugar beet seeds with removed caps. b) Transfer of germinated seeds (7 days) from moistened filter papers (left) to Knop medium (right).

Nematodes

Cysts of *H. schachtii* were collected from roots of mustard plants *Sinapis alba* cv. Albatros by *in vitro* culturing on modified Knop's nutrient solution (Sijmons et al., 1991; Table A1). Cysts were collected into Baermann-funnels (Ø 5cm), filled with 3mM ZnCl₂ stimulating hatching of J2s, under sterile conditions. After one week (22°C; at darkness) freshly hatched J2s were collected and sterilized with 0.05% HgCl₂ for 3min.

Nematode infection assays

The infection assay consisted of three to five plants of each variety in a single biological replication. The assays were performed in 5 independent replications.

One plant per Petri dish was used. The Petri dishes were incubated in growth room under conditions of 16h light and 8h dark period at continuous temperature of 22°C. Three-week-old plants (14 days after transfer), were inoculated with 125±7 freshly hatched J2s onto the surface of agar medium.

The infection rate per plant was assessed at 8 days after inoculation (dai) by counting the number of J2's that penetrated the root system. The infection sites were marked on the bottom of the petri dishes (1st measurement, Fig. 3). The infection of marked nematodes was followed to calculate the number of males, females and stagnating juveniles at 15 dai (2nd measurement, Fig. 3).

Afterwards, the females and female-associated syncytia were captured under binocular microscope (Leica DM2000) and sizes were measured using Leica Application Software (LAS 4.3).

Later on, the numbers of cysts, eggs per cyst, and the hatching rate were determined at 47 dai (3rd measurement, Fig. 3) in three of five independent experiments. In order to determine whether the emergence of J2s is influenced by the host (susceptible, tolerant and resistant varieties) the hatching rate of the next generation was analyzed per variety. Therefore, single cysts of the next generation were transferred into 1.5 ml Eppendorf tubes containing 1ml of 3mM ZnCl₂-solution, which was used as hatching inducer. The tubes, containing single cysts from different varieties, were arranged in boxes and incubated for 7 days at 26°C in darkness. After incubation time the hatched J2s and the remaining cyst contents (J2 filled eggs and egg shells) were counted.

Statistical analysis

SigmaPlot 12.5 (SYSTAT) was used for statistical analysis. The comparison of infection (Fig. 4); the percentages of number of females, males and stagnating juveniles (Fig. 5), and the female size and female-associated syncytium size (Tab. 2) per variety were performed by non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks and multiple comparison Dunn's test. These tests were also used to compare number of females and number of cysts of the different varieties (Fig. 6; significant letters: a-c; A-C, respectively). The Mann-Whitney Rank Sum Test was used to compare female numbers vs. cyst numbers (Fig. 6; asterisks) as well as eggs vs. hatched J2s (Fig. 7; asterisks) according to the single varieties. Also the numbers of eggs and hatched J2s per variety have been compared (Fig. 7; significant letters: a-b; A-B, respectively) by the Mann-Whitney Rank Sum Test. Significant difference was set for $P \leq 0.05$.

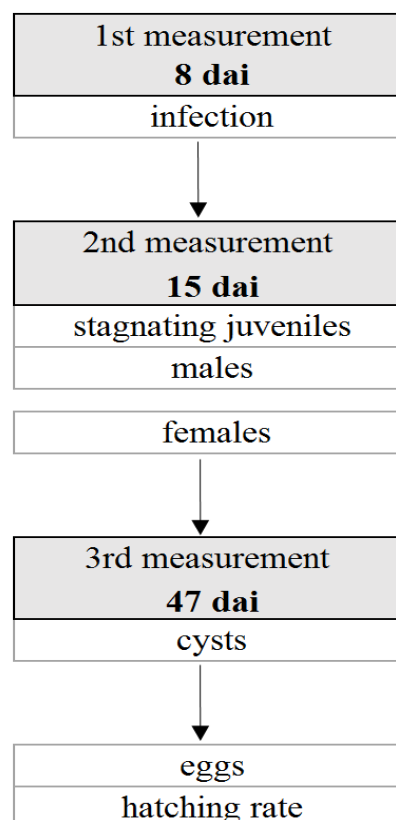


Fig. 3: Experimental design of infection assay with sugar beet and *Heterodera schachtii*.

Results

In order to get a detailed understanding of varieties' ability to host BCN, the infection, development and reproduction of BCN was analyzed in susceptible, tolerant and resistant sugar beet varieties, grown on solidified artificial media in Petri dishes (Ø 12 cm).

Infection

The total number of nematodes infecting the roots were counted at 8 dai to evaluate whether the roots of different sugar beet varieties varies in their infection towards BCN (Fig. 4). Out of 125 ± 7 J2s inoculated per plant, lowest infection was detected in the resistant variety, whereas infection in susceptible and tolerant varieties were shown to be similar (Fig. 4).

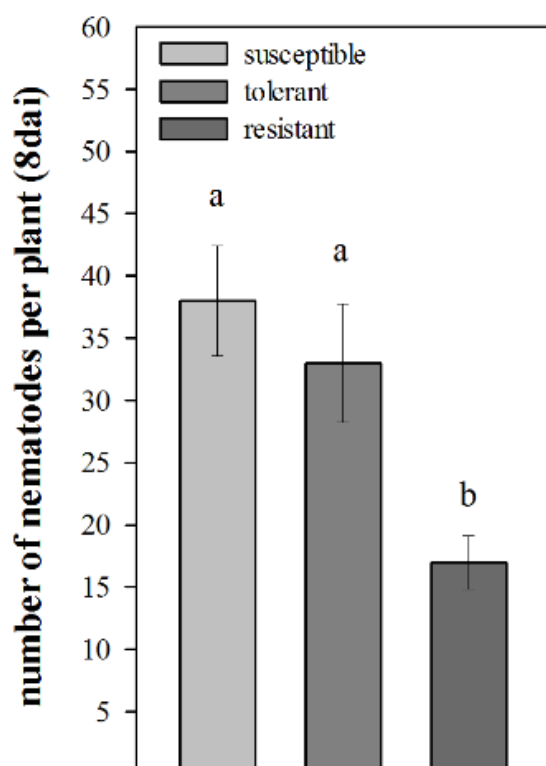


Fig. 4: Number of nematodes infecting the roots at 8 dai (median and standard error bars).

$n_{\text{susceptible}}=15$; $n_{\text{tolerant}}=26$; $n_{\text{resistant}}=21$. Different letters indicate statistically significant differences with $P \leq 0.05$.

Population structure

The development of adult BCN was observed at 15 dai. Adults were mainly found in lateral roots in all tested varieties. Lowest numbers of males and females were

observed in the resistant variety (Fig. 5). Whereas highest number of females were observed with the susceptible variety, highest number of males was seen for the tolerant variety. More males than females were observed in the tolerant and in the resistant variety, whereas the number of males was lower than the number of females in the susceptible variety.

The percentage of stagnating juveniles (% of total infection at 8 dai) was statistically significant different to each other. Lowest percentage of stagnating juveniles was obtained for the susceptible variety, intermediate for the tolerant and highest for the resistant variety, respectively (Fig. 5).

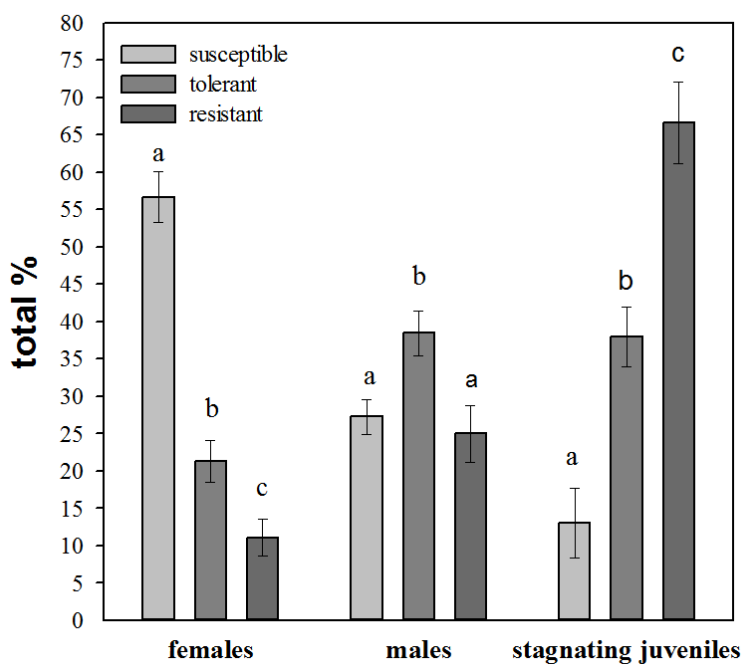


Fig. 5: Percentages of developed females, males, and stagnating juveniles per variety at 15 dai (median and standard error bars).

$n_{\text{susceptible}}=15$; $n_{\text{tolerant}}=26$;
 $n_{\text{resistant}}=21$; Different significant letters indicate statistically significant differences. $P \leq 0.05$.

Number of females and female size

The susceptible variety produced the most (Fig. 5) and largest females (Tab. 2), whereas the lowest number of females (Fig. 5) and the smallest females developed (Tab. 2) in the resistant variety. Less and smaller females developed in the tolerant variety compared with the susceptible variety (Tab. 2).

Since females developing in the resistant variety were very small and hardly reached the typical lemon shape, they were difficult to find and discriminate at 15 dai. Also

retardation of adult development is assumed. Therefore, the observation was extended to 47 dai to determine sex and developmental stage.

Female-associated syncytium size

In general, females and their associated syncytia can be better recognized in lateral roots compared with primary roots of the sugar beet.

In the susceptible and the tolerant varieties, syncytia associated to females were easy to recognize. Female-associated syncytia in the tolerant variety were larger compared with the susceptible variety (Tab. 2). Syncytia developing in the resistant variety were difficult to find and were only seldom visible for measurement of size.

Tab. 2: Sizes of female and associated syncytium per variety at 15 dai.

Median in [mm²]. Different letters indicate statistically significant differences with $P \leq 0.05$.

Variety	Female [mm²]	Female-associated syncytium [mm²]
Susceptible	0.129 a	0.096 a
Tolerant	0.113 b	0.136 b
Resistant	0.079 c	-

Number of cysts and cyst-forming females

Cyst development was analyzed at 47dai. The highest numbers of females and cysts were observed in the susceptible variety, whereas the lowest numbers of females and cysts were obtained with the resistant variety (Fig. 6).

In general, the number of formed cysts was lower compared with the number of females (Fig. 6). In the susceptible variety 66% of the females developed into cysts, whereas this rate was only 35% in the tolerant variety. Simply 10% of the observed females developed into cysts in the resistant variety (in average <1 per plant) (Fig. 6). In the resistant variety less than 3% of cysts compared with that of the susceptible variety were formed (Fig. 6). The cyst number in the tolerant variety was reduced about 65%, compared with the susceptible variety.

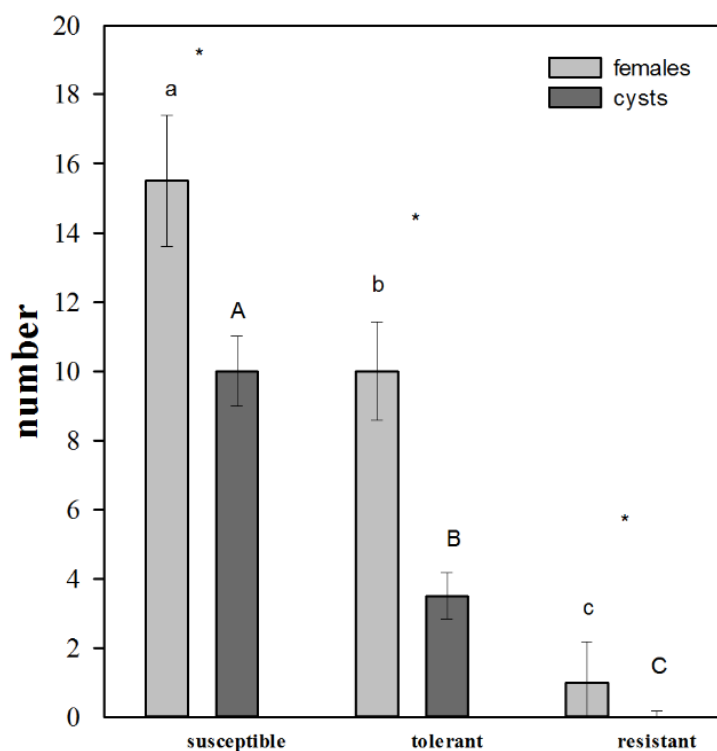


Fig. 6: Number of females at 15 dai and cysts per variety at 47 dai (median and standard error bars).

$n_{\text{susceptible}}=14$; $n_{\text{tolerant}}=16$; $n_{\text{resistant}}=7$. Statistically significant differences are indicated by letters (a-c: female number per variety; A-C: cyst number per variety) and asterisks (female vs. cyst number per variety) with $P \leq 0.05$.

Cyst content and hatching rate of the next generation

Because of the low cyst number observed with the resistant variety (Fig. 6), in following the results of cyst content and hatching rate will be presented only for susceptible and tolerant variety.

The cysts developed in the tolerant variety contained a lower number of eggs compared with the susceptible variety. The number of eggs was different from the number of hatched J2s per variety (Fig. 7).

The hatching rates of the next generation were 62%, 55% and 50% for J2s originating from cysts in the susceptible, in the tolerant (Fig. 7) and in the resistant variety (not shown), respectively. Hatching rates of the next generation were not statistically significant different to each other. In average a hatching rate of 56% was observed over all varieties.

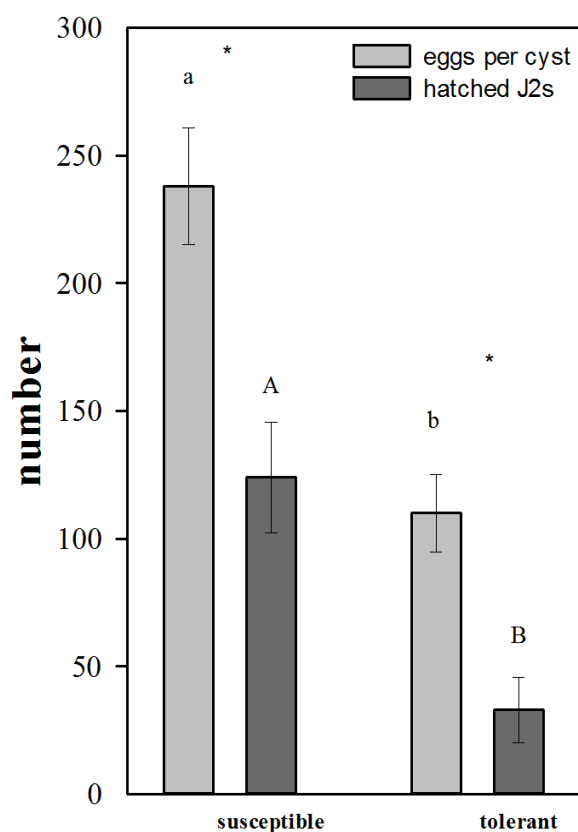


Fig. 7: Eggs per cyst and hatched J2s per variety (median and standard error bars).

$n_{\text{susceptible}}=14$; $n_{\text{tolerant}}=16$; $n_{\text{resistant}}=7$. Statistically significant differences are indicated by letters (a-c: eggs per variety; A-C: hatched J2s per variety) and asterisks (eggs vs. J2s per variety) with $P \leq 0.05$.

Capacity of offspring production

Fecundity in terms of eggs per female and per cyst was calculated to determine the capacity of offspring production. Therefore, the number of females or cysts was multiplied by the number of produced eggs, and this product was divided by the inoculum density. As shown in Tab. 3 female and cyst fecundity was highest in susceptible variety and lowest in the resistant variety.

Tab. 3: Capacity of offspring production in number of eggs per female and eggs per cyst per variety.

Numbers of females and cysts were determined at 15 dai. Number of eggs was determined at 47dai.

Variety	J2s per plant	Number of females	Number of cysts	Number of eggs	Female fecundity	Cyst fecundity
Susceptible	125	17.4	9.7	245	35.4	19.8
Tolerant	125	10.3	4.0	122	10.1	3.9
Resistant	125	2.6	0.28	191	3.93	0.43

Discussion

In this study, the life cycle of BCN was analyzed in susceptible, tolerant, and resistant sugar beet varieties. Successful parasitism and nematode development and reproduction are based on several factors. Therefore,

- the infection rate (at 8 dai),
- numbers of males, females and stagnating juveniles, sizes of females and their associated syncytia (at 15 dai),

– number of cysts, eggs, and the hatching rate of the next generation (at 47 dai) were determined in the different varieties (Fig. 3). The specific focus of our study was to elucidate the unknown interaction between BCN and a tolerant sugar beet variety. The best conditions for BCN development were found for the susceptible variety. Many juveniles were able to reach adulthood and eventually developed into highly reproductive females and cysts. In contrast, BCN development was almost completely blocked in the resistant variety; as shown before by numerous authors e.g., Yu & Steele (1981), Wyss (1984), and Holtmann et al. (2000). In our study, only very less females and less than one cyst per plant in the resistant variety developed (Fig. 6). Our study showed, that less cysts and eggs developed in the tolerant variety compared with the susceptible variety (Fig. 7). The percentage of females was decreased whereas the percentage of males was increased in the tolerant variety compared with the susceptible variety (Fig. 5). Additionally, the efficiency of the female-associated syncytium and tendency of females to turn into cysts were shown to be decreased within the tolerant variety (Fig. 6). Therefore, our study provides first indications of the tolerant sugar beet varieties' resistance, compromising BCN life cycle.

In general, main mechanisms of resistant hosts against cyst nematodes are failure to infect the roots (Sasser & Taylor, 1952; Jatala & Russell, 1972; Pariyar et al., 2016) or the inability to induce or establish syncytia (Golinowski & Magnusson, 1991; Yu & Steele, 1981; Wyss, 1984; Jung & Wyss, 1999).

In our study, the attraction of J2s seemed not to be influenced by the host plant since similar amount of J2s reached the root surfaces of the different varieties (not shown). Moreover, the infection was strongly reduced for the resistant compared with the tolerant and susceptible variety (Fig. 4). Previous studies about *H. schachtii* conflict with this result since similar BCN infection was shown in resistant and susceptible

plants e.g. sugar beet, white mustard, and oilseed radish (Müller, 1979; Yu & Steele, 1981; Heijbroek et al., 1988; Grundler, 1989; Trudgill, 1991; Lelivelt & Hoogendoorn, 1993). According to our results, a reduced infection rate was also obtained in resistant rice by *Meloidogyne graminicola* (Zobaida et al., 2018) and resistant wheat varieties by *H. avenae* (Singh et al., 2008) and by *H. filipjevi* (Sağlam et al., 2009; Seifi et al., 2013; Pariyar, 2016). Also Jatala & Russell (1972) showed lower infection of root knot nematode *Meloidogyne incognita* in resistant compared with susceptible sweet potato. To figure out whether BCN resistance is related due to a difficulty of J2s to penetrate the roots of resistant sugar beet, further investigations should be done. It is known, that mechanically piercing of the cell wall by the nematodes stylet (Wyss & Zunke, 1986) can be inhibited by the host plant: first by its cell wall composition (reviewed in Bohlmann & Sobczak, 2014), and second by overcoming of nematodes cell wall degrading enzymes (reviewed in Davis et al., 2000). In general, such penetration resistance factors should be investigated for the different sugar beet varieties.

After induction of the syncytium, the sedentary nematode needs to establish and maintain its feeding site for successful parasitism and to develop into adult. The induced syncytia in susceptible host plants allow high nutrition conditions for female development (Ellenby, 1954; Stelter, 1963; Kämpfe & Kerstan, 1964). As expected, in our study and more females than males developed in the susceptible sugar beet variety which results in a sex ratio of $1♀:0.5♂$ (Fig. 5). It is known, that a decreasing number of females, an increasing number of males and stagnating juveniles occurs in poor hosts (Kämpfe & Kerstan, 1964; Kerstan, 1969). Therefore, lowest percentage of stagnating juveniles was seen in the susceptible and highest percentage was obtained in the resistant variety. In the tolerant variety, the percentage of stagnating juveniles was increased compared to the susceptible variety and half of that of the resistant variety. Surprisingly, highest number of males was seen for the tolerant variety (Fig. 5). The percentages of males were similar in resistant and susceptible variety, which is against our expectation. In order to investigate whether stagnating juveniles will develop later than 15dai into males, observation was prolonged until 22dai. Delayed development of males was not seen in the resistant variety. Similar and slightly shifted sex ratios were obtained for the resistant ($1♀:2.2♂$) and the tolerant

variety (1♀:2.1♂). At least for the resistant variety we expected a more male biased sex ratio. In experiments with soil filled plastic boxes Roeb & Hallmann (2016) observed a sex ratio of 1♀:4♂ in roots of resistant sugar beet at 28 dai, whereas at later time point (42 dai) sex ratio shifted to 1♀:11♂. There is no report about the sex ratio of *H. schchatii* at the same resistant variety we used. More male biased sex ratios were obtained also with resistant catch crops. Two weeks after infection 1♀:6.7♂ and 1♀:11♂ developed in roots of resistant varieties of white mustard (*Sinapis alba*) and oilseed radish (*Raphanus sativus*), respectively (Lelivelt & Hoogendoorn, 1993). Müller (1985) observed also 1♀:11♂ in resistant oilseed radish at 15 dai, whereas a sex ratio of 1♀:27♂ was evaluated by Grundler (1989) at 12 dai. This led us to the conclusion, that even when number of females and males are evaluated at similar time points, there can be differences in the observed sex ratios. We assume that the experimental system e.g. the temperature, the method and time point of male and female determination and the number of inoculated J2s caused the discrepancy of results obtained in the resistant sugar beet variety. In our study only the development of the J2s, which already had infected the roots at 8 dai were observed until 15 dai. Therefore, males from infections later than 8 dai were not determined. In contrast, Roeb & Hallmann (2016) investigated whole population structure over the time of six weeks. In addition, we used a relatively low density of 125 J2s per plant, whereas 500 J2s per plant were inoculated by Roeb & Hallmann (2016). Due to competition more females than males would develop when number of inoculated J2s is small (Müller, 1985), what could also explain discrepancy of data. Also the reduced infection rate in this variety (Fig. 4) support this assumption. These could be reasons for the observed sex ratio in the resistant variety and could explain why there is no difference in sex ratios between resistant and tolerant varieties.

The more male biased sex ratio observed in the tolerant variety, give a first hint for poorer host ability for BCN compared to the susceptible variety. Further the higher number of males and lower number of females in the tolerant variety compared to the susceptible variety (Fig. 5) indicate poor host conditions in tolerant variety. These results endorse the earlier explanations where sex was described under the influence of the environment (Anjam et al., 2018; Grundler et al., 1991).

Our study showed the female size to be influenced by the varieties' host status (Tab. 2). The susceptible variety had most and biggest females, whereas female size was

reduced in the tolerant variety. In rare cases females were recognized in the resistant variety, but their size was very small (Fig. 5; Tab. 2). In the resistant variety the early dysfunction of syncytia is caused by a change of the endomembrane system which is controlled by the resistance gene $Hs1^{pro-1}$ (Holtmann, 2000). Whereas the low nutrition conditions for the parasite in resistant sugar beet varieties are result of the degradation of the syncytial tissue caused by the known resistance gene, the speculated resistance mechanism in tolerant variety remains unknown. Degradation of feeding site is also known from nematode-resistant oilseed radish, soybean and potato (Yu & Steele, 1981; Wyss, 1984; Rice et al., 1987; Endo, 1991).

Since only few females had developed in the resistant variety, and female-associated syncytia were hard to find, in following we mostly concentrate to compare results of tolerant and susceptible variety only.

Since males and females are able to develop here in tolerant sugar beet and also in tolerant varieties of other crops (e.g., soybean, potato; Shrestha et al., 2007, Mitchum, 2016, respectively) syncytia are generally assumed to be successfully established by cyst nematodes in tolerant varieties. In contrast to the observations of Gierth (2005), no differences in the location of syncytia in roots of different sugar beet varieties were recognized in this study. Establishment of syncytia by *H. schachtii* seems to be successful in the tolerant variety to the same manner than in the susceptible variety. Since the syncytium is the only source of nutrients for nematode development, the size of female-associated syncytium should also indicate the varieties' ability to host BCN. Already Perry & Gaur (1996) described: the larger the syncytium, the more nutrients will be available for the BCN development. Surprisingly, the tolerant variety gained the largest female-associated syncytia, even in this variety less (Fig. 6) and smaller females (Tab. 2) developed than in the susceptible variety. Consequently, the efficiency of syncytial production seems to be decreased hence the small sized females with oversized female-associated syncytia. The syncytia efficiency in resistant hosts (e.g. resistant white mustard) is limited by a reduced amount of solute flow in the syncytia (Grymaszewska & Golinowski, 1991). Because syncytium size in the tolerant sugar beet variety is bigger to susceptible variety, probably flow of nutrient is not limited. The food availability only could be affected in such syncytium when feeding

cells are not connected properly with sieve cells. For this anatomical studies of syncytia in roots of the different sugar beet varieties may explain better.

In contrast to the theory of a reduced nutrient flow, the food quality may not be as good as nematodes required. We assume, that syncytia in tolerant sugar beet are less efficient and produce less nutrients, which are essential for female development than required. Therefore, it seems that juveniles need to induce and maintain bigger syncytia to develop into females in the tolerant variety. Due to a nutrient deprivation, oversized but inefficient syncytia could be a reasonable explanation mainly for the small females in the tolerant variety (Fig. 5). It has been already shown that food quality influences the development of nematodes (Grundler et al., 1991). In our study, sizes of females and female-associated syncytia in the susceptible sugar beet variety were similar to that obtained in the *Arabidopsis thaliana* wild type (Col 0) by same infection assay system (Siddique et al., 2014). To our knowledge, the female and syncytia size of BCN were not investigated before in tolerant varieties of sugar beet. The comparative metabolome of susceptible and tolerant cultivars may answer the observations of our study more clearly.

Our study shows that the chance of females to form into cysts varies with the sugar beet varieties (Fig. 6). It had already been observed that not all females matured into cysts (Green et al., 1970; Lelivelt & Hoogendoorn, 1993). In our study, highest rate of females developing into cysts was observed in the susceptible variety (66%), whereas the rate was lower in the tolerant variety (35%). The resistant variety scored only with 10% for females developing into cysts (Fig. 6).

Since mating is imperative for females to form cyst, a lower fertility of females and/or males, the lack of mating or less success of mating are reasons which may influence the number of developed cysts. In general, the mating ability and the amount of mated or virgin females cannot be certainly determined. In our study the females, which did not formed into cysts, were still intact (alive and white) until the last observation at 47 dai. From unpublished *in vitro* studies (Grundler) we know, that females can survive more than one year in roots. After mating the cuticle of females tanned. Only females with tanned cuticle produce eggs (Green et al. 1970).

We speculate that BCN mate less in the tolerant variety than in the susceptible variety. Detailed reasons of the reduced chance of females to develop into cyst should be

further investigated; specifically for the tolerant variety. Measuring, e.g. of female pheromones (to attract the males) would be a possibility to determine the mating ability. Also the observation, that more swollen females (containing more eggs), are more attractive to males (Green et al., 1970), should be investigated for the different sugar beet varieties.

In our study, less and smaller females and accordingly smaller cysts containing less eggs were recognized in the tolerant variety compared with the susceptible variety (Fig. 6). The fecundity of *H. schachtii* was strongly decreased in the tolerant variety than in the susceptible variety. Female fecundity was decreased around 3.5 and cyst fecundity was decreased about 5 times (Tab. 3). It is already known, that egg deposition (Perry & Gaur, 1996) is influenced by the physiological state of the host plant. Also, Ishibashi et al. (1973) showed smaller and less filled cysts for *H. glycines* under deficit of nutrients compared with plants receiving full nutrients. This indicates that the lower host status in tolerant varieties could be connected with lower nutrient conditions.

In nematode resistant cultivars small females and low reproduction are obtained (Ishibashi et al., 1973; Cook, 1974; Grymaszeweska & Golinowski, 1987). However, in our study only three slim cysts were found in the resistant variety. Surprisingly, those cysts produced more eggs compared with the tolerant variety (not shown). Because of the low cyst number of resistant variety, we cannot yet comment whether our results are in agreement to a more recent study, which showed that the size of females and cysts of *H. filipjevi* are not connected to the number of eggs (Pariyar et al., 2016). When taking into account only the results of susceptible and tolerant varieties, the size of females and cysts seems to be connected to the number of eggs in our study.

Further, Perry & Gaur (1996) explained hatching to be influenced by the physiological state of the host plant. In our study, the hatching rate of the next BCN generation was shown not to be strongly influenced by the different sugar beet varieties. The hatching rate of the next generation laid around 56% in average of the three varieties (Fig. 7).

To summarize, our *in vitro*-analysis revealed that sugar beet varieties' ability to host BCN is connected to the number of females, the sex ratio, the female size, the rate of females to form cysts, and the number of cysts and eggs. We further conclude that, the

hatching rate of the next generation is not influenced by the varieties' host status. Sex ratio and number of cysts were already determined factors shown to be influenced by the host plant (e.g. Cai et al., 1997; Hofmann et al., 2008; Lelivelt & Hoogendoorn, 1993; Siddique et al., 2009). Our study confirmed this. Compared with the susceptible variety, the tolerant sugar beet variety can be characterized as a poor host.

It is quite likely that the described BCN development factors of this study seem to outline a poorer host status of tolerant varieties indicating the assumed underlying resistance mechanism. Surprisingly, in the tolerant variety oversized but less efficient female-associated syncytia were induced by BCN (Tab. 2). It should be basically investigated whether a deprivation of nutrients required for female development could be the reason for lower host status of tolerant sugar beet variety.

The less efficient syncytia in tolerant variety result in less females, less cysts (Fig. 6) and less eggs (Fig. 7) compared with the susceptible variety. Additionally, the tendency of females to form cysts (Fig. 6) was reduced due to speculative less mating in the tolerant variety. The low efficiency of syncytia to support female development seems to be the most shrinking factor of the tolerant variety, which indicates resistance to BCN in the tolerant variety. These data were obtained the first time and gives rise for the first explanation for the observed lower BCN development and reproduction in tolerant variety compared with the susceptible variety.

In contrast of syncytia degradation known from the resistant variety, the induced syncytia in tolerant variety are oversized. Whereas, there is dysfunction of syncytia establishment in the resistant variety (Holtmann, 2000), the postulated resistance of tolerant variety seems to negatively influence the functionality of established syncytia. Since more males than females developed in the roots of tolerant variety, the resistance mechanism seems to also influence the sex determination of BCN.

The underlying molecular resistance mechanism and the certain role of specific genes in parasitism of tolerant varieties remains mainly unknown and has to be investigated in detail. Further studies including molecular analyses would be able to make more accurate predictions about the reduced host status of tolerant varieties. Specific up-regulated genes have been shown to be highly important for BCN development. Examples are genes coding for amino acid transporters (Elashry et al., 2013) or susceptibility genes, which play a possible role in supplying feeding structures (Pariyar, 2016; Mahlitz, 2016; Radakovic et al., 2018). In absence of e.g. susceptibility

genes, plant growth would not be influenced, but *H. schachtii* parasitism would be hindered to enter or establish the feeding site. For future work, understanding the molecular resistance mechanism of tolerant varieties will greatly facilitate further breeding and nematode control management.

Acknowledgement

The authors acknowledge Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Ernährung, Weinbau und Forsten Rheinland-Pfalz, Kuratorium für Versuchswesen und Beratung im Zuckerrübenanbau, Hessisches Ministerium für Umwelt, Klimaschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Kuratorium, Strube Research GmbH & Co. KG, Stiftung Südwestdeutscher Zuckerrübenanbau for support. The sugar beet seeds were kindly provided by KWS Saat AG and Syngenta. We acknowledge Shahid M. Siddique, Shazad M. Anjam, Badou J. Mendy and Sina-Valerie Mahlitz for scientific and technical support.

References

- Anjam, M. S.; Shah S. J.; Matera, C.; Róžańska, E.; Sobczak, M.; Siddique, S. & F. M. W. Grundler (2018): Host factors influence the sex of nematodes parasitizing roots of *Arabidopsis thaliana*. bioRxiv doi: 10.1101/273391 (<https://doi.org/10.1101/273391>)
- Bohlmann, H. & M. Sobczak (2014): The plant cell wall in the feeding sites of cyst nematodes. *Frontiers in Plant Science* 5:1-10.
- Cai, D.; Kleine, M.; Kifle, S.; Harloff, H.; Sandal, N. N.; Marcker, K. A.; Klein-Lankhorst, R. M.; Salentijn, E. M. J.; Lange, W.; Stiekema, W. J.; Wyss, U.; Grundler, F. M. W. & C. Jung (1997): Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275:832-834.
- Cook, R. (1974): Nature and Inheritance of Nematode Resistance in Cereals. *Journal of Nematology* 6(4):165-174.
- Davis, E. L., Hussey, R. S., Baum, T. J., Bakker, J. Schots, A., Rosso, M.-N. & P. Abad (2000): Nematode Parasitism Genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:365–96.
- Davis, E. L.; Hussey, R. S. & T. J. Baum (2004): Getting to the roots of parasitism by Nematodes. *Trends in Parasitology* 20(3):134-141.
- Elashry, A.; Okumoto, S.; Siddique, S.; Koch, W.; Kreil, D. P. & H. Bohlmann (2013): The AAP gene family for amino acid permease contributes to development of the cyst nematode

- Heterodera schachtii* in roots of Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry* 70:379-386.
- Ellenby, C. (1954): Environmental determination of the sex ratio of a plant parasitic nematode. *Nature*, Lond. 174:1016-1017.
- Endo, B. Y. (1991): Ultrastructure of initial responses of susceptible and resistant soybean roots to infection by *Heterodera glycines*. *Revue de Nématol.* 14(1):73–94. Ernst et al., 2002
- Gardner, M., Verma, A. & G. Mitchum (2015): Emerging Roles of Cyst Nematode Effectors in Exploiting Plant Cellular Processes. In: Escobar, C. & C. Fenoll *Advances in Botanical Research, Plant Nematode Interactions: A View on Compatible Interrelationships.* Academic Press. 259-292.
- Gierth, K. (2005): Pflanzenmorphologische und -physiologische Untersuchungen zur Toleranz in der Wirt-Parasit-Interaktion *Beta vulgaris* - *Heterodera schachtii*. Dissertation. Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.
- Golinowski, W. & C. Magnusson (1991): Tissue response induced by *Heterodera schachtii* (Nematoda) in susceptible and resistant white mustard cultivars. *Can. J. Bot.* 69:53-62.
- Green, C. D.; Greet, D.N. & F. G. W. Jones (1970): The influence of multiple mating on the reproduction and genetics of *Heterodera rostochiensis* and *H. schachtii*. *Nematologica* 16:309-326.
- Grundler, F. M. W. (1989): Untersuchungen zur Geschlechtsdetermination des Rübenzystennematoden *Heterodera schachtii* Schmidt. Ph.D.thesis. University of Kiel, Germany. 114pp.
- Grundler, F.; Betka, M. & U. Wyss (1991): Influence of changes in the nurse cell system (syncytium) on sex determination and development of the cyst nematode *Heterodera schachtii*: total amounts of proteins and amino acids. *Phytopathology* 81(1):70-74.
- Grymaszewska, G. & W. Golinowski (1987): Changes in the structure of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots in varieties susceptible and resistant to infestation by *Heterodera avenae* Woll. *Acta Soc. Bot. Pol.* 56:381-389.
- Grymaszewska, G. & W. Golinowski (1991): Structure of Syncytia Induced by *Heterodera avenae* Woll. In *Roots of Susceptible and Resistant Wheat (Triticum aestivum L.)*. *J. Phytopathology* 133:307-319.
- Heijbroek, W.; Roelands, A .J.; de Jong, J .H.; van Hulst, C.; Schoone, A. H. L. & R .G. Munning (1988): Sugar beets homozygous for resistance to beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.), developed from monosomic additions of *Beta procumbens* to *B. vulgaris*. *Euphytica* 38:121-131.
- Hofmann, J.; Szakasits, D.; Blochl, A.; Sobczak, M.; Daxbock-Horvath, S.; Golinowski, W.; Bohlmann, H.; & F. M. W. Grundler (2008): Starch serves as carbohydrate storage in nematode-induced syncytia. *Plant Physiol.* 146(1):228-235.
- Holtmann, B.; Kleine, M. & F. M. W. Grundler (2000): Ultrastructure and anatomy of nematode-induced syncytia in roots of susceptible and resistant sugar beet. *Protoplasma* 211:39-50.
- Ishibashi, N.; Kondo, E.; Muraoka, M. & T. Yokoo (1973): Ecological Significance of Dormancy in Plant Parasitic Nematodes I. Ecological Difference between Eggs in Gelatinous Matrix

- and Cyst of *Heterodera glycines* ICHINOHE (Tylenchida: Heteroderidae). Appl. Ent. Zool. 8(2):53-63.
- Jatala, P. & C. C. Russell (1972): Nature of Sweet Potato to *Meloidogyne incognita* and the Effects of Temperature on Parasitism. Journal of Nematology 1(4):1-7.
- Jung, C. & U. Wyss (1999): New approaches to control plant parasitic nematodes. Appl. Microbial Biotechnol. 51:439-446.
- Kämpfe, L. (1952): Rüben- und Kartoffelälchen. Akad. Verlagsgesellsch. Geest & Portig K.-G., Leipzig 40.
- Kämpfe, L. & U. Kerstan (1964): Die Beeinflussung des Geschlechtsverhältnisses in der Gattung *Heterodera* Schmidt. Nematologica 10:388-398.
- Kerstan, U. (1969): Die Beeinflussung des Geschlechtsverhältnisses in der Gattung *Heterodera*. II. Minimallebensraum- Selektive Absterberate der Geschlechter- Geschlechtsverhältnis (*Heterodera schachtii*). Nematologica 15:210-228.
- Kyndt, T.; Vieira, P.; Gheysen, G. & J. de Almeida-Engler (2013): Nematode feeding sites: unique organs in plant roots. Planta 238, 807–818.
- Lelivelt, C. L. C. & J. Hoogendoorn (1993): The development of juveniles of *Heterodera schachtii* in roots of resistant and susceptible genotypes of *Sinapis alba*, *Brassica napus*, *Raphanus sativus* and hybrids. Neth. J. Pl. Path. 99:13-22.
- Mahlitz, S.-V. (2016): NSL-1 a susceptibility factor for cyst nematode infection in *Arabidopsis roots*. Masterarbeit. Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.
- Mitchum, M. G. (2016): Soybean Resistance to the Soybean Cyst Nematode *Heterodera glycines*: An Update. Phytopathology 106(12):1444-1450.
- Müller, J. (1979): Über die Generationenzahl von *Heterodera schachtii* unter Feldbedingungen an Zuckerrüben. Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst 31:92-95.
- Müller, J. (1985): Der Einfluss der Wirtspflanze auf die Geschlechtsdeterminierung bei *Heterodera schachtii*. Mitt. Biol. Bundesanstalt Land- und Forstw. 226:46-63.
- Müller, J.; Rehbock, K. & U. Wyss (1981): Growth of *Heterodera schachtii* with remarks on amounts of food consumed. Revue de Nématol. 4:227-234.
- Müller, J. (1999): The economic importance of *Heterodera schachtii* in Europe. Helminthologia 36: 205–213.
- Oostenbrink, M. (1966): Major characteristics of the relations between nematodes and plants. Reports of the 8th International Symposium of nematology 8–10.
- Pariyar, S. R., Dababat, A. A., Siddique, S., Erginbas-Orakci, G., Elashry, A., Morgounov, A., & F. M. W. Grundler (2016): Identification and characterization of resistance to the cereal cyst nematode *Heterodera filipjevi* in winter wheat. *Nematology* 18(4):377-402.
- Pariyar, S. R. (2016): Analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) resistance to cereal cyst nematode *Heterodera filipjevi* by genome-wide association mapping. Dissertation. Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.
- Perry, R. N. & H. S. Gaur (1996): Host plant influences on the hatching of cyst nematodes. Fundam. Appl. Nematol. 19(6):505-510.

- Radakovic, Z. S.; Anjam, M. S.; Escobar, E.; Chopra, D.; Cabrera, J.; Silva, A. C.; Escobar, C.; Sobczak, M.; Grundler, F. M. W. & S. Siddique (2018): Arabidopsis HIPP27 is a host susceptibility gene for the beet cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Molecular Plant Pathology* 1-12.
- Reuther, M.; Lang, C. & F. M. W. Grundler (2017): Nematode-tolerant sugar beet varieties – resistant or susceptible to the Beet Cyst Nematode *Heterodera schachtii*? *Sugar Industry* 142:277-284.
- Roeb, J. & J. Hallmann (2016): Eindringung, Entwicklung und Vermehrung von *Heterodera schachtii* an anfälligen, resistenten und toleranten Zuckerrübenotypen. Beitrag auf der 44. Jahrestagung des DPG-Arbeitskreises Nematologie 2016. Zusammenfassung der Arbeitskreisbeiträge. 13.
- Rice, S. L.; Stone, A. R. & B. S. C. Leadbeater (1987): Changes in cell structure in roots of resistant potatoes parasitized by potato cyst nematodes. 2. Potatoes with resistance from *Solanum vernei*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 31:1-14.
- Sağlam, H. D.; Çobanoğlu, S.; Wesemael, W.; Nicol, J. M.; Viaene, N. & A. A. Dababat (2009): Preliminary investigation of resistance of winter wheat to *Heterodera filipjevi* under controlled conditions. In: Eds. Riley, I. T.; Nicol, J. M. & A. A. Dababat, *Cereal cyst nematodes: status, research and outlook*. pp. 172-176. (CIMMYT: Ankara, Turkey).
- Sasser, J. N. & A. L. Taylor (1952): Studies on the entry of larvae of root-knot nematodes into roots of susceptible and resistant plants. *Phytopathology* 42:474.
- Seifi, S.; Karagar, A. & Z. Banihashemi (2013): The life cycle of the Cereal Cyst Nematode, *Heterodera filipjevi*, and effect of plant hosts on its population. *World Applied Programming* 3(4):164-168.
- Shrestha, R.; Uzzo, F.; Wilson, M. J. & A. H. Price (2007): Physiological and genetic mapping study of tolerance to root-knot nematode in rice. *New Phytologist* 176:665-672.
- Siddique, S.; Endres, S.; Atkins, J.M.; Szakasits, D.; Wieczorek, K.; Hofmann, J.; Blaukopf, C.; Urwin, P.E.; Tenhaken, R.; Grundler, F.M.W.; Kreil, D.P. & H. Bohlmann (2009): Myoinositol oxygenase genes are involved in the development of syncytia induced by *Heterodera schachtii* in Arabidopsis roots. *New Phytologist* 184:457-472.
- Siddique, S.; Matera, C.; Radakovic, Z. S.; Hasan, M. S.; Gudbrod, P.; Rozanska, E.; Sobczak, M.; Torres, M. A. & F. M. W. Grundler (2014): Parasitic worms stimulate host NADPH Oxidases to produce reactive oxygen species that limit plant cell death and promote infection. *Science Signaling* 7(320):1-9.
- Sijmons, P. C.; Grundler, F. M. W.; Von Mende, N.; Burrows, P. R. & U. Wyss (1991): *Arabidopsis thaliana* as new model host for plant-parasitic nematodes. *The Plant Journal* 1(2):245-254.
- Singh, P.; Rohatgi, D.; Tomar, S. M. S.; Sirohi, A.; Gaur, H. S.; Kishor, V.; Bishnoi, .P.; Kumar, R. & S. M. Yadav (2008): Genetics of resistance in wheat against the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae* Woll. *Nematologia Mediterranea* 36:19-23.

- Stelter, H. (1963): Die Vermehrung der Rasse B des Kartoffelnematoden, *Heterodera rostochiensis* Woll., an der A-anfälligen Sorte Aquila und der A-resistenten Sorte Spekula. *Nematologica* 9:237-240.
- Trudgill, D. L. (1991): Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29, 167-192.
- Wyss, U. & U. Zunke (1986): Observations on the behavior of second stage juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. *Revue Nématol.* 9(2):153-165.
- Wyss, U. (1984): Ultrastructure of feeding sites of the cyst nematode *Heterodera schachtii* Schmidt in roots of susceptible and resistant *Raphanus sativus* L var. *oleiformis* Pers. *Cultivar. Physiological Plant Pathology.* 25:21-37.
- Wyss, U. (1992): Observations on the feeding behaviour of *Heterodera schachtii* throughout development, including events during moulting. *Fundam. Appl. Nematol.* 15(1):75-89.
- Yu, M. H. & A. E. Steele (1981): Host-Parasite Interaction of Resistant Sugarbeet and *Heterodera schachtii*. *Journal of Nematology* 13(2):206-212.
- Zobaida, L.; Ullah, C.; Warmerdam, S.; Goverse, A.; Reichelt, M.; Price, A.; Gershenson, J. & G. Gheysen (2018): Comparing the defence responses to root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) infection in resistant vs susceptible rice (*Oryza sativa*) cultivars. Presentation. Book of Abstracts 33th Symposium of the ESN Gent. 175.

Supplementary material for:

***In vitro* development of the Beet Cyst Nematode *Heterodera schachtii* in susceptible, tolerant and resistant sugar beet varieties**

Marie Reuther^{1,2}, Christian Lang¹, Florian M. W. Grundler^{2,*}

¹Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V., Rathenaustraße 10, 67547 Worms, Germany

²Universität Bonn, INRES-Molekulare Phytomedizin, Karlrobert-Kreiten Straße 13, 53113 Bonn, Germany

* grundler@uni-bonn.de

Table A1: Preparation of solid KNOP (0.8%) according to Sijmons et al., 1991

Composition	Volume	Chemical	[g L⁻¹]
Sucrose	20g		
Daichin Agar	8g L ⁻¹		
B5 Vitamins	1mL L ⁻¹		
Stock solution I	2mL L ⁻¹	KNO ₃	121.32
		MgSO ₄ · 7H ₂ O	19.71
Stock solution II	2mL L ⁻¹	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	120
Stock solution III	2mL L ⁻¹	KH ₂ PO ₄	27.22
Stock solution IV	0.4mL L ⁻¹	FeNaEDTA	7.34
Stock solution V	0.2mL L ⁻¹	H ₃ BO ₃	2.86
		MnCl ₂	1.81
		CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.073
		ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.36
		CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.03
		H ₂ MoO ₄	0.052
		NaCl	2

Kapitel 5:

Non-invasive phenotyping reveals differences in sugar beet root growth related to tolerance and resistance to the Beet Cyst Nematode *Heterodera schachtii*

Marie Reuther^{1,2}, Christian Lang¹, Kerstin A. Nagel³, Florian M. W. Grundler²

¹ Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V., Rathenaustraße 10, 67547 Worms, Germany

² Universität Bonn, INRES-Molekulare Phytomedizin, Karlrobert-Kreiten Straße 13, 53113 Bonn, Germany

³ IBG-2: Plant Sciences, Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Jülich, Germany

* grundler@uni-bonn.de

Non-invasive phenotyping reveals differences in sugar beet root growth related to tolerance and resistance to the Beet Cyst Nematode *Heterodera schachtii*

Marie Reuther^{1,2}, Christian Lang¹, Kerstin A. Nagel³, Florian M. W. Grundler²

¹Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V., Rathenaustraße 10, 67547 Worms, Germany

²Universität Bonn, INRES-Molekulare Phytomedizin, Karlrobert-Kreiten Straße 13, 53113 Bonn, Germany

³IBG-2: Plant Sciences, Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Jülich, Germany

*grundler@uni-bonn.de

Abstract

The beet cyst nematode *Heterodera schachtii* (BCN) is a major biotrophic parasite compromising sugar beet production. Although natural host resistance is a preferred strategy, existing resistant sugar beet genotypes have a low yield potential, which makes it unattractive to use for cultivation. Tolerant sugar beet genotypes are an important tool of nematode management since high yield is achieved regardless BCN infection. Additionally, tolerant genotypes support only moderate BCN reproduction, whereas susceptible genotypes highly promote nematode development. In order to elucidate the response of tolerant genotypes in comparison to susceptible and resistant genotypes (which are both intolerant), a non-invasive phenotyping system for root growth was applied in which plants were grown in soil-filled rhizotrons. Our study revealed that sugar beet genotypes differ in length of primary root, root system depth and number of secondary roots, whereas lengths of lateral and total roots were similar for the plants affected and not affected by BCN. Highest values of primary, lateral and total root length and root system depth were observed for the susceptible genotype under control conditions, whereas with BCN infection the tolerant genotypes performed mostly higher values at 14dai compared to intolerant genotypes. In our study, BCN infection led to a reduction of measured root traits. However, lowest reductions were found for the primary root length and root system depth of the tested tolerant genotypes, what demonstrates that BCN infection did not affect root growth of tolerant genotypes to the

extent observed in intolerant genotypes. Our results indicate that non-invasive root phenotyping enables fast and efficient monitoring of BCN effects on roots and therefore facilitates the early selection of tolerant sugar beet genotypes.

Key words: Rhizotron, non-destructive phenotyping, pf/pi, WSY, root traits, root growth parameters

Introduction

The beet cyst nematode *Heterodera schachtii* (BCN) is a major problem in all sugar beet growing areas. It infects the roots of sugar beet and causes abnormal branching and stunting of the root. Under certain conditions, also wilting and yellowing of leaves is observed (Kämpfe, 1952). Considerable yield reduction up to 25% occurs when BCN infects the young root system and disturbs the development of the tap root, in which sucrose is accumulated (Müller, 1999).

Infective second stage juveniles (J2) of BCN develop in the eggs and are able to remain there in a quiescent stage for more than a decade until they are activated and attracted by exudates of host plants (Kämpfe, 1952). Hatched J2s move towards the host roots and penetrate the root epidermis. After invasion, the J2s migrate intracellularly through the different tissue layers until they reach the vascular cylinder (Wyss & Zunke, 1986). Here, the nematode induces the formation of a feeding structure consisting of specifically modified plant cells that merge to a syncytium by partial cell wall dissolution (Wyss & Zunke, 1986). The induced syncytium serves as exclusive source of nutrients during the nematode life cycle. After three moults, the female juveniles reach the adult stage in which they mate with males and produce several hundred eggs that develop inside their body. Parasitic BCN females assume a lemon shape and finally form a durable cyst, which may contain several hundred eggs.

For successful parasitism the nematode releases proteinaceous (effectors) and non-proteinaceous molecules of the esophageal glands that facilitate the formation of the syncytium (Davis et al., 2004; Gardner et al., 2015, Siddique and Grundler, 2018). The syncytium induces a strong sink for assimilates and water (Hofmann & Grundler, 2007). BCN-infected beets are frequently malformed, reduced in primary root length, and exhibit

changes in lateral root formation. Heavily infected roots may be forked, and may also form a bearded root system due to proliferation of lateral roots (Kämpfe, 1952; Moriarty, 1964; Cooke, 1987). Some BCN effectors were found to induce increase of root length (Hewezi et al., 2010) and occurrence of lateral root (Swarup et al., 2008). So far, the mechanism of additional root formation in sugar beet in response to BCN infection has remained unclear. However, invasion and feeding site induction involve profound changes in plant hormone epistasis, and may therefore be involved (Kammerhofer et al., 2015, Siddique et al., 2015, Siddique and Grundler, 2018). For example, the overexpression of the BCN effector 19C07 influences auxin influx in *Arabidopsis thaliana* and therefore leads to the formation of additional lateral roots (Lee et al., 2011).

Sugar beet genotypes differ in their response to BCN and yield performance after BCN infection. They are therefore categorized into the following three groups: susceptible, resistant, and tolerant. Susceptible genotypes strongly support BCN reproduction; they are characterized by vigorous growth with high yield but suffer from significant losses following BCN infection. Resistant genotypes are infected by the nematodes but do not support BCN development and reproduction. They have a less advantageous yield performance especially after nematode infection (Zhang et al., 2008). In contrast to susceptible and resistant genotypes, tolerant genotypes are infected by nematodes but do not respond with yield penalties (Trudgill, 1986). High yield performance is achieved regardless of BCN infection. Susceptibility or resistance to nematodes is defined as the capability to increase or reduce nematode reproduction, respectively (Trudgill, 1986). BCN tolerant genotypes were shown to respond mostly moderately resistant (Reuther et al., 2017). The mechanisms of tolerance and resistance are largely unknown. There are several hypotheses to explain nematode tolerance. Compensatory root growth, development of deeper or more pronounced root systems or less sensitivity of the roots to nematode infection were previously suggested by Stanton & Fisher (1988).

Latest non-invasive methods (spectrometry, thermography and visible imaging) use the strong link between the above and belowground parts of sugar beet plants. By these techniques sugar beet genotypes' performance and effects on yield by BCN infection can be predicted without root or beet analysis at all beginning from the time point of row closure (Joalland et al. 2019). Since plant's performance mainly depends on the root system, in this

study we focus on a time saving and early observation of soil-root interaction under BCN infection (around 4-leaf plant stage). Therefore in this study commercial sugar beet genotypes' root growth traits were phenotyped with and without BCN during the three weeks of plant age until 14 days of infection. Since plant roots are not amenable for analysis, invasive methods are usually applied to separate roots from soil to measure root growth traits (Lynch, 1995). Once, the root is removed from the soil, it is not possible to further measure growth traits of the same root system. However, recently methods were established to perform plant root structure analysis using non-invasive techniques which allow observation of roots over the time without damaging the plant roots (Nagel et al., 2012).

A non-invasive method of hydroponic culture was used by Wright et al. (2018) to investigate the rooting of susceptible, tolerant and resistant genotypes during a growing time of three weeks but without BCN. Since nematodes need texture for movement, a method with substrate is needed to investigate nematode effects to the root. Common techniques are based on boxes or pots filled with pure sand, or nutritional media solidified in Petri dishes to establish an environment suitable for root growth. Gierth (2005) had screened BCN's influences on susceptible (Penta) and tolerant sugar beet (Nematop) root systems invasively in pots (8 x 10 cm) or in small transparent plastic boxes (4 x 2 x 10 cm).

In contrast to the commonly used invasive techniques, to our knowledge, Hillnhütter et al. (2012) were the first to use a non-invasive method (three-dimensional nuclear magnetic resonance imaging (MRI) analysis) to analyze the root system of BCN-infected susceptible sugar beet genotype Alyssa. Long measuring times cause low throughput in MRI analysis. To increase the throughput, in this study soil-filled rhizotrons were used. The observation through a transparent interface is the principle of rhizotrons. Rhizotrons are one of the earliest non-invasive techniques used for studying root growth in soil (Sachs, 1873). The use of rhizotrons, filled with soil provide a field-like texture under more natural conditions compared to soil-free systems.

In this study, we used rhizotrons to determine the response of young sugar beet roots to BCN infection compared to non-infected plants during early growth stages. Roots generally respond dynamically to environmental stress. Therefore, root growth traits serve as ideal indicators for changing environmental conditions (Nagel et al., 2006; Nagel et al., 2009) or (soil) pathogen attack. Here, we investigated different root growth traits of five selected

commercial sugar beet genotypes, representing tolerant (3), susceptible (1) or resistant (1) genotypes towards BCN.

The aim was to identify variation in BCN infection responses between the susceptible, tolerant and resistant sugar beet genotypes. We assume that root growth traits of the different sugar beet genotypes show significant differences after BCN infection. Since commercial tolerant sugar beet genotypes show high yields under BCN infection (Reuther et al., 2017), we hypothesized that tolerant genotypes are less adversely affected by BCN and therefore show less pronounced growth changes by the parasite infection compared to intolerant genotypes. This also could help to explain the advantages of tolerant genotypes: high yield under BCN infection and low BCN infection response. Furthermore, we addressed the question, if root traits of very young plants could be used in breeding programs for selecting sugar beet candidates or genotypes, which show high tolerance and resistance to BCN.

Material & Methods

In this study different root growth traits of commercial sugar beet genotypes were analyzed in soil filled rhizotrons (30 x 4 x 60 cm) at three different measuring time points during three weeks of growing time. Furthermore, the use of such big rhizotrons allows roots to grow more deeply.

Plant material

In order to quantify root growth traits, five commercial sugar beet genotypes (*Beretta*, *Adrianna KWS*, *Kleist*, *Lisanna KWS*, *Nemata*; Table 1) were grown in rhizotrons in two replicated experiments in May of 2014 and May 2015. The experiments were performed at PhyTec greenhouse at the institute IBG-2: Plant Sciences (Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Germany). *Adrianna KWS* and *Lisanna KWS* are hereafter be abbreviated as *Adrianna* and *Lisanna*.

Table 1: Sugar beet varieties used in greenhouse experiment

Host status and effect of BCN infection on yield, according to Reuther et al., 2017

Variety	Year of approval	Breeder	Host status	Effect on yield
<i>Beretta</i>	2006	KWS Saat SE	Highly susceptible	Intolerant
<i>Adrianna</i>	2009	KWS Saat SE	No data	Tolerant
<i>Kleist</i>	2012	Strube Co. KG	Moderately susceptible	Tolerant
<i>Lisanna</i>	2013	KWS Saat SE	Moderately resistant	Tolerant
<i>Nemata</i>	2010	Syngenta Seeds	Highly resistant	Intolerant

Experimental design

Each experiment consisted of six non-infected (- *H. schachtii*) and six BCN-infected sugar beet plants (+ *H. schachtii*) per genotype. Accordingly, in total 120 rhizotrons were analyzed.

The custom-built rhizotrons had outer dimensions (L x W x H) of 30 x 4 x 60 cm. They consisted of a black polyethylene body and one transparent polycarbonate plate and were filled with damped and sifted black peat soil (Graberde; Plantaflor Humus, Vechta, Germany; containing ~120mg l⁻¹ N; ~20mg l⁻¹ P₂O₅; ~170mg l⁻¹ K₂O).

Three seeds of each sugar beet genotype were placed 1.5cm deep into the soil, and positioned at the transparent plate of the rhizotrons. Three days after sowing seedlings were thinned to one plant with the longest and best visible primary root.

Six rhizotrons were placed together in an opaque plastic container (60 x 40 x 40 cm). To obtain an inclination angle of 45°, the rhizotrons were placed in a slanted position with the transparent plate facing downwards. The transparent plate of the first rhizotron was covered by a black plastic plate. Specific placing and covering allowed the roots to grow along the transparent plate of the rhizotrons, and prevented light from reaching the roots. The position of the plastic containers was randomly changed at the measurement time points to reduce the effect of local differences in environmental conditions (primarily light, temperature and air humidity).

One week after sowing, six out of twelve replicates per genotype were infected with 1,000 J2s in 1 ml water, whereas the non-infected control plants were mock-infected with an equivalent amount of tap water. Genotypes were randomized but infected and non-infected rhizotrons were placed into separate plastic container to avoid BCN contamination of non-infected control.

Climate conditions

The plants were grown with day/night temperatures set to 24°C/18°C, and a day length of 16 h. Supplemental illumination (SON-T AGRO 400, Phillips, Amsterdam, the Netherlands) was used when the ambient light intensity outside the greenhouse between 0600 and 2200h local time was $<400\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

During the growing time of 21 days, each plant was irrigated seven times (every third day) with 100-150ml tap water, added from the top of each rhizotron. Every rhizotron contained two holes at the bottom to allow excess water to drain off.

Non-invasive measurements and phenotyping of root systems

Pictures of the root systems were taken along the transparent face of the rhizotrons. Monitoring started one week after sowing. This corresponds to time point zero **days after infection** (0 dai). Additionally, pictures of the root systems of BCN-infected and non-infected plants were taken at 6, 10 and 14 dai. The same distance between camera and rhizotrons and light conditions were maintained when images were taken with a consumer SRL camera (Canon EOS 40D; 1 px = 320 μm). Imaging was completed when the roots reached the bottom of the rhizotrons (depth of 60 cm) at about 21 days after sowing.

The software GROWNSCREEN-Root was used for image analysis (for details see Nagel et al., 2012) (Figure 1). The following root growth traits of the visible root system were determined at each time point: total root length, primary root length, lateral root length (sum of secondary and tertiary roots), root system depth (maximal vertical depth of the root system), and the number of secondary roots. The number of secondary roots was counted manually from the images. Additionally, the number of secondary roots per centimetre of the primary root (secondary root density) was quantified.

In order to investigate the spatial distribution of roots in different soil layers, total root lengths were separately analyzed in the upper (0-30 cm), and in the lower soil layer (30-60 cm) of the 60 cm deep rhizotrons at 14 dai.

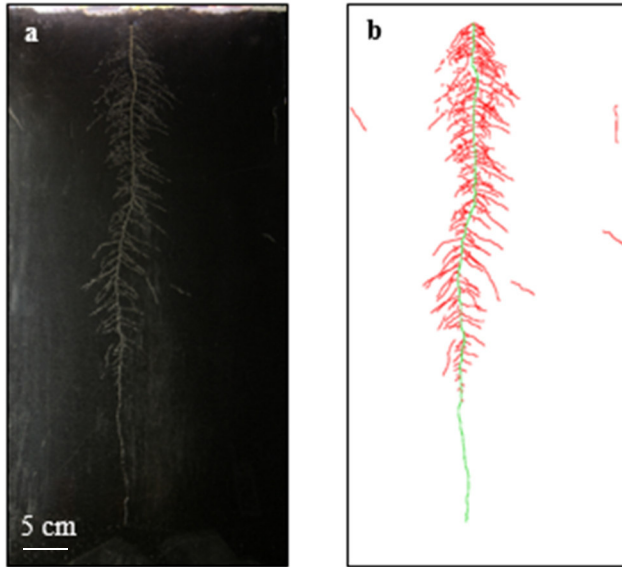


Figure 1 a-b: a) Representative original and b) colour-coded image of sugar beet root system. Primary root (in green) and lateral roots (in red) of a non-infected, three week old sugar beet plant, grown in a soil-filled rhizotron.

Statistical analysis

SigmaPlot 12.5 (SYSTAT) was used for statistical analysis. Oneway ANOVA on ranks (Kruskal-Wallis) was used to compare single traits of primary, lateral and total root lengths and root system depth of control and BCN-infected plants for all genotypes at 6, 10 and 14 dai (Figure 2, Table S1; Table S2; Table S3, respectively). In addition, this test was used to compare number of secondary roots (Figure 5a) and root length densities (Figure 3) between the BCN-infected and between the control plants at 14 dai.

The traits of primary, lateral and total root lengths and root system depth of infected versus non-infected condition were compared by nonparametric Mann-Whitney-U-Test (Figure 2, Table S1; Table S2; Table S3). Furthermore, this test was used to compare root length densities (Figure 3), root system depth (Figure 4), number of secondary roots (Figure 5a) and secondary root density (Figure 5b) of infected versus non-infected plants at 14 dai.

Results

To analyze whether BCN infection has an effect on root development, different root growth traits for BCN-infected and non-infected genotypes were phenotyped at 6, 10 and 14 days after infection (dai). In general, we found the values of all analysed root traits were higher in non-infected plants than in infected at all measured time points. At 6 dai, the root growth traits differed only slightly between infected and non-infected variants per genotype (Figure 2a; Table S1). However, values of all analysed root traits increased at 10 dai (Figure 2b; Table S2) and were even more increased at 14 dai (Figure 2c; Table S3). The relative reductions (% difference between control and BCN-infected condition) of root growth traits caused by BCN tended to increase with plant age. Consequently, in the following paragraphs we focused on the results at 14 dai.

At the measuring time point of 14 dai, the susceptible genotype *Beretta* revealed the highest values of all analysed root traits under control condition. In contrast, in BCN infected condition at least two of the tolerant genotypes (*Kleist*, *Lisanna*) had higher values of the analyzed root traits compared to intolerant genotypes (Figure 2c; Table S3). Values of all quantified traits were consistently lower in the resistant genotype with and without BCN infection compared to the other genotypes.

Root lengths

Genotypes differed significantly in their primary root length, but not in lateral and total root lengths at 14 dai in control and under BCN infected conditions (Figure 2c; Table S3). The resistant genotype *Nemata* exhibited shorter primary roots compared to the tolerant genotype *Lisanna* in both conditions (Figure 2c; Table S3). All other genotypes showed no significant differences in primary root lengths compared to *Nemata* and *Lisanna*.

The relative reduction of primary, lateral, and total root lengths caused by BCN were highest in the case of the susceptible genotype *Beretta* (46%, 57% and 55%, respectively). *Lisanna* exhibited the lowest reductions of primary, lateral, and total root length (25%, 31% and 31%, respectively) upon BCN infection compared to non-infected plants (see differences Figure 2c). All root types of the resistant genotype *Nemata* were less reduced compared to the two tolerant varieties *Lisanna* and *Kleist*. Only the relative reductions of lateral and total

root length of one tolerant genotype (*Adrianna*) were higher compared to the resistant genotype *Nemata*.

To sum up, less reduction in root lengths were exhibited for tolerant and resistant genotypes compared to the susceptible genotype, *Beretta* (Figure 2c). Only the reduction of primary root length was extensive for the susceptible (*Beretta*, 46%) and resistant genotypes (*Nemata*, 43%), whereas all three tolerant genotypes showed the smallest reductions of the primary root length (*Lisanna* 25%, *Adrianna* 31%, *Kleist* 34%) (Figure 2c).

Spatial distribution of root system

As shown for primary root length also the root system depth was less reduced in tolerant genotypes (*Lisanna* 17%, *Kleist* 27% *Adrianna* 30%) compared to susceptible (*Beretta*, 36%) and resistant genotypes (*Nemata*, 41%). The tolerant genotypes *Kleist* and *Lisanna* rooted deeper than the resistant genotype *Nemata* when infected with BCN (Figure 4; Table S3).

The five genotypes exhibited no significant differences in **root length densities in the upper (depth 0-30 cm) or the lower (depth 30-60 cm) soil layers** under both, control and BCN-infected conditions (Figure 3). Independent of the treatment, all genotypes produced longer roots in the upper compared to the lower soil layer (Figure 3).

In the upper soil layer, root length densities of susceptible and resistant genotypes were significantly decreased by 45% upon BCN infection. Tolerant genotypes exhibit less decreased root length densities (23-32%) compared to the intolerant genotypes. However this reduction found in tolerant genotypes compared to control condition was not significant (Figure 3a). In the lower soil layer, root lengths were also reduced, however, no significant differences between control conditions and BCN infection were found (Figure 3b).

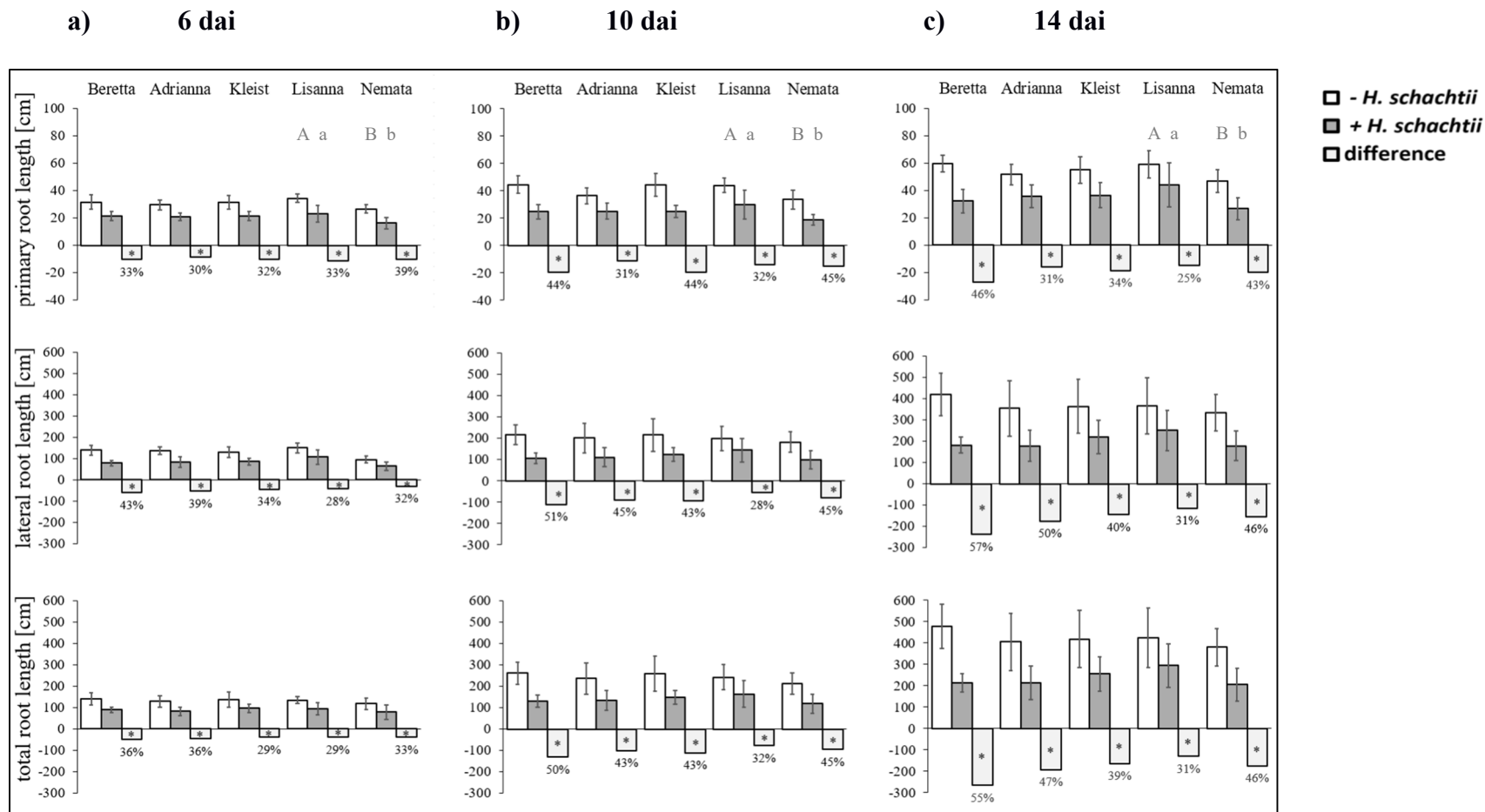


Figure 2: Effect of BCN infection on development of primary, lateral and total root lengths on different sugar beet genotypes Means \pm standard deviations for control (-) and BCN-infected plants (+) are shown a) at 6 dai; b) at 10 dai; c) at 14 dai. Furthermore, the total and relative growth differences are shown for each trait, genotype and time point.

n=12 per genotype, treatment and time point. *Beretta* is the susceptible genotype, whereas *Nemata* is the resistant genotype. *Adrianna*, *Kleist* and *Lisanna* are the tolerant genotypes. Statistical significance with $P \leq 0.05$ indicated with uppercase letters for (-), with lowercase letters for (+) and with asterisks for differences, respectively.

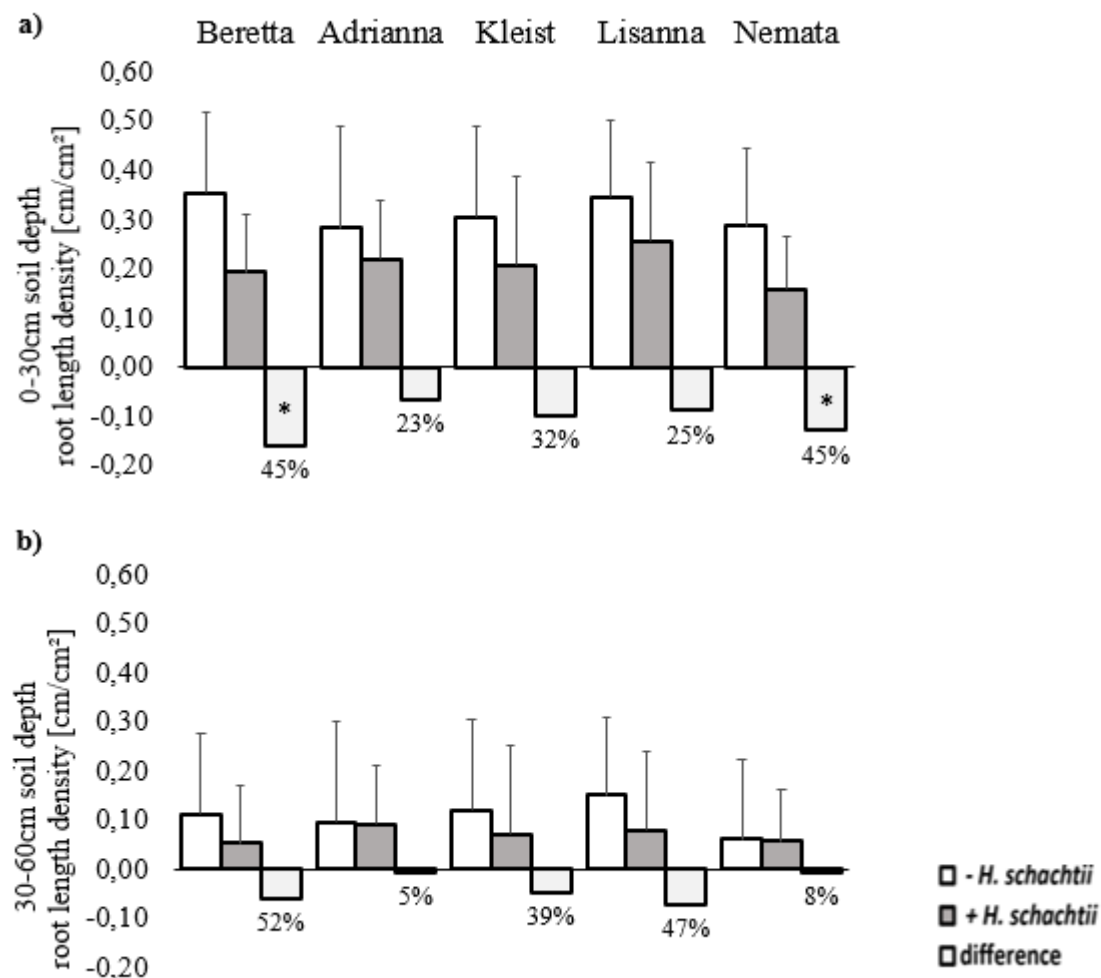


Figure 3 a-b: Effect of BCN infection on root lengths densities at different depths on different sugar beet genotypes in upper (a) and lower (b) soil layers of rhizotron

Means \pm standard deviations for control (-) and BCN-infected plants (+) are shown at 14 dai. Furthermore, the total and relative growth differences are shown for each trait, genotype and time point.

n=12 per genotype, treatment and time point. *Beretta* is the susceptible genotype, whereas *Nemata* is the resistant genotype. *Adrianna*, *Kleist* and *Lisanna* are the tolerant genotypes. Statistical significance with $P \leq 0.05$ indicated with uppercase letters for (-), with lowercase letters for (+) and with asterisks for differences, respectively.

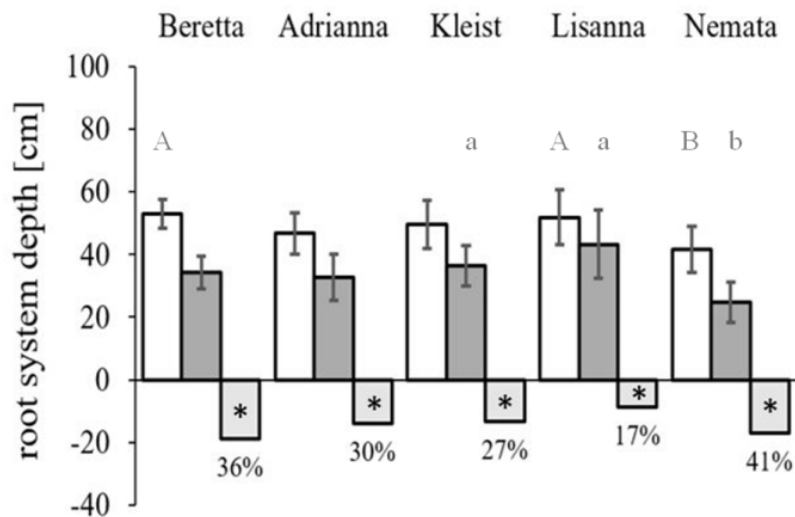


Figure 4: Effect of BCN infection on root system depth on different sugar beet genotypes
Means \pm standard deviations for control (-) and BCN-infected plants (+) are shown at 14 dai. Furthermore, the total and relative growth differences are shown for each trait, genotype and time point.

n=12 per genotype, treatment and time point. *Beretta* is the susceptible genotype, whereas *Nemata* is the resistant genotype. *Adrianna*, *Kleist* and *Lisanna* are the tolerant genotypes. Statistical significance with $P \leq 0.05$ indicated with uppercase letters for (-), with lowercase letters for (+) and with asterisks for differences, respectively.

Number of secondary roots

In order to analyze whether secondary roots are influenced by BCN infection at the early growth stage of sugar beet, the number of secondary roots were quantified for each genotype. Under control conditions the susceptible and the tolerant genotypes exhibited more secondary roots compared to the resistant genotype *Nemata*. In contrast, under BCN infected condition only the tolerant genotype *Lisanna* showed significant more secondary roots than *Nemata* (Figure 5a).

The number of secondary roots was reduced in all genotypes upon BCN infection (Figure 5a, Table S3) compared to control condition. The highest reduction of secondary roots was obtained in the susceptible genotype *Beretta* (43%), whereas lowest reduction was observed with the tolerant genotype *Lisanna* (28%) (Figure 5a).

To verify whether a BCN infection causes an increase in secondary roots, also the number of secondary roots is determined per cm primary root (secondary root density). The secondary root density (Figure 5b) was slightly but not significantly increased in most genotypes upon BCN infection compared to control condition, except of the tolerant genotype *Adrianna* which showed a slight, but not significant reduction. Secondary root density was more increased by BCN for intolerant genotypes (susceptible: +10%; resistant: +20%) than for the tolerant genotypes, *Kleist* and *Lisanna* (+4% and 3%) (Figure 5b). Consequently, neither the number of secondary roots nor the secondary root density did increase in three week old susceptible, tolerant or resistant genotypes 14 days upon BCN infection.

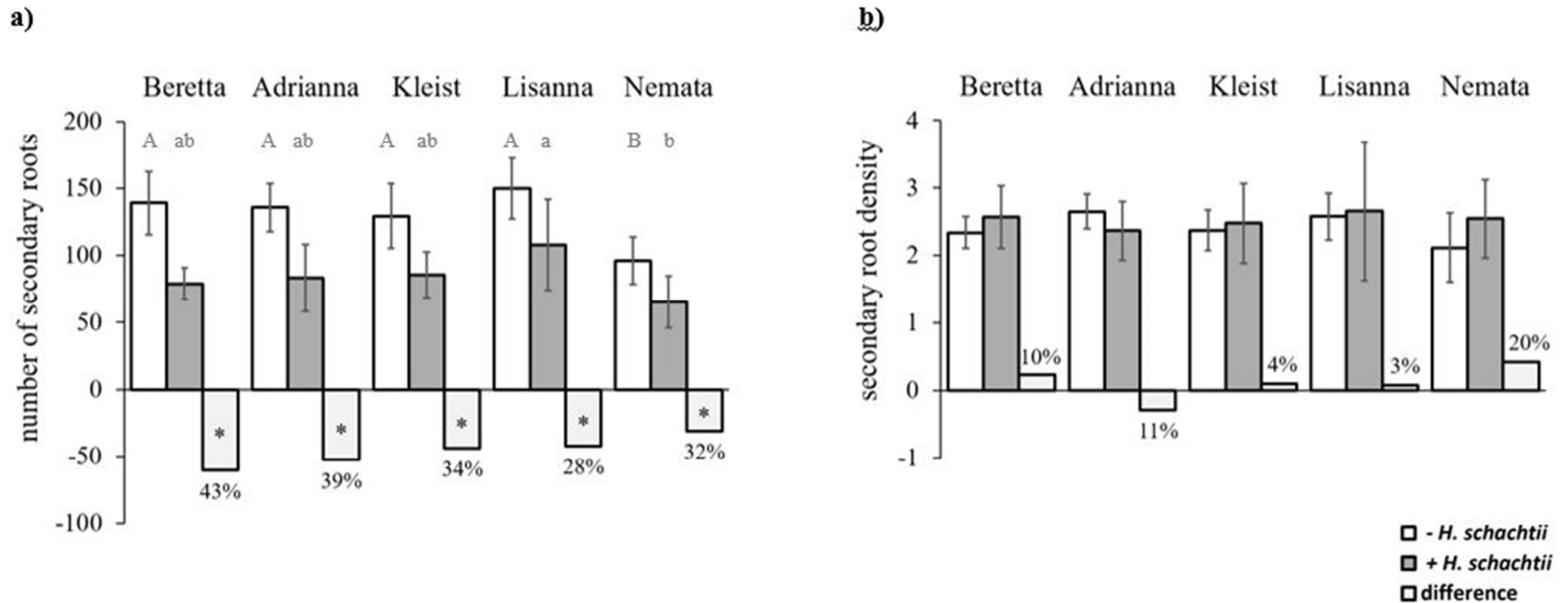


Figure 5 a-b: Effect of BCN infection on number of secondary roots (a) and secondary root density [cm/cm²] (b) on different sugar beet genotypes

Means ± standard deviations for control (-) and BCN-infected plants (+) are shown at 14 dai. Furthermore, the total and relative growth differences are shown for each trait, genotype and time point.

n=12 per genotype, treatment and time point. *Beretta* is the susceptible genotype, whereas *Nemata* is the resistant genotype. *Adrianna*, *Kleist* and *Lisanna* are the tolerant genotypes. Statistical significance with $P \leq 0.05$ indicated with uppercase letters for (-), with lowercase letters for (+) and with asterisks for differences, respectively.

Discussion

In this study the effect of BCN infection to only three weeks old root systems of one susceptible, one resistant and three tolerant sugar beet genotypes were analyzed to understand root system responses to stress by BCN infection. Knowledge about genotype specific responses might be helpful to include phenotyping of root growth traits in future breeding programs for early selection of sugar beet candidates or genotypes which show high tolerance and resistance to BCN. In this study, by a non-invasively phenotyping method we found that root lengths and root system distribution of all genotypes is affected by BCN and that genotypes show differences in BCN response. In the following paragraphs the effect of BCN to several root growth traits of tolerant and intolerant genotypes will be discussed.

Effect of BCN to secondary roots

BCN infection leads to an increase in the number of secondary roots (Kämpfe, 1952; Moriarty, 1964; Cooke, 1987). In contrast to sugar beet of later growing to harvest stages, the only three week old plants of our study show no increase neither in secondary roots (Figure 5a) nor secondary root density by BCN infection (Figure 5b). Similarly, Gierth (2005) found no increase in the number of secondary roots of three-to-nine-week-old susceptible and tolerant sugar beets even though the plants were infected with higher number of J2s (2,400 J2s per 100 g of soil). In another experiment, Gierth (2005) simulated BCN infection (by halving the primary root manually) to study compensatory root growth. Similar to the BCN infected plants, the manually hurted plants, showed no significant increase of secondary roots. In contrast to our and Gierth' results, Hillnhütter et al. (2012) observed a considerably higher number of secondary roots in the susceptible sugar beet genotype *Alyssa* infected with 4,000 J2s four weeks after infection at plant age of eight weeks. Therefore, it might be possible that the number of secondary roots occurs at a later age of plant growth in combination with a very high level of nematode infection. We suggest that plant age, type of genotype, time point of inoculation and number of inoculated J2s could cause the discrepancy in the results. Furthermore, the difference could be a result of different phenotyping methods of both studies. Hillnhütter et al. (2012) measured roots in 3D using MRI (magnetic resonance imaging), while we quantified root traits from 2D images of rhizotrons. While in rhizotrons part of the root system is not visible at the

transparent surface, in MRI it depends on the diameter of roots if they could be detected. So in both systems it could be that parts of the lateral roots are missed, but the percentage could differ between both methods. We speculate that compensatory root growth stimulated by BCN may well occur at later ages especially in susceptible genotypes to drain the plants' energy (Kämpfe, 1952; Moriarty, 1964; Cooke, 1987). However, our study showed for three week old plants that number of secondary roots was negatively affected (Figure 5a), whereas secondary root density was not affected by BCN (Figure 5b). Therefore, in BCN infected plants reduced nutrient and water supply could occur in all genotypes about same values.

Effect of BCN to root system depth

In relation to its genotype, plant root systems can adapt against biotic and abiotic stresses. When a plant or genotype show deeper root systems under stress the plant is able to extract water and nutrients from deeper soil layers, which can help the plant to avoid or overcome the stress (reviewed in Wasaya et al., 2018). A deeper root system would therefore also explain the ability to perform higher yield. In comparison to intolerant genotypes, tolerant sugar beet genotypes were shown to gain higher yield than intolerant genotypes when infected with BCN (Reuther et al., 2016). Gierth (2005) showed the tolerant sugar beet genotype *Nematop* rooted deeper than the susceptible genotype *Penta* in deep tubes (10 x 50 cm) when infected with BCN. In this study, the used rhizotrons allowed the root system to grow up to a depth of 60 cm, but contradictory to the study of Gierth (2005) none of the tolerant genotypes rooted deeper than the susceptible genotype *Beretta* (Figure 4). We assume that differences in time, genotypes and density of J2 inoculation cause the discrepancy of results. Gierth (2005) used slightly different genotypes and methods compared to our study. She inoculated plants with double amount of J2s ten days later compared to our study. Here, BCN infection takes already place one week after sowing. We assume that nematode inoculation at 10 days older sugar beet plants enhances the likelihood of differences in root system depth, as shown by Gierth (2005). However, we expect that at later growing stages tolerant genotypes shows distinct deeper root system compared to intolerant genotypes under BCN-infection. To study the root system depth of later plant stages the use of deeper rhizotrons or field studies would be necessary.

Effect of BCN of root lengths

We found that primary root lengths differed among tested genotypes, whereas values of total and lateral root length were similar among the non-infected sugar beet genotypes and the BCN-infected plants (Figure 2; Table S1-S3). For non-infected plants at the same age, no differences of primary and lateral root lengths between susceptible, tolerant and resistant sugar beet genotypes were phenotyped in hydroponic culture by Wright et al. (2018). Since water and nutrients are available in the nutrient solution, we speculate that in hydroponics root systems show longer lateral roots and shorter primary roots. Consequently, comparison is not reliable.

In this study, tolerant genotypes showed longer roots (and root length densities) for the single soil layers compared to intolerant genotypes (Figure 3). We therefore expect that already three week old plants of the tolerant genotype can extract more water and nutrients and can build up more biomass, which might help to develop high yields later in the season even though infected with nematodes. However, the genotypes biomass was not analyzed in our study.

Stanton & Fisher (1988), proposed the root length of wheat for yield estimation. Before, Matos and Franco (1981) described nematode infected tolerant potato genotypes with ability to develop and maintain an abundant root system. Pertaining above all the longer primary root length in our study (as the later harvest organ) may explain the known effect on yield of tolerant sugar beet genotypes compared to the intolerant genotypes (Reuther et al., 2017). This fits to visible phenotyping results of Joalland et al. (2016), whom showed that the first 30 days of sugar beet growth under BCN infested field condition are most essential for the genotype-specific final yield.

Next to the root system depth and size, other studies analyzed physiological parameters that might explain higher yield performance of nematode tolerant genotypes compared to intolerant genotypes. Evans and Haydock (1990) assumed that tolerant genotypes suffer less stress and therefore establish larger root systems despite the nematode infection. Differences in phytohormone levels between tolerant and susceptible genotypes could influence tolerance and the ability to host BCN. For example, infected tolerant potatoes (Evans, 1982) and oats (Volkmar, 1989) had reduced levels of the stress hormone abscisic acid compared to intolerant plants. Wright et al., 2018 showed that sucrose content seems not to be suitable to highlight tolerance mechanism under

non-infected conditions (Wright et al. 2018). However, to our knowledge, phytohormone levels or sucrose content of BCN-infected tolerant and intolerant sugar beet genotypes have not yet been investigated. Latest studies showed contents of chlorophyll, nitrogen and water to be positively correlated to the level of tolerance in sugar beet genotypes under BCN-infested field condition (Joalland et al., 2018). The authors used non-invasive methods, which allow selection of tolerant from intolerant genotypes before harvest time (from beginning of row closure) in the field. In contrast, the here used phenotyping of sugar beet genotypes' root traits in rhizotrons allow an earlier (around 4-leaf stage) selection. As shown in the next paragraph, the result of BCN response can be used to distinguish between tolerant and intolerant sugar beet genotypes.

Root response of tolerant and intolerant genotypes to BCN

This study shows that BCN infection did not affect root growth of tolerant genotypes to the extent observed in intolerant genotypes. The values of all measured root growth traits were strongly decreased (strong response) by BCN in susceptible genotypes, while root growth traits in tolerant genotypes recorded lowest reductions (less pronounced response) when infected with BCN.

To sum up the BCN response results of our study: The root length density was not affected at all by BCN in tolerant genotypes, whereas intolerant genotypes were reduced by BCN in the upper soil layer (Figure 3). Especially in the upper 30 cm of soil layer (Figure 3) tolerant genotypes showed a more resilient root system compared to intolerant genotypes. The primary root length and root system depth all three tolerant genotypes and the lateral root lengths of two tolerant genotypes (*Kleist* and *Lisanna*) were less decreased by BCN compared to the intolerant genotypes (*Beretta* and *Nemata*) (Figure 2, Figure 4, Table S3). Observations of minimal total root length response were previously reported for tolerant potato (Evans & Haydock, 1990) and oat (Volkmar, 1989), but is shown here the first time for very young BCN-infected sugar beet genotypes.

These results are assumed to further influence the BCN reproduction, and the yield performance of the beet later in the season. Wilson et al. (1983) already suggested that nematode tolerance could also be connected to resistance. They selected wheat tolerant to *H. avenae* by choosing those individuals with vigorous root development and little

symptom development. In general, a bigger root system might create a greater opportunity for the nematodes to develop (Jones and Kempton (1978)). In contrast, Reuther et al. (2017) showed that susceptible sugar beet genotypes allowed higher BCN reproduction compared to moderately resistant (tolerant) genotypes, but same genotypes showed smaller root system upon BCN infection in this study. Commercial tolerant sugar beet genotypes seem to connect high levels of tolerance and resistance. Consequently, selecting those sugar beet genotypes showing less root system response to BCN would also select genotypes which allow only few development of BCN.

Root trait phenotyping allow early selection of genotypes

It is important to note that the here shown differences in root growth traits of sugar beet genotypes -processing different levels of tolerance and resistance- are already visible at an early growth stage 21 day old sugar beet, 14 dai when plants reached 4-leaf stage. Therefore, the measured root growth traits (except the number of secondary roots) could serve as very early indicators to predict genotypes' tolerance and resistance to BCN. At 14 dai the primary root length (Figure 2c) and the root system depth (Figure 4) were the root traits which were less reduced in all three analyzed tolerant genotypes compared to intolerant genotypes. Therefore, we suggest these traits as easily measurable indicators to estimate the host status and the effect of nematodes in very young sugar beet plants. Our results indicate that non-invasive root phenotyping in rhizotrons enables fast and efficient monitoring of BCN effects on roots and therefore facilitates the screening and selection of tolerant sugar beet genotypes or candidates in breeding programmes.

Acknowledgements

The work was supported by the project partners of the research project „Zukunft Zuckerrübe“: Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Ernährung, Weinbau und Forsten Rheinland-Pfalz, Kuratorium für Versuchswesen und Beratung im Zuckerrübenanbau, Hessisches Ministerium für Umwelt, Klimaschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Strube Research GmbH & Co. KG and Stiftung Südwestdeutscher Zuckerrübenanbau. The work at the Jülich Plant Phenotyping Centre is institutionally funded by the Helmholtz Association. We are indebted to Phil Pstrong, Carmen Müller, Beate Uhlig, and Marcel Schneider for technical assistance in the greenhouse experiments. We acknowledge Shahid M. Siddique and Shree Pariyar for scientific support.

References

- Cooke, D. A. (1987). Beet Cyst Nematode (*Heterodera schachtii* Schmidt) and its Control on Sugar Beet. *Agricultural Zoology* 2,135-183.
- Davis, E. L., Hussey, R. S. & T. J. Baum (2004). Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends Parasitol.* 20,134-141.
- Evans, K. & P. P. J. Haydock (1990). A review of tolerance by potato plants of cyst nematode attack, with consideration of what factors may confer tolerance and methods of assaying and improving it in crops. *Ann. Appl. Biol.* 117,703-740.
- Evans, K. (1982). Water use, calcium uptake and tolerance of cyst-nematode attack in potatoes. *Potato Research* 25,71-88.
- Gardner, M., Verma, A. & G. Mitchum (2015). Emerging Roles of Cyst Nematode Effectors in Exploiting Plant Cellular Processes. In: Escobar, C. & C. Fenoll *Advances in Botanical Research, Plant Nematode Interactions: A View on Compatible Interrelationships*. Academic Press. pp. 259-292.
- Gierth, K. (2005). Pflanzenmorphologische und -physiologische Untersuchungen zur Toleranz in der Wirt-Parasit-Interaktion *Beta vulgaris* - *Heterodera schachtii*. Dissertation. Rheinische-Friedrich-Wilhelm Universität Bonn.
- Grundler, F. M. W. & J. Hofmann (2011). Water and nutrient transport in nematode feeding sites. In: *Genomics and Molecular Genetics of Plant Nematode Interactions*. pp. 432-439.

- Hewezi, T., Howe, P. J., Maier, T. R., Hussey, R. S., Mitchum, M. G., Davis, E. L. & T. J. Baum (2010). Arabidopsis spermidine synthase is targeted by an effector protein of the cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Plant Physiology*, 152, 968-984.
- Hillnhütter, C., Sikora, R. A., Oerke, E.-C. & D. van Dusschoten (2012). Nuclear magnetic resonance a tool for imaging belowground damage caused by *Heterodera schachtii* and *Rhizoctonia solani* on sugar beet. *Journal of Experimental Botany* 1,319–327.
- Hofmann, J. & F. M. W. Grundler (2007). How do nematodes get their sweets? Solute supply to sedentary plant-parasitic nematodes. *Nematology* 9(4),451-458.
- Joalland, S., Screpanti, C., Varella, H. V., Reuther, M., Schwind, M., Lang, C., Walter, A. & F. Liebisch (2018). Aerial and ground based sensing of tolerance to beet cyst nematode in sugar beet. *Remote Sensing* 10(787), pp. 1-21.
- Joalland, S., Screpanti, C., Liebisch, F., Varella, H. V., Gaume, A. & A. Walter (2017). Comparison of visible imaging, thermography and spectrometry methods to evaluate the effect of *Heterodera schachtii* inoculation on sugar beets. *Plant Methods* 13,73
- Jones, F. G. W. & R. A. Kempton (1978). Population dynamics, population models and integrated control. In: J. F. Southey (ed.) *Plant Nematology*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food/Agricultural Development and Advisory Service publication GDI, HMSO, London pp. 333-361.
- Kammerhofer, N., Radakovic, Z., Regis, M. A. J., Dobrev, P., Vankova, R., Grundler, F. M. W., Siddique, S., Hofmann, J. & K. Wiczorek (2015). Role of stress-related hormones in plant defence during early infection of the cyst nematode *Heterodera schachtii* in Arabidopsis. *New Phytologist* 207,778-789.
- Kämpfe, L. (1952). *Rüben- und Kartoffelälchen*. Akad: Verlagsgesellsch. Geest & Portig K.-G., Leipzig. 40.
- Lee, C., Chronis, D., Kenning, C., Peret, B., Hewezi, T., Davis, E. L., Baum, T. J. Hussey, R., Bennett, M. & M. G. Mitchum (2011). The novel cyst nematode effector protein 19C07 interacts with the Arabidopsis auxin influx transporter LAX3 to control feeding site development. *Plant Physiol.* 155,866-880.
- Lynch, J. (1995). Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol.* 109,7–13.
- Matos, A. & J. Franco (1981). Comportamiento de 10 cultivares comerciales de papa al ataque y multiplicacion de *Globodera pallida* (P₄A). *Fitopatologia* 16,48-54.
- Müller, J. (1999). The economic importance of *Heterodera schachtii* in Europe. *Helminthologia* 36,205–213.
- Moriarty, F. (1964). The monoxenic culture of beet eelworm (*Heterodera schachtii* Schm.) on excised roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Parasitology* 54,289–293.

- Mühlich, M., Truhn, D., Nagel, K. A., Walter, A., Scharr, H. & T. Aach (2008). Measuring plant root growth. In 'Lecture notes in computer science 5096'. (Ed. G Rigoll) Springer-Verlag: Heidelberg, Germany pp. 497–506.
- Nagel, K. A., Schurr, U. & A. Walter (2006). Dynamics of root growth stimulation in *Nicotiana tabacum* in increasing light intensity. *Plant Cell Environ.* 29,1936-1945.
- Nagel, K. A., Kastenholz, B., Jahnke, S., van Dusschoten, D., Aach, T., Mühlich, M., Truhn, D., Scharr, H., Terjung, S., Walter, A. & U. Schurr (2009) Temperature responses of roots: impact on growth, root system architecture and implications for phenotyping. *Functional Plant Biol.* 36,947-959.
- Nagel, K. A., Putz, A., Gilmer, F., Heinz, K., Fischbach, A., Pfeifer, J., Faget, M., Blossfeld, S., Ernst, M., Dimaki, C., Kastenholz, B., Kleinert, A. - K., Galinski, A., Scharr, H., Fiorani, F. & U. Schurr (2012). GROWSCREEN-Rhizo is a novel phenotyping robot enabling simultaneous measurements of root and shoot growth for plants grown in soil-filled rhizotrons. *Functional Plant Biol.* 11,891-904.
- Reuther, M., Lang, C. & F. M. W. Grundler (2017). Nematode-tolerant sugar beet genotypes – resistant or susceptible to the Beet Cyst Nematode *Heterodera schachtii*? *Sugar Industry* 142,277-284.
- Sachs, J. (1873). Über das Wachstum der Haupt-und Nebenwurzeln. *Arbeiten des Botanischen Instituts zu Würzburg* 3,395–477.
- Siddique, S., Radakovic, Z., De La Torre, C. M., Chronis, T., Novák, O., Raireddy, W., Holbein, J., Matera, C., Hütten, M., Gutbrod, P., Anjam, M. S., Rozanska, E., Habash, S., Elashry, A., Sobczak, M., Kakimoto, T., Strnad, M., Schmülling, T., Mitchum, M. G. & F. M. W. Grundler (2015). A parasitic nematode releases cytokinin that controls cell division and orchestrates feeding site formation in host plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112(4),12669-12674.
- Siddique, S. & Grundler, F. M. W. (2018). Parasitic nematodes manipulate plant development to establish feeding sites. *Current Opinion in Microbiology* 46,102–108.
- Stanton, J. M. & J. M. Fisher (1988). Factors of early growth associated with tolerance of wheat to *Heterodera avenae*. *Nematologica* 43,188-197.
- Swarup, K., Benková, E. & R. Swarup (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology.* 10,946–954.
- Trudgill, D. L. & L. M. Cotes (1983). Tolerance of potato to potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* and *G. pallida*) in relation to the growth and efficiency of the root system. *Annals of Applied Biology* 102,385-397.
- Trudgill, D. L. (1986). Concepts of resistance, tolerance and susceptibility in relation to cyst nematodes. In: Lamberti, F. & C. E. Taylor (eds.) *Cyst Nematodes*. New York and London Plenum Press. pp. 179-187.

- Volkmar, K. M. (1989). Cereal Cyst Nematode (*Heterodera avenae*) on Oats. II. Early Root Development and Nematode Tolerance. *Journal of Nematology* 21(3),384-391.
- Wilson, R. E., Hollamby, F. J. & A. Bayraktar (1983). Breeding for resistance and tolerance to cereal cyst nematode in wheat. *Proceedings of the Australian Plant Breeding Conference, Adelaide, 14-18 February.* pp. 225-227.
- Wright, A. J. D., Bussell, J. S., Stevens, M., Back, M. A. & D. L. Sparkes (2018). Physiological differences between sugar beet genotypes susceptible, tolerant or resistant to the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii* (Schmidt) under uninfested conditions. *European Journal of Agronomy* 98,37-45.
- Wyss, U. & U. Zunke (1986). Observations on the behaviour of second stage juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. *Revue Nématol.* 9(2),153-165.
- Zhang, C. L., Xu, D. C., Jiang, X. C., Zhou, Y., Cui, J., Zhang, C. X., Chen, D. F., Fowler, M. R., Elliott, M. C., Scott, N. W., Dewar, A. M. & A. Slater (2008). Genetic approaches to sustainable pest management in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Ann. Appl. Biol.* 152 (2),143–15.

Supplementary material for:**Non-invasive phenotyping reveals differences in sugar beet root growth related to tolerance and resistance to the Beet Cyst Nematode *Heterodera schachtii***

Marie Reuther^{1,2}, Christian Lang¹, Kerstin A. Nagel³, Florian M. W. Grundler²

¹Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V., Rathenaustraße 10, 67547 Worms, Germany

²Universität Bonn, INRES-Molekulare Phytomedizin, Karlrobert-Kreiten Straße 13, 53113 Bonn, Germany

³IBG-2: Plant Sciences, Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Jülich, Germany

*grundler@uni-bonn.de

Table S1: Comparison of genotype-specific root traits of BCN-treated (+) and non-treated plants (-) at 6 dai

Plant age was 13 days. *Beretta* is the susceptible genotype, whereas *Nemata* is the resistant genotype. *Adrianna*, *Kleist* and *Lisanna* are the tolerant genotypes.

Genotype	<i>H. schachtii</i>	Primary root length [cm]		Lateral root length [cm]		Total root length [cm]		Root system depth [cm]	
<i>Beretta</i>	-	31.65 ± 5.42	ab	107.95 ± 25.17	a	139.60 ± 28.47	a	28.63 ± 4.92	ab
	+	21.33 ± 3.36	AB	86.13 ± 10.78	A	89.46 ± 13.02	A	19.55 ± 3.14	AB
<i>Adrianna</i>	-	29.61 ± 3.65	ab	99.73 ± 26.88	a	129.34 ± 26.44	a	27.20 ± 3.71	ab
	+	20.81 ± 2.94	AB	61.84 ± 19.52	A	82.66 ± 19.39	A	18.89 ± 2.57	AB
<i>Kleist</i>	-	31.40 ± 5.11	ab	104.44 ± 31.94	a	135.84 ± 35.28	a	28.71 ± 4.55	ab
	+	21.33 ± 3.20	AB	74.94 ± 18.93	A	96.27 ± 19.80	A	19.64 ± 3.11	AB
<i>Lisanna</i>	-	34.36 ± 3.05	a	100.61 ± 16.07	a	134.97 ± 16.60	a	30.88 ± 3.29	a
	+	23.19 ± 6.00	A	72.21 ± 23.22	A	95.40 ± 27.76	A	21.42 ± 5.29	A
<i>Nemata</i>	-	26.66 ± 2.88	b	90.93 ± 25.99	a	117.59 ± 27.63	a	28.63 ± 4.92	b
	+	16.37 ± 4.19	B	62.66 ± 30.62	A	79.03 ± 34.04	A	19.55 ± 3.14	B

Means ± standard deviations. Different significant lowercase letters indicate statistical significance with $P \leq 0.05$ between root growth traits without BCN treatment (-); different significant uppercase letters indicate statistical significance with $P \leq 0.05$ between root growth traits with BCN-treatment (+). Asterisks indicate statistical significance with $P \leq 0.05$ between treatments (- vs. +).

Table S2: Comparison of genotype-specific root traits of BCN-treated (+) and non-treated plants (-) at 10 dai

Plant age was 17 days. *Beretta* is the susceptible genotype, whereas *Nemata* is the resistant genotype. *Adrianna*, *Kleist* and *Lisanna* are the tolerant genotypes.

Genotype	<i>H. schachtii</i>	Primary root length [cm]		Lateral root length [cm]		Total root length [cm]		Root system depth [cm]	
<i>Beretta</i>	-	44.52 ± 6.48	ab	216.94 ± 46.90	a	261.46 ± 51.46	a	39.80 ± 5.86	ab
	+	24.81 ± 5.32	AB	105.73 ± 24.06	A	130.55 ± 28.69	A	22.73 ± 5.01	AB
<i>Adrianna</i>	-	36.51 ± 5.83	ab	200.46 ± 70.81	a	236.97 ± 73.67	a	34.65 ± 4.50	ab
	+	25.04 ± 5.94	AB	110.35 ± 44.84	A	135.39 ± 46.86	A	23.18 ± 5.00	AB
<i>Kleist</i>	-	44.35 ± 8.14	ab	214.46 ± 75.52	a	258.81 ± 81.97	a	40.39 ± 6.99	a
	+	24.96 ± 4.59	AB	122.74 ± 31.43	A	147.70 ± 31.61	A	23.24 ± 3.79	AB
<i>Lisanna</i>	-	43.93 ± 5.45	a	198.24 ± 56.41	a	242.17 ± 58.59	a	39.25 ± 5.27	a
	+	29.95 ± 10.71	A	134.49 ± 55.57	A	164.43 ± 63.63	A	28.46 ± 8.65	A
<i>Nemata</i>	-	33.66 ± 6.96	b	180.61 ± 48.06	a	214.27 ± 49.95	a	30.84 ± 5.19	b
	+	18.61 ± 3.93	B	99.69 ± 40.02	A	118.30 ± 45.33	A	16.97 ± 3.52	B

Means ± standard deviations. Different significant lowercase letters indicate statistical significance with $P \leq 0.05$ between root growth traits without BCN treatment (-); different significant uppercase letters indicate statistical significance with $P \leq 0.05$ between root growth traits with BCN-treatment (+). Asterisks indicate statistical significance with $P \leq 0.05$ between treatments (- vs. +).

Table S3: Comparison of genotype-specific root traits of BCN-treated (+) and non-treated plants (-) at 14 dai

Plant age was 21 days. *Beretta* is the susceptible genotype, whereas *Nemata* is the resistant genotype. *Adrianna*, *Kleist* and *Lisanna* are the tolerant genotypes.

Genotype	<i>H. schachtii</i>	Primary root length [cm]	Lateral root length [cm]	Total root length [cm]	No. of secondary roots	Root system depth [cm]
<i>Beretta</i>	-	59.29 ± 6.12 ab *	419.49 ± 100.16 a *	478.78 ± 104.34 a *	139.20 ± 23.60 a *	52.97 ± 4.54 a *
	+	32.07 ± 8.54 AB	181.05 ± 36.99 A	213.12 ± 43.18 A	79.10 ± 11.87 AB	34.11 ± 5.24 AB
<i>Adrianna</i>	-	51.57 ± 7.44 ab *	353.92 ± 130.97 a *	405.49 ± 133.14 a *	135.73 ± 18.13 a *	46.73 ± 6.56 ab *
	+	35.52 ± 8.22 AB	177.85 ± 72.72 A	213.36 ± 77.56 A	83.33 ± 25.08 AB	32.75 ± 7.38 AB
<i>Kleist</i>	-	54.88 ± 9.85 ab *	364.33 ± 127.38 a *	419.21 ± 135.61 a *	129.27 ± 24.12 a *	49.65 ± 7.60 ab *
	+	36.26 ± 9.19 AB	218.90 ± 78.06 A	255.16 ± 79.45 A	85.64 ± 17.18 AB	36.43 ± 6.49 A
<i>Lisanna</i>	-	58.95 ± 9.93 a *	365.32 ± 131.14 a *	424.27 ± 138.25 a *	149.83 ± 22.81 a *	51.88 ± 8.60 a *
	+	43.93 ± 16.05 A	250.40 ± 93.42 A	294.48 ± 101.82 A	107.83 ± 33.93 A	43.27 ± 10.90 A
<i>Nemata</i>	-	46.65 ± 8.36 b *	333.37 ± 86.33 a *	380.02 ± 88.30 a *	96.17 ± 17.78 a *	41.69 ± 7.37 b *
	+	26.61 ± 7.98 B	178.39 ± 70.11 A	205.00 ± 76.45 A	65.40 ± 19.29 B	24.64 ± 6.42 B

Means ± standard deviations. Different significant lowercase letters indicate statistical significance with $P \leq 0.05$ between root growth traits without BCN treatment (-); different significant uppercase letters indicate statistical significance with $P \leq 0.05$ between root growth traits with BCN-treatment (+). Asterisks indicate statistical significance with $P \leq 0.05$ between treatments (- vs. +).

Kapitel 6: Allgemeine Diskussion & Schlussfolgerungen

In der Praxis können auf mit *H. schachtii* befallenen Flächen anfällige, resistente oder tolerante Sorten angebaut werden. Die Bezeichnungen dieser Genotypen beschreiben unterschiedliche Phänomene, die oft nicht eindeutig voneinander getrennt definiert werden. Im Gegensatz zu Anfälligkeit und Resistenz bezeichnet Toleranz nicht die Wirtseignung einer Zuckerrübensorte für *H. schachtii*, sondern die Eigenschaft, hohen Ertrag trotz Nematodenbefalls zu erzielen. Die Wirtseignung toleranter Zuckerrübensorten wird tatsächlich weder in der Zulassung, noch nach der Markteinführung untersucht. Die Wirtseignung toleranter Sorten für *H. schachtii* kann anfällig oder resistent sein (Schafer, 1971; Cook, 1974; Trudgill, 1986) (Kapitel 1; Tab. 1). Die Datenlage zur Wirtseignung toleranter Zuckerrübensorten für *H. schachtii* war bisher wenig aussagekräftig. Auch die Mechanismen die zur Toleranz führen sind nicht beschrieben.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Wirtseignung toleranter Zuckerrübensorten für *H. schachtii* im Feldversuch, sowie die Untersuchung des Lebenszyklus des Parasiten an den Wurzeln toleranter Sorten *in vitro*. Auf der Suche nach Hinweisen für die Mechanismen von Anfälligkeit, Resistenz und Toleranz wird auch die Ausprägung des Wurzelsystems der verschiedenen Genotypen mit und ohne *H. schachtii*-Befall in Rhizotronen verglichen.

Wirtseignung toleranter Sorten

Die Wirtseignung fünf toleranter Sorten wurde in dieser Arbeit anhand der Reproduktionsrate Pf/Pi von *H. schachtii* im Feldversuch charakterisiert (Kapitel 3). Der Ausgangs- und Endbefall (Pi und Pf) wurden durch die von Große et al. (1985) beschriebene Acetox-Schlupftest-Methode analysiert, bei dem die chemisch zum Schlüpfen angeregten J2 je 100g Boden bestimmt werden. Um zu prüfen, ob diese Methode für einen Vergleich der Reproduktionsraten von *H. schachtii* durch verschiedene Sorten geeignet ist, musste zunächst untersucht werden, ob die an verschiedenen Zuckerrüben genotypen entwickelten Nachkommen ein ähnliches Schlupfverhalten zeigen. Dies konnte als Voraussetzung für die Verwendbarkeit der Schlupftestmethode bestätigt werden (Kapitel 4; Abb. 7).

Die in den dreijährigen Feldversuchen ermittelten Reproduktionsraten Pf/Pi von *H. schachtii* an toleranten Sorten liegen zwischen der anfälligen und der resistenten Sorte. Da die Nematodenreproduktion an einer toleranten Sorte also geringer ist als an einer anfälligen Sorte, könnte die Wirtseignung als teilresistent definiert werden (Van der Zaag, 1959; Parleviet & Van Ommeren, 1975). Nematodentolerante Sorten anderer Kulturen (Kartoffel, Gerste, Weizen) werden deshalb häufig als teilresistent bezeichnet. Für eine vereinheitlichte Bezeichnung der Wirtseignung von Zuckerrübensorten könnte deshalb, neben anfälligen und resistenten Sorten von teilresistenten Sorten gesprochen werden (Heijbrock, 1977; Sigl, 2010; Reuther & Lang, 2015). In dieser Arbeit wird jedoch gezeigt, dass tolerante Sorten durchaus Unterschiede in ihrer Wirtseignung für *H. schachtii* aufzeigen können (Kapitel 3; Abb. 4). Demnach genügt der Begriff „teilresistent“ den Anforderungen der Praxis nicht, um die Wirtseignung toleranter Sorten zu beschreiben.

In dieser Arbeit wird eine grundlegende Klassifizierung der Wirtseignung von Zuckerrübensorten vorgeschlagen. Dabei können resistent wirkende Sorten in hoch und moderat resistent (HR bzw. MR) und anfällig wirkende Sorten in hoch und moderat anfällig (HS bzw. MS) unterteilt werden. Im Feldversuch konnten die Reproduktionsraten Pf/Pi der verschiedenen Genotypen voneinander unterschieden werden. So kann die anfällige Sorte *Beretta* (höchste Pf/Pi) als HS und die resistente Sorte *Nemata* (niedrigste Pf/Pi) als HR charakterisiert werden. Vier der toleranten Sorten wurden als MR charakterisiert, da deren Wirtseignung für *H. schachtii* der resistenten Sorte ähnlicher ist als der anfälligen Sorte. An der toleranten Sorte *Kleist* zeigt sich eine höhere Reproduktionsrate Pf/Pi als an den toleranten Sorten *Lisanna* und *Vasco*. Deshalb wird die Sorte *Kleist* als MS charakterisiert (Kapitel 3; Abb. 4). Außerdem ist die Wirtseignung der Sorte *Kleist* in den Einzeljahren oft nicht von der anfälligen Referenzsorte zu unterscheiden. In diesen Fällen müsste die tolerante Sorte *Kleist* - wie die anfällige Sorte *Beretta* - als HS charakterisiert werden. Hingegen zeigen die vier übrigen toleranten Sorten in den Einzeljahren eine oft noch geringere *H. schachtii*-Reproduktion und würden - wie die resistente Referenzsorte - als HR charakterisiert werden (Kapitel 3; Abb. 2 A-D). Dies bestätigt, dass sich die tolerante Sorte *Kleist* in ihrer Wirtseignung von den übrigen untersuchten toleranten Sorten unterscheidet. Durch die Klassifizierung der Wirtseignung können tolerante

Sorten mit einer höheren Wirtseignung von toleranten Sorten mit einer geringeren Wirtseignung für *H. schachtii* unterschieden werden.

Die vorgeschlagene Klassifizierung in insgesamt vier Klassen ist ausreichend und hilfreich, um tolerante Sorten anhand ihrer Wirtseignung für das Nematodenmanagement in der Praxis auswählen zu können. Bei höherer Diversität der Ergebnisse könnte die Wirtseignung der Sorten innerhalb der Klassen auch noch weiter abgestuft werden, sofern dies durch die statistische Auswertung gestützt wird.

Methodenvergleich zur Bestimmung der *H. schachtii*-Reproduktion Pf/Pi an verschiedener Zuckerrübensorten

Um einen nachhaltigen Zuckerrübenanbau zu gewährleisten, sollte es für Regionen mit Rübenzystennematoden von höchstem Interesse sein, die Höhe der *H. schachtii*-Reproduktion Pf/Pi (Wirtseignung) durch eine Zuckerrübensorte zu kennen. Die standardmäßige Untersuchung der Reproduktionsrate Pf/Pi registrierter Sorten im Feld für eine Risikobewertung und als Hilfe der Sortenwahl besteht bisher nicht.

Für die Bestimmung des Befalls aus Bodenproben werden in Deutschland verschiedene Methoden verwendet. Dabei stellt sich die Frage, inwiefern die Ergebnisse (Pi, Pf, Pf/Pi) miteinander vergleichbar sind. Innerhalb des Projektes wurden verschiedene Methoden verglichen. Dabei handelte es sich erstens um die Acetox-Schlupftest-Methode mit der mikroskopischen Bestimmung der Anzahl geschlüpfter J2 (Verband der Hessisch Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V.), zweitens um die Acetox-Schlupftest-Methode mit der Bestimmung der Anzahl geschlüpfter J2 durch PCR (BGD, Bodengesundheitsdienst) und drittens um die Zystenquetschmethode (Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen), die die Eier und J2 in den extrahierten Zysten aus der Bodenprobe am Mikroskop nach Ausquetschen der Zysten bestimmt. Während die Ergebnisse des Befalls (Pi, Pf) teils sehr unterschiedlich waren, zeigte sich für die Pf/Pi-Ergebnisse durch alle drei untersuchten Methoden ein ähnliches Sortenranking für die Praxis. Nur die vom Verband verwendete Acetox-Schlupftest-Methode erreichte auf Grund einer geringeren Streuung der Ergebnisse stets einen statistisch abgesicherten Vergleich der Reproduktionsraten von *H. schachtii* an den verschiedenen Genotypen (Kehm, 2016;

Kehm et al., 2017). Für einen Vergleich von Reproduktionsraten Pf/Pi von *H. schachtii* an verschiedenen Zuckerrübensorten kann deshalb die Bestimmung des Befalls nach Vorbild der beim Verband verwendeten Bodenprobenentnahmetechnik und Nematodenanalyse (Acetox-Schlupftest-Methode nach Große, 1985) vorgeschlagen werden (beschrieben in Kapitel 3).

Auswirkungen von toleranten Zuckerrübensorten auf den Lebenszyklus von *H. schachtii*

Durch eine vergleichende Beobachtung des Lebenszyklus von *H. schachtii* an den verschiedenen Zuckerrübengenotypen sollte herausgefunden werden warum die Reproduktionsrate Pf/Pi von *H. schachtii* an den toleranten Sorten geringer als an der anfälligen Sorte ist. Dazu liefert eine nicht destruktive *in vitro*-Untersuchung erste Hinweise auf die Entwicklungsunterschiede von *H. schachtii* an den verschiedenen Genotypen. In dieser Untersuchung wurden eine anfällige (*Beretta*, HS), eine tolerante (*Lisanna*, MR) und eine resistente Zuckerrübensorte (*Nemata*, HR) auf Nährmedium in Petrischalen angezogen und mit J2 inokuliert (Kapitel 4).

Verschiedene pflanzliche Faktoren beeinflussen die Geschlechtsdetermination von *H. schachtii*. Vor allem der Ernährungszustand entscheidet über die Entwicklung des Geschlechts (Stelter, 1963; Kämpfe & Kerstan, 1964; Müller et al., 1981). Da die Weibchen einen 29-fach höheren Nährstoffbedarf als die Männchen haben (Müller et al., 1981), werden sich unter günstigen Entwicklungsbedingungen an der anfälligen Sorte besonders viele Weibchen entwickeln. Im *in vitro*-Versuch konnten an der anfälligen Sorte mehr Weibchen als Männchen beobachtet werden (1♀:0.5♂). Im Gegensatz zu anfälligen Sorten bieten resistente Sorten ungünstige Entwicklungsbedingungen, so dass sich mehr Männchen als Weibchen entwickeln (Kämpfe & Kerstan, 1964; Kerstan, 1969). Zwar entwickelten sich im *in vitro*-Versuch an der resistenten Sorte mehr Männchen als Weibchen, jedoch ist das Geschlechterverhältnis nur vage verschoben 1♀:2.1♂. Die geringe Anzahl an Männchen in der resistenten Sorte könnte darin begründet sein, dass sich ein Teil der erfassten Fraktion „stagnierende Juvenile“ später als 8 Tage nach Inokulation (dai) zu Männchen entwickelt. In einer Kontrolle zum Zeitpunkt 22dai konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Im Faltschachtelversuch beobachteten Roeb & Hallmann (2016) an einer resistenten Zuckerrübe 4 bzw. 11 Männchen je Weibchen, vier bzw. sechs

Wochen nach Inokulation. Auch an resistenten Zwischenfrüchten zeigten sich 2 Wochen nach Inokulation mehr Männchen (3,8-11,7) je Weibchen (Lelivelt & Hoogendoorn, 1993). Durch den Vergleich der Inokulationsdichte sowie den Zeitpunkt und Umfang der Erfassung von Weibchen und Männchen zwischen dem *in vitro*-Versuch und dem Faltschachtelversuch von Roeb & Hallmann (2016) kann spekuliert werden, warum an der resistenten Sorte weniger Männchen je Weibchen beobachtet wurden. Im *in vitro*-Versuch wurden weniger J2 (125) je Pflanze inokuliert als im Versuch von Roeb & Hallmann (2016) (500). Bei hoher Inokulationsdichte würden sich auf Grund des Konkurrenzdrucks mehr Männchen als Weibchen entwickeln (Müller, 1985). Die geringe Inokulationsdichte und die an der resistenten Sorte geringere Infektionsrate (Kapitel 4; Abb. 4) würden diese Vermutung unterstützen. Zudem erfassten Roeb & Hallmann (2016) die gesamte Populationsstruktur über einen Zeitraum von sechs Wochen, während im *in vitro*-Versuch nur die Entwicklung der J2 verfolgt wurde, die die Wurzeln bereits 8dai infiziert hatten. Somit entwickeln sich noch viele Männchen aus Juvenilen die die Wurzel später infizieren, die für die Berechnungen des Geschlechtsverhältnisses im *in vitro*-Versuch nicht erfasst wurden. Auch wenn weniger Männchen als Weibchen als erwartet in der resistenten Sorte beobachtet wurden, entwickelte sich durchschnittlich nur ein Weibchen und weniger als eine Zyste (Kapitel 4; Abb. 6) an dieser Sorte. Aus diesem Grund werden sich die nachfolgenden Vergleiche auf die Beobachtungen an der anfälligen und toleranten Sorte beschränken.

Die gegenüber der anfälligen Sorte verringerte Weibchenanzahl, das leicht zu Männchen verschobene Geschlechtsverhältnis ($1♀:2.2♂$) sowie der erhöhte Anteil stagnierender Juvenilen an der toleranten Sorte zeigen, dass die Wirtseignung für *H. schachtii* an der toleranten Sorte gegenüber der anfälligen Sorte verringert ist (Kapitel 4; Abb. 5). Die Frage, ob sich der Ernährungsstatus der Weibchen an der anfälligen und der toleranten Sorte unterscheidet, lässt sich durch die Größenbestimmung der Weibchen-assoziierten Synzytien beantworten. Die Größe der Synzytien ist positiv mit der bereitgestellten Nährstoffmenge für *H. schachtii* korreliert (Perry & Gaur, 1996). Da sich an der toleranten Sorten weniger Weibchen entwickelten als an der anfälligen Sorte, wurde erwartet, dass die Weibchen in der toleranten Sorte gleich große bzw. kleinere Synzytien induzieren. Entgegen der Erwartung waren die Weibchen-assoziierten Synzytien in der toleranten Sorte größer

als an der anfälligen Sorte (Kapitel 4; Tab. 2). Da die Weibchen an der toleranten Sorte zudem trotz ihrer größeren Synzytien kleiner als an der anfälligen Sorte waren (Kapitel 4; Tab. 2), wird davon ausgegangen, dass die tolerante Sorte ungünstigere Entwicklungsbedingungen für *H. schachtii* bietet. Um die Nährstoffversorgung für die Entwicklung von Weibchen an der toleranten Sorte zu gewährleisten, muss *H. schachtii* anscheinend ein größeres Synzytium induzieren. Da die Weibchen trotzdem kleiner als an der anfälligen Sorte sind, wird ein Mangel essentieller Nährstoffe (für die Entwicklung zum Weibchen) vermutet. Dieser Mangel könnte der Grund dafür sein, dass *H. schachtii* gezwungen ist ein besonders großes Synzytium auszubilden. Die übergroßen aber weniger effizienten Synzytien werden als Ursache für die geringere Anzahl und Größe der Weibchen an der toleranten Sorte vermutet. Die beobachteten Entwicklungsunterschiede von *H. schachtii* scheinen auf einen noch unbekanntem Resistenzmechanismus in toleranten Sorten hinzuweisen. In der resistenten Zuckerrübensorte kann *H. schachtii* zwar ein funktionelles Synzytium induzieren, jedoch nicht aufrechterhalten. In Folge des Resistenzmechanismus in resistenten Sorten degradieren die meisten Synzytien und die Juvenilen werden nicht mehr oder nur unzureichend mit Nährstoffen versorgt, sodass die meisten Juvenilen noch vor dem Erreichen des Adultstadiums absterben. Dass die Entwicklungsbedingungen für *H. schachtii* in resistenten Sorten ungünstig sind, wird der Juvenilen noch vor der Geschlechtsdetermination signalisiert (Holtmann, 2000). Unter den ungünstigen Bedingungen können sich wenn überhaupt noch Männchen entwickeln, da deren Nährstoffbedarf weitaus geringer ist als von Weibchen (Müller *et al.*, 1981). An der toleranten Sorte entwickelten sich auch mehr Männchen als Weibchen. Im Gegensatz zur resistenten Sorte, degradieren die Synzytien in der toleranten Sorte nicht und es entwickeln sich mehr Weibchen deren Synzytien übergroß sind. Es könnte sein, dass es den Weibchen nicht gelingt, die Genexpression zur Produktion von aus der Pflanze stammenden Nährstoffen zu regulieren. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die vermutete Resistenz in der toleranten Sorte, wie auch in der resistenten Sorte, bereits vor der Geschlechtsdetermination wirkt und darüber hinaus die Funktion der Weibchen-assoziierten Synzytien negativ beeinflusst.

H. schachtii vermehrt sich obligat sexuell, sodass sich ein Weibchen nur nach erfolgreicher Befruchtung zur Zyste entwickelt (Kämpfe, 1952). Zu Ende des ersten

Generationszyklus von *H. schachtii* werden an der toleranten Sorte 65% weniger Zysten gegenüber der anfälligen Sorte beobachtet (Kapitel 4; Abb. 6). Es wurde bereits erkannt, dass sich nie alle Weibchen zu Zysten entwickeln (Green et al., 1970; Lelivelt & Hoogendoorn, 1993). In dieser Arbeit zeigt sich, dass die Chance eines Weibchens eine Zyste zu bilden von der Wirtspflanze - also dem Zuckerrübenotyp - beeinflusst wird. An der anfälligen Sorte war diese Chance am höchsten (62%), an der toleranten Sorte moderat (55%) und an der resistenten Sorte am geringsten (50%) (Kapitel 4; Abb. 6). Obwohl alle Weibchen intakt waren, entwickelten sich an der toleranten Sorte weniger Weibchen zu Zysten als an der anfälligen Sorte. Die ineffizienten Ernährungsbedingungen durch die Synzytien in der tolerante Sorte könnten dazu geführt haben, dass Weibchen nicht oder weniger attraktiv (Sexualpheromone) auf Männchen wirken und weniger oft zur Paarung von Männchen aufgesucht wurden. Erklärt werden könnte das damit, dass kleinere Weibchen weniger Eier in sich tragen können als größere Weibchen (Green et al., 1970). Ein Paarungserfolg könnte auch durch eine verringerte Fruchtbarkeit von Weibchen und/oder Männchen verhindert sein. Um die Ursachen der ausbleibenden Zystenbildung zu erforschen, werden Pheromonmessungen von Weibchen und die nachweisliche Beobachtung der Paarung von Adulten an den verschiedenen Zuckerrübenotypen vorgeschlagen.

Die ineffizientere Versorgung der Weibchen scheint sich auch auf die Reproduktionsleistung auszuwirken. Die an der toleranten Sorte gebildeten Zysten enthielten nur halb so viele Eier wie die der anfälligen Sorte (Kapitel 4; Abb. 7). Perry & Gaur (1996) bestätigen, dass der ernährungsphysiologische Zustand der Pflanze auch Einfluss auf die Eiproduktion hat.

In dieser Arbeit werden erstmals *H. schachtii*-Entwicklungsparameter im Lebenszyklus von *H. schachtii* in einer toleranten Sorte untersucht. *In vitro* wurde beobachtet, dass die Anzahl der Weibchen und deren Chance Zysten zu bilden, sowie die Anzahl an Zysten und produzierter Eier vom Zuckerrübenotyp abhängen. Diese Entwicklungsparameter von *H. schachtii* waren an der toleranten Sorte gegenüber der anfälligen Sorte verringert, was auf eine geringere Wirtseignung dieser Sorten hindeutet. Die Beobachtungen der Entwicklungsparameter im Lebenszyklus von *H. schachtii* an der toleranten Sorte erklären somit die gegenüber der anfälligen Sorte geringere Reproduktionsrate Pf/Pi im Feldversuch.

Zusammenhang zwischen Wurzelsystem und der Ausprägung von Toleranz und Resistenz

Durch die Parasitierung der Wurzel mit *H. schachtii* kommt es zu morphologischen Veränderungen im Wurzelsystem von Zuckerrüben. Kümmerwuchs (verkürzte Hauptwurzel), Beinigkeit (mehrere Hauptwurzeln) und die Ausbildung eines Wurzelbarts (vermehrte Seitenwurzeln 1. Ordnung) sind bekannte Symptome befallener anfälliger Zuckerrüben. Die Schädigungen des Wurzelsystems tragen zum Ertragsverlust von bis zu 25% durch *H. schachtii* bei (Müller, 1999). Die Untersuchung von Wurzelwachstumsparametern verschiedener Zuckerrübensorten im Jungpflanzenstadium soll zeigen, ob sich das Wurzelsystem der Genotypen grundsätzlich unterscheidet und ob die Genotypen unterschiedlich auf den Befall mit *H. schachtii* reagieren. Die Untersuchung von Wurzelwachstumsparametern verschiedener Zuckerrübengenotypen könnte zudem Hinweise auf die Sorteneigenschaften der Toleranz und Resistenz gegenüber *H. schachtii* geben.

Die verschiedenen Zuckerrübensorten wurden in mit Erde gefüllten Rhizotrongefäßen mit und ohne *H. schachtii*-Befall angezogen und so platziert, dass das Wurzelsystem an der transparenten Rhizotronwand entlangwuchs. Die Wurzelwachstumsparameter der Haupt-, Seiten- und Gesamtwurzellänge, der Anzahl Seitenwurzeln 1. Ordnung und der Wurzelsystemtiefe einer anfälligen (*Beretta*, HS), einer resistenten (*Nemata*, HR) und drei toleranter Zuckerrübensorten (*Lisanna* und *Vasco*, MR; *Kleist*, MS) konnten somit nicht destruktiv analysiert werden.

Die Arbeit zeigt, dass sich nur einzelne Sorten in den Wurzelwachstumsparametern der Hauptwurzellänge, der Wurzelsystemtiefe und der Anzahl Seitenwurzeln 1. Ordnung im Alter von drei Wochen unterschieden. Die Seiten- und Gesamtwurzellänge der Sorten unterschied sich hingegen nicht (Kapitel 5; Tabellen A3.1; A3.2). Während Wright et al. (2018) davon ausgehen, dass Wurzelwachstumsparameter von Zuckerrübengenotypen wenigstens unter Befall unterschiedlich sind, zeigt diese Arbeit, dass die eher geringen Sortenunterschiede unabhängig vom Nematodenbefall auftreten. An dieser Stelle soll nur auf die Wurzelsystemtiefe unter *H. schachtii*-Befall eingegangen werden. Die Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass es unter Befall einen Zusammenhang zwischen Toleranz und der Tiefe des Wurzelsystems gibt. So wurde erwartet, dass tolerante Sorten vor allem unter *H. schachtii*-Befall tiefer wurzeln als nicht tolerante Sorten. Im

Rhizotronversuch wurde hingegen beobachtet, dass die toleranten Sorten *Kleist* und *Lisanna* unter Befall nur gegenüber der resistenten Sorte *Nemata* ein tiefer gehendes Wurzelsystem zeigten (Tab. A3.2). Während die untersuchten toleranten Sorten also nicht tiefer als die anfällige Sorte *Beretta* wurzelten, zeigte Gierth (2005), dass die tolerante Zuckerrübensorte *Nematop* ein deutlich tieferes Wurzelsystem als die anfällige Sorte *Penta* unter *H. schachtii*-Befall aufweist. Das Ausbleiben dieser Beobachtung im Rhizotronversuch könnte mit der um 10 Tage früheren Inokulation von J2 und der geringeren Inokulationsdichte (um 1000 J2) gegenüber dem Versuch von Gierth (2005) erklärt werden. Zu einem frühen Zeitpunkt der Nematodeninokulation ist das Wurzelsystem der Sorten klein und noch sehr ähnlich zueinander. Die Sortenunterschiede der Wurzelsystemtiefe durch den Befall können demnach weniger groß sein, als wenn größere (ältere) Wurzelsysteme mit J2 inokuliert werden. Zudem hängt die Ertragsreaktion durch *H. schachtii* einer anfälligen Sorte - aber nicht einer toleranten Sorte - von der Befallsstärke ab (Kapitel 3, Tab. 5). Wenn also weniger J2 inokuliert werden, kann angenommen werden, dass auch die Sortenunterschiede für die Wurzelsystemtiefe weniger groß sind.

Unter *H. schachtii*-Befall waren die Wurzelwachstumsparameter aller Sorten zu den gemessenen Zeitpunkten (6, 10 und 14 dai) gegenüber Nichtbefall reduziert (Kapitel 5; Tab. A1.3, A2.3, A3.3). Während die erwartete Reduktion der Hauptwurzellänge durch *H. schachtii*-Befall für alle Sorten bestätigt werden konnte, wurde die vermehrte Bildung von Seitenwurzeln 1. Ordnung 14 Tage nach Befall an keiner Sorte beobachtet. Während Gierth (2005) auch keine höhere Anzahl von Seitenwurzeln 1. Ordnung an der anfälligen Sorte *Penta* und der toleranten Sorte *Nematop* (3-9 Wo alt, 1-7 Wo nach Inokulation) beobachtete, zeigten Hillnhütter et al. (2012) die erwartete Vermehrung von Seitenwurzeln 1. Ordnung für die anfällige Sorte *Alyssa* (8 Wo alt; 4 Wo nach Inokulation). Vermutlich tritt eine Vermehrung von Seitenwurzeln 1. Ordnung zu einem späteren Zeitpunkt durch den Befall mit *H. schachtii*, vor allem an anfälligen Sorten, auf.

Alle Wurzelwachstumsparameter der anfälligen Sorte wurden durch den Befall mit *H. schachtii* am stärksten reduziert. Die durch *H. schachtii* beobachtete Reduktion der Parameter war für die toleranten Sorten geringer als für die anfällige Sorte (Kapitel 5; Abb. 3, Abb. 5, Tab. A3.3). Diese Beobachtung konnte bereits für die Wurzelsystemtiefe an einer toleranten Zuckerrübensorte (Gierth, 2005), für die

Gesamtwurzellänge an toleranten Kartoffelsorten (Evans & Haydock, 1990) und für die Seitenwurzellänge an toleranten Hafersorten (Volkmar, 1989) gemacht werden. Für alle drei toleranten Zuckerrübensorten im Rhizotronversuch wurde ein gegenüber der anfälligen Sorte resilienteres Wurzelsystem bei *H. schachtii*-Befall bestätigt. Die Beobachtungen wurden mit der Nematodentoleranz in Verbindung gebracht. Beispielsweise wurde bereits für Weizen die Gesamtwurzellänge als Indikator des Ertragspotentials unter Nematodenbefall vorgeschlagen (Stanton & Fisher, 1988). Die in dieser Arbeit analysierten Wurzelwachstumsparameter der Hauptwurzellänge und Wurzelsystemtiefe erlauben zudem eine Unterscheidung von toleranten zu nicht toleranten Sorten. Diese Parameter der Hauptwurzellänge und Wurzelsystemtiefe waren an allen drei toleranten Sorten weniger (total und relativ) durch *H. schachtii* reduziert als an den nicht toleranten Sorten (Kapitel 5; Abb. 3; Tab A3.3). Außerdem konnte keine Beeinträchtigung der Gesamtwurzellänge in den oberen 30cm des Wurzelsystems durch *H. schachtii* für tolerante Sorten gegenüber nicht toleranten Sorten beobachtet werden (Kapitel 5; Abb. 4).

Zu Ende des Versuches waren die Pflanzen drei Wochen alt (14 dai). Der Ertrag und die Reproduktion von *H. schachtii* wurde an diesen Pflanzen nicht weiter untersucht, sodass ein direkter Zusammenhang der Wurzelwachstumsparameter zu Toleranz und Resistenz nicht vorgenommen wurde. Indirekt könnten die Wurzelwachstumsparameter unter Befall mit den Ertragsdaten (Kapitel 3; Tab. 3) und der Wirtseignung (gemessen an Pf/Pi) (Kapitel 3; Abb. 4) der Zuckerrübensorten (außer *Adrianna*) aus dem Feldversuch verglichen werden. Hohe Wurzelwachstumsparameter könnten demnach ein Indikator für hohen Ertrag unter Befall (Toleranz) sein, *vice versa*. Zudem könnten die Wurzelwachstumsparameter als Indikator der Wirtseignung von anfälligen und toleranten Sorten verwendet werden, -wobei geringe Wurzelwachstumsparameter unter Befall auf eine hohe Reproduktion im Feld hindeuten, *vice versa*. Die als MS charakterisierte Sorte *Kleist* hat zwar eine kürzere Hauptwurzel unter Befall als die als MR charakterisierte Sorte *Lisanna*, jedoch ist der Unterschied nicht signifikant. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf die Verwendbarkeit von Wurzelwachstumsparametern in Zuckerrübensorten als Indikator der Toleranz und Resistenz gegenüber *H. schachtii*. Zusammengefasst, könnten die Wurzelwachstumsparameter der Haupt-, Seiten- und Gesamtwurzellänge, der Wurzelsystemtiefe und der Anzahl von Seitenwurzeln

1. Ordnung von verschiedenen Zuckerrüben-Genotypen bereits sehr früh (an drei Wochen alten Pflanzen, 14 Tage nach Befall) als Indikatoren der Toleranz und Resistenz verwendet werden. Besonders geeignet, zudem schnell und einfach messbar, scheint ein Screening der Hauptwurzellänge und Wurzelsystemtiefe unter Befall. Für diese Parameter konnten alle toleranten Sorten (*Adrianna*, *Kleist*, *Lisanna*) eindeutig von den nicht toleranten Sorten (*Beretta*, *Nemata*) unterschieden werden (Kapitel 5; Abb. 3). Ein Screening dieser Parameter unter Befall könnte Bestandteil in Züchtungsprogrammen sein. Es wäre demnach möglich, Zuckerrübensorten mit potentiell hohem Ertrag und geringer *H. schachtii*-Reproduktion bereits zu einem jungen Pflanzenstadium schnell und einfach durch die Indikatoren der Hauptwurzellänge oder Wurzelsystemtiefe zu identifizieren. Inwieweit diese Beobachtungen auf das gesamte Sortenspektrum anwendbar sind, muss noch untersucht werden.

Aspekte und Empfehlungen für die Praxis

Für die Sortenwahl durch den Anbauer ist die Kenntnis eines möglichen Nematodenbefalls vor dem Zuckerrübenanbau von großem Nutzen. Wenn für ein Feld keine Information beispielsweise aus einer früheren Untersuchung des Befalls aus Bodenproben vorliegt, kann es für den Anbauer schwierig sein, anhand der Symptomatik im Feld direkt auf einen Nematodenbefall zu schließen. Die durch *H. schachtii* verursachten Symptome (vergilbte, welkende äußere Blätter an Pflanzen in Befallsnestern) könnten beispielsweise als Bodenverdichtung oder verminderte Wasser- sowie Nährstoffverfügbarkeit verkannt werden. Den unmissverständlichen Nachweis eines *H. schachtii*-Befalls liefert die Überprüfung auf das Vorhandensein:

- von Weibchen (weiß) oder Zysten (braun) an den Wurzeln der Zuckerrübe (während der Vegetation),
- von Zysten in Bodenproben aus der Rübenmiete (nach der Ente).
- von Zysten in Bodenproben von für den Zuckerrübenanbau vorgesehenen Flächen (ganzjährig),

Wenn einmal *H. schachtii* im Feld nachgewiesen wurde, sollte möglichst keine anfällige Sorte mehr angebaut werden, um das Ertragspotential anfälliger Sorten nicht zu beeinträchtigen und den Aufbau der *H. schachtii*-Population im Boden zu

vermeiden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Ertrag unabhängig von der Höhe des Befalls durch tolerante Sorten gesichert werden kann (Kapitel 3, Tab. 5). Wenn ein Befall mit *H. schachtii* festgestellt wird, kann deshalb unabhängig von der Befallsstärke eine tolerante Sorte angebaut werden. Da ertragreiche resistente Zuckerrübensorten fehlen, sind der Anbau toleranter Sorten und die Wahl der für den Standort geeigneten toleranten Sorte derzeit die wichtigsten Elemente im Nematodenmanagement (Reuther & Lang, 2015).

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass tolerante Zuckerrübensorten eine über die Versuchsjahre hinweg geringe Reproduktionsrate P_f/P_i aufweisen und eine geringe Vermehrung von *H. schachtii* zulassen. Zudem wurde im Projekt die Populationsdynamik durch eine wiederholte Untersuchung des Befalls (mit Hilfe von Geodaten) auf 12 Schlägen über die dreijährige Zuckerrübenfruchtfolge hinweg verfolgt (Verband, nicht veröffentlicht). Entgegen der Meinung anderer Autoren (Hauer et al., 2016; Krüssel & Warnecke, 2014) konnte dadurch gezeigt werden, dass der Anbau toleranter Sorten keinen Aufbau der *H. schachtii*-Population unter natürlichen Umweltbedingungen (Südwestdeutschland) in der dreijährigen Fruchtfolge zulässt.

Ob der wiederholte Anbau toleranter Sorten über einen sehr langen Zeitraum im Sinne eines Resistenzmanagements nachhaltig ist, kann nicht beantwortet werden. Der Mechanismus der vermuteten Resistenz sowie langjährige Untersuchungen zur Wirksamkeit der Resistenz bzw. zum Aufbau virulenter Nematodenpopulationen fehlen. Bekannt ist, dass ein wiederholter Einsatz derselben Resistenz zur Anpassung der Nematodenpopulation und zum Wirkverlust der Resistenz (Resistenzbruch) führen kann. Beispielsweise konnte so die Resistenz PI 88788 durch den Sojazystennematoden *H. glycine* überwunden werden (Mitchum et al., 2007). Andererseits, gibt es auch stabile Resistenzen, die ihre Wirkung gegenüber Nematoden trotz langjährigen Anbaus bis heute nicht verloren haben. Ein Beispiel ist das Resistenzgen H1 in Kartoffel gegen den Kartoffelzystennematoden *Globodera rostochiensis* (Fuller et al., 2008). Die Resistenz in toleranten Sorten ist polygenen Ursprungs, so dass die vermutete Resistenz theoretisch weniger schnell durchbrochen werden kann als eine monogene (wie beispielsweise HS1^{pro1}). Ein Bruch polygen wirkende Resistenzen wird als sehr unwahrscheinlich eingestuft (Heijbroek, 1977). Trotzdem kann einer Selektion virulenter Nematodenpopulationen durch einen

möglichst diversen Einsatz von Managementmaßnahmen entgegengewirkt werden (Fuller et al., 2008).

Für ein gutes Nematodenmanagement sollte eine wenigstens dreijährige Fruchtfolge mit dem Anbau einer toleranten Sorte eingehalten werden. Ob auf langjährige Sicht stets die tolerante Sorte mit der geringsten Wirtseignung gewählt werden sollte, oder ein Wechsel toleranter Sorten mit verschiedener Wirtseignung vorteilhaft ist, muss noch geprüft werden. Zusätzlich könnte ein gelegentlicher Anbau einer resistenten Zuckerrübensorte, ähnlich zu der Maßnahme mit resistenten Zwischenfrüchten, helfen die Nematodenpopulation im Feld drastisch zu reduzieren. Die Kombination verschiedener Maßnahmen hilft den Aufbau virulenter Populationen und den etwaigen Verlust von Resistenzen vorzubeugen.

Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die untersuchten toleranten Zuckerrübensorten (*Adrianna*, *BTS 440*, *Kleist*, *Lisanna*, *Vasco*) eine geringere Reproduktionsrate Pf/Pi von *H. schachtii* im Vergleich zur anfälligen Sorte *Beretta* aufweisen. Neben der Charakterisierung der Wirtseignung toleranter Sorten im Feld (Kapitel 3) lassen auch die *in vitro*-Beobachtungen der *H. schachtii*-Entwicklung an den verschiedenen Genotypen (Kapitel 4) darauf schließen, dass tolerante Sorten eine deutlich verminderte Wirtseignung gegenüber anfälligen Sorten haben. Weniger und kleinere Weibchen gegenüber der anfälligen Sorte indizieren dies. Im Gegensatz zur resistenten Sorte, degradieren die Synzytium in der toleranten Sorte nicht, sondern sind übergroß. Das führt zu der Vermutung, dass ein noch unbekannter Resistenzfaktor in toleranten Sorten die Funktion des Synzytiums negativ beeinflusst.

An toleranten Sorten zeigt *H. schachtii* weniger Weibchen, Zysten und Eier als an der anfälligen Sorte. Zudem war die Chance der Weibchen Zysten zu bilden verringert. Diese Beobachtungen bestätigen eine geringere Wirtseignung für *H. schachtii* an toleranten Sorten und erklären die gegenüber der anfälligen Sorte geringere Reproduktionsrate Pf/Pi im Feldversuch.

Da die Wirtseignung toleranter Sorten weder in der Zulassung noch in der Markteinführung untersucht wird, kann nicht grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass in Zukunft registrierte tolerante Sorten eine ähnlich geringe

Wirtseignung wie die untersuchten aufzeigen. Ein nachhaltiges Nematodenmanagement ist daher nur gewährleistet, wenn eine Untersuchung der Reproduktionsrate registrierter Sorten im Feld für eine Risikobewertung und als Hilfe der Sortenwahl implementiert wird.

Im Züchtungsprozess neuer Zuckerrübensorten werden einfache, möglichst schnelle und aussagekräftige Tests benötigt, um die Wirtseignung und Ertragsleistung von Genotypen in einer frühen Testphase abschätzen zu können. Die nicht destruktive Analyse von Wurzelwachstumsparametern in Rhizotronen (Kapitel 5) scheint geeignet zu sein, um die genotypspezifische Reaktion des Wurzelsystems bereits an drei Wochen alten Zuckerrübensorten, 14 Tage nach *H. schachtii*-Befall zu analysieren. Die Untersuchung des Wurzelsystems identifizierte die Haupt-, Seiten- und Gesamtwurzellänge, die Wurzelsystemtiefe und die Anzahl von Seitenwurzeln 1. Ordnung als Indikatoren, einen Befall durch *H. schachtii* bereits sehr früh anzuzeigen. Die gegenüber Nichtbefall beobachtete Reduktion dieser Wurzelwachstumsparameter durch den Nematodenbefall könnte als Indikator für die frühe Abschätzung von Toleranz und Resistenz von Zuckerrübensorten verwendet werden. Besonders geeignet, zudem schnell und einfach messbar, scheint ein Screening der Hauptwurzellänge oder Wurzelsystemtiefe unter Befall. Für diese Parameter konnten alle toleranten Sorten eindeutig von nicht toleranten Sorten unterschieden werden. Ob diese Beobachtungen auf das gesamte Sortenspektrum zutreffen, müsste zunächst aber noch weiter untersucht werden.

Referenzen

- Cook, R. (1974): Nature and inheritance of nematode resistance in cereals. *Journal of Nematology* 6(4):165-174.
- Evans, K. & P. P. J. Haydock (1990): A review of tolerance by potato plants of cyst nematode attack, with consideration of what factors may confer tolerance and methods of assaying and improving it in crops. *Ann. Appl. Biol.* 117:703-740.
- Fuller, V. L.; Lilley, C. J. & P. E. Urwin (2008): Nematode resistance. *New Phytologist* 180:27-44.
- Gierth, K. (2005): Pflanzenmorphologische und -physiologische Untersuchungen zur Toleranz in der Wirt-Parasit-Interaktion *Beta vulgaris* - *Heterodera schachtii*. Dissertation. Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.

- Green, C. D.; Greet, D. N. & F. G. W. Jones (1970): The influence of multiple mating on the reproduction and genetics of *Heterodera rostochiensis* and *H. schachtii*. *Nematologica* 16:309-326.
- Große, E.; Banasiak, L.; Lyr, H. & M. Jock (1985): Neuer Labortest zum Nachweis des Rübenematoden (*Heterodera schachtii*). *Nachr. -Bl. Pflanzenschutz DDR* 39:111-112
- Hauer, M.; Koch, H. J.; Krüssel, S.; Mittler, S.; Märländer, B. (2016): Integrated control of *Heterodera schachtii* Schmidt in Central Europe by trap crop cultivation, sugar beet variety choice and nematicide application. *Appl. Soil. Ecol.* 99, 62–69.
- Heijbroek, W. (1977): Partial resistance of sugarbeet to beet cyst eelworm (*Heterodera schachtii* SCHM.). *Euphytica* 26:257-262.
- Kämpfe, L. (1952): Rüben- und Kartoffelälchen. *Akad: Verlagsgesellsch. Geest & Portig K.-G., Leipzig.* 40.
- Hillnhütter, C.; Sikora, R. A.; Oerke, E.-C. & D. van Dusschoten (2012): Nuclear magnetic resonance a tool for imaging belowground damage caused by *Heterodera schachtii* and *Rhizoctonia solani* on sugar beet. *Journal of Experimental Botany* 1:319–327.
- Holtmann, B.; Kleine, M. & F. M. W. Grundler (2000): Ultrastructure and anatomy of nematode-induced syncytia in roots of susceptible and resistant sugar beet. *Protoplasma* 211:39-50.
- Kämpfe, L. (1952): Rüben- und Kartoffelälchen. *Akad: Verlagsgesellsch. Geest & Portig K.-G., Leipzig.* 40.
- Kämpfe, L. & U. Kerstan (1964): Die Beeinflussung des Geschlechtsverhältnisses in der Gattung *Heterodera* Schmidt. *Nematologica* 10:388-398.
- Kehm, S. (2016): Untersuchung zum Befall durch Rübenzystemnematoden (*Heterodera schachtii*) im Feld –Vergleich zweier Methoden- Masterarbeit. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Kehm, S.; Reuther, M.; Lignau, A.; Lang, C.; Heinrichs, C.; Honermeier, B. & F. M. W. Grundler (2017): Zwei Methoden, ein Ergebnis. *DLG-Mitteilungen* 3:58-61.
- Kerstan, U. (1969): Die Beeinflussung des Geschlechtsverhältnisses in der Gattung *Heterodera*. II. Minimallebensraum- Selektive Absterberate der Geschlechter- Geschlechtsverhältnis (*Heterodera schachtii*). *Nematologica* 15:210-228.
- Krüssel, S. & Warnecke, H. (2009): Zystemnematoden und Sortenwahl in Zuckerrüben. *Zuckerrübe* 58:120-124.
- Lelivelt, C. L. C. & J. Hoogendoorn (1993): The development of juveniles of *Heterodera schachtii* in roots of resistant and susceptible genotypes of *Sinapis alba*, *Brassica napus*, *Raphanus sativus* and hybrids. *Neth. J. Pl. Path.* 99:13-22.
- Mitchum, M. G.; Wraeter, J. A.; Heinz, R. D.; Shannon, J. G. & G. Danekas (2007): Variability in distribution and virulence phenotypes of *Heterodera clycines* in Missouri during 2005. *Plant Dis.* 91:1473-1476.
- Müller, J.; Rehbock, K. & U. Wyss (1981): Growth of *Heterodera schachtii* with remarks on amounts of food consumed. *Revue de Nématol.* 4:227-234.
- Müller, J. (1999): The economic importance of *Heterodera schachtii* in Europe. *Helminthologia* 36:205–213.

- Parleviet, J. E. & A. van Ommeren (1975): Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. II. Relationship between field trials, microplot tests and latent period. *Euphytica* 24:293-303.
- Perry, R. N. & H. S. Gaur (1996): Host plant influences on the hatching of cyst nematodes. *Fundam. Appl. Nematol.* 19(6):505-510.
- Reuther, M. & C. Lang (2015): Nematoden: Wie gut sind tolerante Sorten? *top agrar* 10:60-63.
- Roeb, J. & J. Hallmann (2016): Eindringung, Entwicklung und Vermehrung von *Heterodera schachtii* an anfälligen, resistenten und toleranten Zuckerrübenentypen. Beitrag auf der 44. Jahrestagung des DPG-Arbeitskreises Nematologie 2016. Zusammenfassung der Arbeitskreisbeiträge. 13.
- Schafer, J. F. (1971): Tolerance to plant disease. *Ann. Rev. Phytopath.* 9: 235-225.
- Sigl, G. (2010): Untersuchungen zum Auftreten des Rübenzystennematoden (*Heterodera schachtii*) im österreichischen Zuckerrübenanbaugebiet durch Bodenanalysen sowie zum verursachten Schadausmaß an verschiedenen Zuckerrübensorten. Diplomarbeit. Universität für Bodenkultur Wien.
- Stanton, J. M. & J. M. Fisher (1988): Factors of early growth associated with tolerance of wheat to *Heterodera avenae*. *Nematologica* 43:188-197.
- Stelter, H. (1963): Die Vermehrung der Rasse B des Kartoffelnematoden, *Heterodera rostochiensis* Woll., an der A-anfälligen Sorte Aquila und der A-resistenten Sorte Spekula. *Nematologica* 9:237-240.
- Trudgill, D. L. (1986): Concepts of resistance, tolerance and susceptibility in relation to cyst nematodes. In: Lamberti, F. & C. E. Taylor. *Cyst Nematodes*. New York and London Plenum Press. 179-187.
- Van der Zaag, D. E. (1959): Some observations on breeding for resistance to *Phytophthora infestans*. *Eur. Potato Journal* 2(4):278-286.
- Volkmar, K. M. (1991): Nematode tolerance increase drought stress in young oat plants. *Nematologica* 37:304-311.
- Wright, A. J. D.; Bussell, J. S.; Stevens, M.; Back, M. A. & D. L. Sparkes (2018). Physiological differences between sugar beet varieties susceptible, tolerant or resistant to the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii* (Schmidt) under uninfested conditions. *European Journal of Agronomy* 98:37-45.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Florian M.W. Grundler für die Betreuung meiner externen Promotion danken. Danke für Ihre fachliche und konstruktive Kritik. Es war mir eine Freude, Teil Ihrer Arbeitsgruppe zu sein. Ich bedanke mich für die Unterstützung von Thomas Gerhardt, Stefan Neumann, Gisela Sichteremann, Ute Schlee, Birgit Otte, Dr. Abdelnaser Elashry, PD Dr. habil. Alexander Schouten, Dr. Sylvia Schleker und Dr. Shahid M. Siddique. Danke für eure Hilfsbereitschaft Badou, Chris, Jenish, Jehangir, Marion, Mary, Oliver, Phillip, Roman, Samer, Sandra, Shahzad, Shree, Sina, Somnath, Zoran und Julia.

Ich danke Frau Dr. Kerstin A. Nagel für die Betreuung der Rhizotronversuche am Forschungszentrum Jülich GmbH und die tatkräftige Unterstützung der Mitarbeiter Phil Pstrong, Carmen Müller, Beate Uhlig und Marcel Schneider.

Ein großes Dankeschön an alle meine Kollegen des Verbandes der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V. und der ARGE Zuckerrübe Südwest. An die Projektmitarbeiter Sabrina Cappel, Pascal Kremer, Irina Demetjew und Mareike Schwind sowie den ins Projekt involvierten Studenten Jan Schlüter, Stephanie Kehm, Jonas Fischer und Ina Hanisch. Ich bedanke mich für die freundliche und herausragende Zusammenarbeit, die nicht nur unsere Projekte, sondern auch uns wesentlich voran gebracht hat. Ohne die Versuchstechniker Harald Bauer, Axel Siekmann und Jürgen Fiest hätte es keine Feldversuche gegeben, Danke! Christine Wendel, Anna Schuld und Ulrike de Héraucourt, vielen Dank für eure Unterstützung. Mein größter Dank gilt Herrn Dr. Christian Lang, der mir in vielerlei Hinsicht weitergeholfen und zum Gelingen der Projektarbeiten maßgeblich beigetragen hat. Danke dafür, dass Sie mich mit Diskussionen, Anregungen und genialen Ideen weitergebracht haben. Mehrere Projektpartner haben die Arbeiten im Teilprojekt Nematoden des Forschungsprojekts „Zukunft Zuckerrübe“ erst möglich gemacht. Ich danke dem Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Ernährung, Weinbau und Forsten Rheinland-Pfalz, dem Kuratorium für Versuchswesen und Beratung im Zuckerrübenanbau, dem Hessischen Ministerium für Umwelt, Klimaschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, der Strube Research GmbH & Co. KG und der Stiftung Südwestdeutscher Zuckerrübenanbau für die finanzielle Unterstützung des Projekts Zukunft Zuckerrübe. Herrn Thomas Bickard vom Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen, Herrn Michael Lenz vom Regierungspräsidium Gießen, Herrn Dr. Jörg Hüther vom Hessischen Ministerium für Umwelt, Klimaschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Herrn Dr. Erich Jörg, Frau Dr. Sabine Fabich vom DLR Rheinhessen-Nahe-Hunsrück sowie Frau Dr. Sandra Otte der Strube Research danke ich für die projektlenkende wissenschaftliche Unterstützung.

Ein ganz persönlicher Dank geht an meine Freunde und Familie, die meinen Lebensweg stets unterstützt und bereichert haben.