

Dr. Ute Kastirr, Dr. Katja Richert-Pöggeler

Schlussbericht zum Vorhaben
Untersuchung von Interaktionen
zwischen bodenbürtigen
Zuckerrübenviren und deren
Auswirkung auf die Rizomania

Berichte aus dem Julius Kühn-Institut

201



Kontaktadressen/ Contacts

Julius Kühn-Institut
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik
06484 Quedlinburg
Erwin-Baur-Straße 27

E-Mail: ep@julius-kuehn.de
Telefon +49 (0) 0 39 46 47-0
Telefax +49 (0) 0 39 46 47-500

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.
Die Berichte aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher als OPEN ACCESS-Zeitschrift.
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:
<http://www.julius-kuehn.de> Bereich Veröffentlichungen – Berichte.

We advocate open access to scientific knowledge. Reports from the Julius Kühn Institute are therefore published as open access journal. All issues are available free of charge under <http://www.julius-kuehn.de> (see Publications – Reports).

Herausgeber / Editor

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Braunschweig, Deutschland
Julius Kühn Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Braunschweig, Germany

Vertrieb

Saphir Verlag, Gutsstraße 15, 38551 Ribbesbüttel
Telefon +49 (0) 5374 6576
Telefax +49 (0) 5374 6577
verlag@saphirverlag.de

ISSN 1866-590X

DOI 10.5073/berjki.2018.201.000



Dieses Werk ist lizenziert unter einer [Creative Commons – Namensnennung – Weitergabe unter gleichen Bedingungen – 4.0 Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

This work is licensed under a [Creative Commons – Attribution – ShareAlike – 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

Schlussbericht

zum Vorhaben

Untersuchung von Interaktionen zwischen bodenbürtigen Zuckerrübenviren und deren Auswirkung auf die Rizomania

Zuwendungsempfänger und ausführende Stelle:

Julius Kühn-Institut
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik
06484 Quedlinburg
Erwin-Baur-Straße 27

Förderkennzeichen:

EP-2208 Haushaltsprojekt

Laufzeit:

01. 07. 2012 bis 31. 03. 2018

Monat der Erstellung:

Oktober 2018

Abschlussbericht von:

Dr. Ute Kastirr, Dr. Katja Richert-Pöggeler

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Abkürzungsverzeichnis

Institutionen

JKI	Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen Quedlinburg
-EP	Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Braunschweig

Rübenkulturen

Zuckerrübe	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>
Rübe	<i>Beta macrocarpa</i>

Pathogene

Virusvektor	<i>Polymyxa betae</i>
Benyviren	
BNYVV	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
BSBMV	<i>Beet soil-borne mosaic virus</i>
BOLV	<i>Beet oak leaf virus</i>
<i>Pomoviren</i>	
BSBV	<i>Beet soil-borne virus</i>
BVQ	<i>Beet virus Q</i>
Virusvektor	<i>Olpidium brassicae</i>
Necrovirus	
BBSV	<i>Beet black scorch virus</i>
TNV	Tobacco necrosis virus

Infektionsmethoden

Vortex-Inokulation	Virusübertragung durch mechanische Verletzung von Wurzelzellen mittels Karborund bei kreisender Durchmischung des Inokulums
mechanische Inokulation	Abreiben von Blättern mit virushaltigem Presssaft
wpi	'week post inoculation' - Wochen nach der Inokulation
dpi	'day post inoculation' – Tag nach der Inokulation

serologischer Virusnachweis

DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay Antikörper basiertes Nachweisverfahren
mAK	monoklonale Antikörper
PAS	polyklonales Antiserum
IgG	Immunglobulin G (IgG)- oder Gammaglobulin-Antikörper
Konjugat	IgG gekoppelt mit alkalischer Phosphatase
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

Molekularbiologische Nachweisverfahren

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Real-Time qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
DNS	Desoxyribonukleinsäure
cDNS	komplementäre <i>Desoxyribonukleinsäure</i>
RNS	Ribonukleinsäure

Tabelle	Inhalt	Seite
Tabelle 1:	Pathogen-Komplex bodenbürtiger Zuckerrübenviren	11
Tabelle 2:	Anbauregionen, die in die Erhebungen zum Auftreten bodenbürtiger Zuckerrübenviren einbezogen wurden	12
Tabelle 3:	Primersequenzen und Amplikongrößen für den spezifischen RT-PCR-Nachweis	11
Tabelle 4:	BNYVV-Isolate aus verschiedenen geografischen Regionen	13
Tabelle 5:	Infektion und Ausbreitung des BSBMV in verschiedenen Indikatorpflanzen	15
Tabelle 6:	Sporadischer Vergleich von Partikellängen des BSBMV in <i>Ch. quinoa</i> und in <i>S. oleraceae</i>	17
Tabelle 7:	Reinigung des BSBMV aus verschiedenen Indikatorpflanzen	18
Tabelle 8:	Serologischer Differenzierung der Benyviren in Infektionsgemischen	19
Tabelle 9:	Reaktion des bodenbürtigen Zuckerrübenvirus-Isolates RR-2a mit dem BOLV-Antiserum im DAS-ELISA	24
Tabelle 10:	Nachweis von Partikeln des BOLV ähnlichen Virus RR-2a	24
Tabelle 11:	Nachweis von Viruspartikeln im RR-2a-Präparat nach Anreicherung	25
Tabelle 12:	BSBV-Isolate aus verschiedenen geografischen Regionen	27
Tabelle 13:	Vorkommen des BSBV gemeinsam mit nicht definierten Satelliten	28
Tabelle 14:	BVQ-Isolate aus verschiedenen geografischen Regionen	29
Tabelle 15:	Serologischer Nachweis des BBSV in Indikatorpflanzen	31
Tabelle 16:	Serologischer Nachweis des TNV-VH-Isolates	33
Tabelle 17:	Virusnachweis nach Vortex-Inokulation in Rübenwurzeln	36
Tabelle 18:	Bestimmung der Virus-RNA-Konzentration in Isolaten unterschiedlicher BNYVV-Typen	39
Tabelle 19:	Bestimmung der Virus-RNA-Konzentration in Isolaten unterschiedlicher BNYVV-Typen im verdünnten Presssaft	39

Abbildung	Inhalt	Seite
Abbildung 1:	Mikroskopischer Nachweis der Virusvektoren <i>P. betae</i> und <i>O. brassicae</i>	9
Abbildung 2:	Symptome des BNYVV an verschiedenen Indikatorpflanzen	13
Abbildung 3:	Isolation des BSBMV aus Colorado-Erde	14
Abbildung 4:	Isolation des BSBMV aus Zuckerrübenwurzeln	16
Abbildung 5:	Erfassung von Häufigkeitsklassen nach Partikellängen des BSBMV	17
Abbildung 6:	BSBMV-Reinigung von verschiedenen Indikatorpflanzen	18
Abbildung 7:	BOLV-Symptome an Zuckerrübe	19
Abbildung 8:	Blattflecken an Zuckerrübenblättern aus Ramrath-Erde	20
Abbildung 9:	Virusbelastung in Zuckerrüben-Mazeraten aus Ramrath-Erde	21
Abbildung 10:	Isolat RR-2a auf inokulierten <i>Ch. quinoa</i> -Blättern	21
Abbildung 11:	RR-2a in nachwachsenden <i>Ch. quinoa</i> -Blättern	22
Abbildung 12:	RR-2a in systemisch infizierten Spinatblättern	22
Abbildung 13:	RR-2a in <i>B. macrocarpa</i> -Blättern	22
Abbildung 14:	RR-2a in Blätter <i>Ch. foliosum</i> - und <i>Ch. murale</i> - Blättern	23
Abbildung 15:	BOLV-Symptome an Rübe nach mechanischer Inokulation	23
Abbildung 16:	Viruspartikel des BOLV-ähnlichen RR-2a-Isolates von Spinat	25
Abbildung 17:	Nachweis des RR-2a- Hüllproteins im Western Blot	26
Abbildung 18:	Isolation des BSBV aus Zuckerrüben	27
Abbildung 19:	Nachweis von unbekanntem Satelliten-Partikeln	28
Abbildung 20:	Isolation des BVQ aus Zuckerrüben	29
Abbildung 21:	Phylogenetischer Stammbaum der bekannten BBSV-Isolate	29
Abbildung 22:	Temperatur abhängige Symptom-Entwicklung der bodenbürtigen Viren	30
Abbildung 23:	Nachweis von unterschiedlichen Wirtspflanzen für das BSSV	31
Abbildung 24:	BBSV-Lokalläsionen auf <i>B. vulgaris</i> nach mechanischer Inokulation	31
Abbildung 25:	Nachweis des TNV nach Isolation aus Zuckerrübenwurzel	32
Abbildung 26:	Nachweis des TNV vom Standort Vierhöfen	32
Abbildung 27:	Differenzierende Symptomausprägung bodenbürtiger Zuckerrübenviren	34
Abbildung 28:	Trennung der Pomoviren BVQ und BSBV vom BNYVV	34
Abbildung 29:	Inokulation von Zuckerrübensämlingen mittels Vortex-Methode	35
Abbildung 30:	Gewinnung von Vektor-Virus-Populationen	37

Abbildung 31:	Nachweis von <i>P. betae</i> und des BNYVV nach Vortex-Inokulation	40
Abbildung 32:	Ausbreitung und Vermehrung von BNYVV-Typen nach Vortex-Inokulation	41
Abbildung 33:	Entwicklung der Rübengewichte nach Infektion durch Benyviren	42
Abbildung 34:	Infektionsverlauf der Benyviren in Einzel- und Mischinfektion	43
Abbildung 35:	Infektionsverlauf des BNYVV und BVQ in Einzel- und Mischinfektion	43

Inhalt

	Seite
1. Ziele des Forschungsvorhabens	5
1.1. Aufgabenstellung	5
1.2. Beschreibung des Forschungs- und Technikstandes	6
2. Wissenschaftliche Ergebnisse	9
2.1. Isolation und Differenzierung von Virus- und Vektorisolaten aus Zuckerrübe	9
<i>Benyviren</i>	13
I. <i>Beet necrotic yellow vein virus</i> (BNYVV)	13
II. <i>Beet soil-borne mosaic virus</i> (BSBMV)	14
III. <i>Beet oak leaf virus</i> (BOLV)	19
<i>Pomoviren</i>	26
I. <i>Beet soil-borne virus</i> (BSBV)	26
II. <i>Beet virus Q</i> (BVQ)	28
<i>Tombusviridae</i>	29
I. <i>Beet black scorch virus</i> (BBSV)	29
II. <i>Tobacco necrosis virus</i> (TNV)	32
2.2. Erstellung definierter Virus-Vektor-Populationen	33
2.2.1. Separierung der bodenbürtigen Viren	33
2.2.2. Etablierung der Vortex-Inokulationsmethode	35
2.2.3. Erstellung von definierten Virus-Vektor-Populationen	36
3. Beobachtung von Interaktionen zwischen Benyviren in künstlichen Infektionssystemen	38
Danksagung	44
Literatur	45

1. Ziele des Forschungsvorhabens

Einleitung

Im Rahmen eines vorangegangenen Drittmittelprojektes (Schlussbericht FKZ 22013608, 08NR136: 'Aufklärung des Rizomaniakomplexes als Beitrag zur nachhaltigen Ethanolproduktion aus Zuckerrübe', Kastirr und Fomitcheva, 2012) wurde das Vorkommen bodenbürtiger Viren in den wichtigsten Anbaugebieten der Zuckerrübenproduktion in Deutschland analysiert und festgestellt, dass 62% dieser Flächen mit dem *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), *Beet soil-borne virus* (BSBV) und *Beet virus Q* (BVQ) vergemeinschaftet kontaminiert sind. Virus spezifische Diagnostika für die sichere Differenzierung bodenbürtiger Viren wurden etabliert. Es wurden neue PCR-Varianten für den Zeit und Kosten sparenden Simultannachweis der o.g. Erreger sowie prophylaktisch für zwei weitere, bisher in Europa noch nicht nachgewiesene bodenbürtige Rübenviren (*Beet soil-borne mosaic virus* - BSBMV, *Beet black scorch virus* - BBSV) entwickelt. Der Virusvektor, *Polymyxa betae* Keskin, wurde gezielt mit unterschiedlichen Viruskomponenten beladen. Somit konnten Grundlagen für die weitere Erforschung von Wechselwirkung zwischen bodenbürtigen Viren in mischinfizierten Pflanzen geschaffen werden. Das Ziel des Projektes bestand darin, durch die Erzeugung und stabile Vermehrung verschiedener Virus spezifischer Vektorpopulationen methodischen Voraussetzungen zu schaffen, um in mischinfizierten Rübenpflanzen mögliche Wechselwirkungen zwischen den Viren in unterschiedlicher Kombination zu analysieren.

Gesamtziel des Forschungsvorhabens:

Ziele dieses Projektes waren die Aufklärung von Interaktionen zwischen bodenbürtigen Viren der Zuckerrübe, die auf die Ausprägung des Krankheitsbildes der Rizomania Einfluss haben können. Um Pathogen relevante Interaktionen zwischen einzelnen Viren zu erforschen, war es notwendig, die einzelnen Viren zu separieren, ihr Infektionsverhalten zu beschreiben, definierte Virus-Vektor-Populationen mit hoher Virusübertragungseffizienz zu schaffen, Wechselwirkungen in künstlichen Infektionssystemen zu bewerten und Schlussfolgerungen für die mögliche Wirkung von Synergien zwischen den Erregern ziehen zu können.

1.1. Aufgabenstellung

1. Isolation und Differenzierung vereinzelter bodenbürtiger Viren aus Zuckerrübe
 - Isolation der Viren aus Zuckerrübenwurzeln über die Fangpflanzenmethode
 - Biologische Differenzierung der Viren an Indikatorpflanzen
2. Erstellung definierter Virus-Vektor-Populationen
 - Separierung und Vermehrung der Viren und virusfreier Vektorisolate
 - Etablierung der Vortex-Infektionsmethode für alle Viren
 - Erstellung von definierten Virus-Vektor-Populationen
3. Beobachtung von Interaktionen zwischen den Viren in künstlichen Infektionssystemen
 - Untersuchung von synergistischen Effekten zwischen verschiedenen Viren

Planung des Vorhabens

Nach den Erhebungen zum Vorkommen bodenbürtiger Viren in den wichtigsten Zuckerrüben-Anbaugebieten in Deutschland wurden aggressive Isolate des Benyvirus

(BNYVV) und der Pomoviren (BSBV und BVQ) für die Untersuchungen von Wechselwirkungen ausgewählt. Die Gewinnung der Virusisolate erfolgte aus Bodenproben der Befallsgebiete mittels Fangpflanzenmethode unter Klimakammerbedingungen. Die Viren wurden aus den natürlich vorkommenden Pathogenpopulationen durch präparative Trennung in Indikatorpflanzen separiert, einzeln vermehrt und als reine Virusisolate konserviert. Weiterhin wurden zwei virusfreie *P. betae*-Populationen als Inokulum für Infektionsversuche isoliert und vermehrt.

Untersuchungen zu eventuell auftretenden synergistischen Effekten zwischen den bodenbürtigen Viren bei Mischkontamination in der Zuckerrübe schließen komplexe Wechselwirkungen zwischen Virus, Vektor und der Wirtspflanze ein, für deren experimentelle Handhabung Grundlagen geschaffen werden mussten.

Für die gezielte Infektion von Zuckerrüben mit den Beny- und Pomoviren wurde die Vortex-Inokulationsmethode eingesetzt. Gesunde Sämlingen wurden mit virusfreier *P. betae* infiziert und eine gezielte Beladung des Virusvektors mit den vier Viren einzeln und mit beiden Benyviren im Gemisch vorgenommen. Die auf diese Art künstlich geschaffenen Virus-Vektor-Populationen wurden hinsichtlich ihrer Effizienz der Virusübertragung auf unterschiedliche Genotypen überprüft. Diese Populationen wurden mit Hilfe sensitiver Nachweismethoden gegen das bekannte Virusspektrum getestet, um ihre Beladung mit verschiedenen Viren zu erkennen.

Die Wechselwirkungen zwischen den Viren sollten durch Konzentrationsbestimmung der Virus-RNA mittels Real-Time qPCR während des Infektionsverlaufes, durch Virusnachweis in verschiedenen Pflanzenteilen mittels RT-PCR und durch serologischen Virusnachweis in mischinfizierten Indikatorpflanzen mittels DAS-ELISA beschrieben werden.

Das Vorkommen des BBSV in Spanien lässt vermuten, dass es auch in Europa weiter verbreitet sein kann. Deshalb ist die Etablierung von Diagnosemethoden für dieses Virus von Bedeutung.

1.2. Beschreibung des Forschungs- und Technikstandes

Bodenbürtige Zuckerrübenviren sind weltweit verbreitet und infizieren die Zuckerrübe mit unterschiedlichem Schadausmaß. Sie gehören taxonomisch verschiedenen Virusfamilien an. Das BNYVV und das BSBMV stammen aus der Familie der *Benyviridae* und sind Vertreter der Gattung *Benyvirus*. Das BSBV und das BVQ gehören der Familie *Virgaviridae* an und sind Vertreter der Gattung *Pomovirus*. In die Familie der *Tombusviridae* gehören u.a. das BBSV aus der Gattung *Betanecrovirus* und das TNV (*Tobacco necrosis virus*) aus der Gattung *Alphanecrovirus*.

Benyviren

Das Benyvirus **BNYVV** ist das wirtschaftlich bedeutsamste Zuckerrüben-Virus, welches die Virose Rizomania verursacht und die Erträge in Befallsflächen extrem reduzieren kann. Es wurde um 1950 in Japan nachgewiesen und in Europa erstmalig 1952 in Italien (Canova, 1959), 1972 in Deutschland (Hamdorf et al., 1977), 1987 in Großbritannien und nachfolgend in vielen anderen Ländern registriert. In Europa kommt das Virus in 22 Ländern, in Asien in 6 Ländern und in verschiedenen amerikanischen Bundesstaaten (Idaho, Nebraska, New Mexico, Texas, Washington, Wyoming) vor. Das BNYVV wird durch den Protisten *Polymyxa betae* übertragen und ist sehr variabel in seiner Aggressivität und seinen molekularbiologischen Eigenschaften. Für das BNYVV wurde das Vorkommen verschiedener Virustypen (A-, B-, P-, F-Typ) charakterisiert (Kruse et al., 1994; Koenig et al.,

2000). In Deutschland war bis 2006 nur der B-Typ des Virus bekannt. Im Jahre 2006 wurde erstmals in einem Zuckerrübenanbaugesamt bei Berßel in Sachsen-Anhalt BNYVV-Befall mit dem B-Typ und dem in Japan vorkommenden J-Typ nachgewiesen (Koenig et al. 2008a und 2008b). Die Rizomania war in diesem Feld stärker ausgeprägt als in anderen Befallsflächen Deutschlands. Das BNYVV-Genom besteht aus vier bis fünf ssRNA's mit den Größen für RNA1-6746 Nukleotiden (nt), RNA2- 4612nt, RNA3- 1773nt, RNA4-1467nt und RNA5-1350nt (Putz, 1977) mit einem Hüllprotein von 21 kDa. Für die stäbchenförmigen starren Partikel mit Zentralkanal sind unterschiedliche modale Partikellängen im Bereich von 85nm, 100nm, 265nm und 390nm bekannt. Für das Hüllprotein des BNYVV wurden Analysen der Antigen-spezifität durchgeführt und mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (MAB) fünf spezifischen Epitop-Gruppen identifiziert (Koenig et al., 1990).

Das Benyvirus **BSBMV** wurde erstmals 1988 in Texas nachgewiesen (Liu and Duffus, 1988). Es wird auch durch *P. betae* übertragen und ist bisher nur in den USA weit verbreitet (Rush, 2003). Die stäbchenförmigen Viruspartikel sind morphologisch denen des BNYVV ähnlich. Die Partikellängen wurden zwischen 50nm bis 400nm beschrieben (Heidel et al., 1997). Serologisch unterscheiden sich die beiden Viren, die oft vergemeinschaftet in den Feldern und Pflanzen vorkommen, und zeigen Kreuzreaktionen zwischen den homologen Antiseren (Wisler et al., 1994). Es wurden vier genomische RNA's des BSBMV beschrieben (Lee et al., 2001), deren Genom-Organisation eine Ähnlichkeit zu der des BNYVV in RNA 1 von 77%, in RNA 2 von 67%, in RNA 3 von 60% und in RNA 4 von 35% hat. Die RNA-Größen betragen für RNA 1- 6,7kb; RNA 2 - 4,6kb; RNA 3 - 1,7kb und RNA 4 - 1,2kb (Heidel et al., 1997). Weiterhin wurden durch Wisler et al. (2003) Interaktionen zwischen dem BNYVV und dem BSBMV beschrieben, die dazu führen, dass in Mischinfektionen die Virustiter des BSBMV deutlich reduziert werden. Jedoch unterdrückt das gegen BNYVV wirksame Rz2-Resistenzgen das BSBMV nicht. In Europa spielt das BSBMV noch keine Rolle im Zuckerrüben-Anbau.

Das Benyvirus ähnliche *Beet oak leaf virus* (**BOLV**) wurde in Kalifornien entdeckt und beschrieben (siehe 2.1. Benyviren III). Es wird ebenfalls durch *P. betae* übertragen und ist in verschiedenen Bundesstaaten der USA wie Colorado, Michigan, Minnesota, Nebraska, und Wyoming weit verbreitet (Liu et al., 2003). Es kommt allein in Zuckerrübe vor oder in Mischinfektion mit dem BNYVV, BSBMV oder mit beiden Benyviren. Liu und Lewellen (2008) und Liu und Anju (2011) berichteten über Interaktionen zwischen dem BNYVV und dem BOLV, die bewirken, dass sich in Mischinfektionen mit beiden Viren durch eine unterdrückende Wirkung des BOLV die Virustiter des BNYVV in stark infizierten Feldern verringern, während die Titer des BOLV in Einzel- und Mischinfektionen gleich hoch bleiben.

Pomoviren

Das *P. betae* übertragbare Pomovirus **BSBV** wurde in Zuckerrüben erstmals 1982 in Großbritannien beobachtet (Ivanovic et al., 1983; Henry et al., 1986). Danach wurde es auch in vielen Europäischen Ländern (Belgien, Bulgarien, Dänemark, Finnland, Schweden, Niederlande, Frankreich, Deutschland Ungarn), in der Türkei, in den USA, in Syrien und im Iran erkannt. In Deutschland wiesen Lesemann et al. (1989) Ende der 80-er Jahre dieses Virus erstmals nach und später wurden zwei Serotypen des BSBV (Ahlum und Wierthe) identifiziert (Barbarossa et al. 1992). Die weite Verbreitung des BSBV in Ostdeutschland wurde von Kastirr et al. 1990b gezeigt. Das BSBV (Serotyp Ahlum) hat stäbchenförmige Partikel mit Zentralkanal in einem Längenbereich von 50nm bis 310nm. Da es sehr schwierig ist, ein hochgereinigtes Viruspräparat herzustellen, wurden RNA-Präparationen aus infizierten Pflanzen durchgeführt (Hutchinson et al., 1992; Kaufmann et al. 1992), welche zeigten, dass das Virusgenom aus drei RNA-s besteht (RNA1-6,1-6,4 kb; RNA2- 3,0-3,6kb;

RNA3- 2,6-3,3kb). An Zuckerrübe verursacht das BSBV keine deutlichen Symptome, führt jedoch zu einer vermehrten Faserwurzelbildung. Auf *Ch. quinoa* entstehen chlorotische Flecken, die sich 7-10 dpi entlang der Adern ausbreiten und zu braunen Flecken nekrotisieren.

Der Serotyp Wierthe wurde erstmals in der Nähe von Braunschweig isoliert und später als eigenständiges Pomovirus, *Beet virus Q (BVQ)* mit dem BSBV ähnlichen Viruspartikeln klassifiziert (Koenig et al., 1998). Das BVQ wurde auch in Belgien, Bulgarien, Frankreich Ungarn, Italien und den Niederlanden identifiziert. Typische Symptome an Zuckerrübe sind nicht erkennbar. Auf *Ch. quinoa* bilden sich ungleichmäßige Flecken, die sich entlang der Adern ausbreiten. Eine systemische Ausbreitung in dieser Indikatorpflanze wurde bisher nicht beobachtet. Dieses Virus wurde nie in Einzelinfektion, sondern immer in Co-Infektion mit dem BSBV, dem BNYVV oder mit beiden Viren beobachtet. Sein Genom besteht aus den RNA-s 1- 6003bp; 2- 2913bp und 3- 2529bp.

Tombusviridae

Neben den Beny- und Pomoviren kann auch das *Betanecrovirus Beet black scorch virus (BBSV)* als Pathogen für die Zuckerrübe eine Rolle spielen. Es wurde erstmals als eine neue Art der Gattung *Betanecrovirus* in China identifiziert (Cui et al., 1988; Cai et al., 1993). Weiterhin kommt es in den USA (Weiland et al., 2006, 2007), im Iran (Koenig et al., 2008c, Merhvar et al., 2009,) und in Spanien (Gonzales-Vazquez et al., 2009) vor. Dieses Virus hat isometrische Partikel, ein 3644nt großes Genom mit zwei sub-genomischen RNA-s (Wang et al, 2018), hat eine Nukleotidentität mit dem des TNV von 61% (Cao et al., 2002), wird auch durch den Vektor *Olipidium brassicae* übertragen (Jiang et al., 1999) und verursacht durch systemische Krankheitsausbreitung Ertragsreduktionen. Das BBSV kann starke Symptome an Zuckerrübe in Form von Wurzelbärtigkeit und Blattflecken, die großflächig zu schwarzen Flecken nekrotisieren (Weiland et al., 2006 und 2007) verursachen. Niedrige Temperaturen (18°C) verbessern den Infektionsprozess (Xu et al. 2016). Tritt das BBSV gemeinsam mit dem BNYVV auf, verursachen beide Viren eine dramatische Verstärkung der Krankheitssymptome. Der Nachweis des BBSV in Zuckerrübe ist oft unsicher, weil zum einen das Virus in der Wurzel sehr ungleichmäßig verteilt ist und zum anderen das Virus in dem nekrotisierten Gewebe schnell abgebaut wird.

Das BBSV zeigt biologische und molekularbiologische Ähnlichkeiten mit dem *Alphanecrovirus Tobacco necrosis virus (TNV)*, welches weltweit, auch in Deutschland (Bode, 1958; Kegler et al., 1969), verbreitet ist und einen großen Wirkkreis hat. Es wurde in 298 Arten aus 167 Gattungen in 54 Pflanzenfamilien nachgewiesen (Edwardson, 1997). Die isometrischen Partikel haben einen Durchmesser von 28nm, und werden durch *O. brassicae* übertragen. Es wurden unterschiedliche Stämme/Serotypen (TNV-A, -D, -E, -P, -T) beschrieben (Babos, 1963, Montabini, 1996).

Interaktionen zwischen verschiedenen bodenbürtigen Zuckerrübeviren sowie der Einfluss von Mischinfektionen auf die Vermehrung und Ausbreitung der verschiedenen Viren in der Zuckerrübe sind bisher kaum untersucht und fordern damit spezifische Analysen dieser Wechselwirkungen (Prillwitz und Schlosser,1992). Es wurde jedoch nachgewiesen, dass es den Infektionsverlauf einzelner Viren unterdrückende Interaktionen zwischen den Benyviren in Mischkontamination gibt. Einerseits beobachteten Wisler et al. (2003) Wechselwirkungen zwischen den Benyviren in Feldern, die mit dem BNYVV und BSBMV kontaminiert waren. Sie wiesen nach, dass das BNYVV in mischinfizierten Pflanzen die Vermehrung des BSBMV deutlich hemmt. Dieser Effekt wurde sogar in BNYVV resistenten Sorten mit geringer Viruskonzentration beobachtet. Andererseits wurde gezeigt, dass das neue

Benyvirus ähnliche BOLV verschiedene aggressive BNYVV Isolate, die in der Lage zum Resistenzdurchbruch sind, unterdrückt (Liu and Lewellen, 2008). Weiterhin kann in Abhängigkeit vom Virusstamm die Ausprägung der BNYVV-Resistenzreaktionen in den Sorten variieren (Harrison, 2002, Liu et al, 2005, Chiba et al., 2008, Koenig et al., 2009, Bornemann, 2012).

Die Methode der gezielten Infektion von Rübensämlingen mit dem BNYVV durch Vortex-Inokulation der Wurzeln war ursprünglich von Koenig und Burgermeister (1989) und Koenig et al. (1991) entwickelt worden. Diese Methode musste zunächst im eigenen Labor etabliert und anschließend für die bislang noch nicht realisierte, erfolgreiche mechanische Übertragung von BSBV, BVQ und BSBMV angepasst werden. Über die experimentelle Beladung einer virusfreien Vektorpopulation mit BNYVV in Wurzeln Vortex-inokulierter Rübepflanzen sowie die anschließende vektorvermittelte Übertragung des Virus auf neue Sämlinge hatten erstmals Bornemann und Varrelmann (2011) berichtet. Dieser methodische Ansatz sollte übernommen und nach Möglichkeit erfolgreich auch für die Pomoviren BSBV und BVQ sowie für das Benyvirus BSBMV angepasst werden.

Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Für die erfolgreiche Bearbeitung des Forschungsvorhabens erfolgte eine enge Kooperation zwischen den Partnern aus Forschung und Züchtung (GFPI-Abteilung Betarüben). Die Wirtschaftspartner stellten wichtiges Ausgangsmaterial für die Pathogenanalyse aus bestimmten Befallsgebieten und Zuckerrübenzüchtlinien mit unterschiedlichen Resistenzquellen zur Verfügung. Der Forschungspartner übernahm die Untersuchungen des Erregerspektrums aus verschiedenen Befallsregionen, die Charakterisierung und Differenzierung der Schaderreger und führte Untersuchungen zu möglichen Interaktionen zwischen den Viren des Rizomaniakomplexes durch.

2. Wissenschaftliche Ergebnisse

2.1. Isolation und Differenzierung von Virus- und Vektorisolaten aus Zuckerrübe

➤ **Virusvektoren**

Die bodenbürtigen Viren der Zuckerrübe bilden einen Komplex bestehend aus den Virusvektoren (Abb. 1) *P. betae* (für Beny- und Pomoviren) und *O. brassicae* (für das Necrovirus) und den Benyviren (BNYVV, BSBMV, BOLV), Pomoviren (BSBV, BVQ) und dem Necrovirus BBSV (Tab. 1).

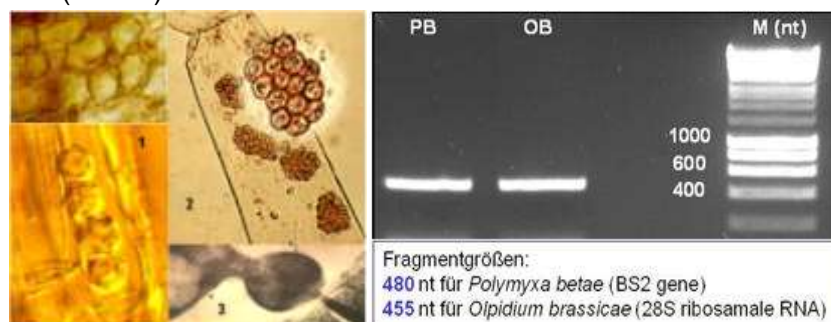


Abbildung 1: Mikroskopischer Nachweis der Virusvektoren *P. betae* und *O. brassicae* (U. Kastirr) und spezifische Detektion mittels RT-PCR (V. Fomitcheva).
 1: Dauerosporen von *O. brassicae* in Zuckerrübe, 2: Dauerosporen von *P. betae* in hairy root – Kulturen von Zuckerrübe, 3: Zoospore von *P. betae*, die mittels Stilet in eine Wurzelzelle eindringt (Keskin, 1964)

In vorangegangenen Arbeiten wurde für Ostdeutschland gezeigt, dass der Vektor bodenbürtiger Zuckerrübenviren, *Polymyxa betae* (Keskin), in fast allen Anbaugebieten vorkommt (Kastirr, Widera; 1988). Bereits 1986 wiesen D'Ambra und Mutto durch elektronenmikroskopische Untersuchungen nach, dass der durch normale Pflanzenschutzmaßnahmen nicht zu eliminierende Vektor durch pilzliche Antagonisten der Gattung *Trichoderma* bekämpft werden könnte. *Trichoderma harzianum* Rifai dringt durch enzymatische Lysis durch Zellwände in Zuckerrübenwurzeln ein und perforiert und degeneriert dort die Dauersporen. Camporota et al. (1988) bewiesen unter kontrollierten Bedingungen eine signifikante Beeinträchtigung des Wachstums von *P. betae* durch *Trichoderma* sp. an Zuckerrübensämlingen in natürlich verseuchter Erde. Wie unsere Untersuchungsergebnisse zur Wirkung von *Trichoderma*-Arten auf die Vermehrung von *P. betae* zeigten (Kastirr und Schmidt, 1990a), wird die Ausbildung der Dauersporen durch einige *Trichoderma*-Stämme erheblich eingeschränkt. In der unbehandelten Befallserde wurden alle untersuchten Pflanzen durch *P. betae* befallen und zeigten deutlichen Dauersporenbesatz. Durch die antagonistische Wirkung von verschiedenen *Trichoderma*-Stämmen wurde in den einzelnen Antagonisten-Varianten bei 69% bis 100% der Pflanzen die Ausbildung von Dauersporen im Verlaufe von 9 Monaten Kulturdauer verhindert. Die Etablierung eines Systems zur Bekämpfung von *P. betae* durch pilzliche Antagonisten unter Feldbedingungen ist sehr schwierig und fand bisher in der Praxis keine Anwendung. Im Rahmen der Untersuchungen zur Vektorübertragung dieser Viren wurden ein in vivo-Kultursysteme für *P. betae* in transformierten Zuckerrübenwurzeln erstellt (Kastirr, 1991) und Methoden zum gesicherten Nachweis des Vektors (Obermeier et al., 1994) etabliert. Weiterhin wurden die Bedingungen der Virusübertragung untersucht (Burgermeister, Kastirr; 1993, 1995) und durch ultrastrukturelle Analysen (Pfeilstetter et al., 1994) belegt.

Für den serologischen Nachweis der beiden Vektor-Arten lagen uns keine Antiseren vor. Aus diesem Grund wurden spezifische Primer (Tab. 3) für den Nachweis beider Vektoren mittels PCR erstellt (Fomitcheva, 2012). Hierfür wurden zunächst aus Genbank-Daten differenzierende Primer abgeleitet und erprobt. Aufgrund der aktuell noch sehr schmalen Datenbasis für diese beiden Mikroorganismen war es nicht möglich, Primerpaare zu generieren, die zu spezifischen Amplifikationsprodukten mit deutlich unterschiedlicher Fragment-Länge führten. Die DNA-Fragmente von 480 bp für *P. betae* und 455 bp für *O. brassicae* lassen sich im Standard-Agarosegel kaum trennen, weshalb der methodisch mögliche Simultannachweis der beiden Virusvektoren als Routinemethode nicht empfohlen werden kann.

Es wurden zwei Isolate von *P. betae* aus Wurzeln virusfreier Zuckerrüben gewonnen und mittels RT-PCR auf Belastung durch bodenbürtige Zuckerrübenviren und *O. brassicae* überprüft. Virusfreie Isolate wurden auf gesunden Zuckerrübenwurzeln vermehrt und in Form von getrocknetem Wurzelmehl konserviert.

➤ **Viruskomplex**

In der Darstellung des Standes der Forschung wurde der Viruskomplex, der die Ausprägung der Rizomania der Zuckerrübe beeinflussen kann, bereits beschrieben (s.a. Tab.1). In Deutschland kommen das BNYVV, BSBV und das BVQ sehr oft vergemeinschaftet in den Anbauflächen vor (Tab. 2).

Tabelle 1: Pathogen-Komplex bodenbürtiger Zuckerrübenviren

Virusgruppe	Virus		Vektor
Benyviren	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>	BNYVV	<i>Polymyxa betae</i>
	<i>Beet soil-borne mosaic virus</i>	BSBMV	
	<i>Beet oak leaf virus</i>	BOLV	
Pomoviren	<i>Beet soil-borne virus</i>	BSBV	<i>Polymyxa betae</i>
	<i>Beet virus Q</i>	BVQ	
Betanecrovirus	<i>Beet black scorch virus</i>	BBSV	<i>Olpidium brassicae</i>
Alphanecrovirus	<i>Tobacco necrosis virus</i>	TNV	

Wie bereits berichtet wurde, sind das BSBMV in Amerika und das BBSV in Asien weit verbreitet.

Um die Bedeutung der Viren für die Ausprägung der Virosen in Zuckerrübe zu erkennen und mögliche Interaktionen zwischen den Viren erklären zu können, ist es notwendig, aus den natürlich vorkommenden Virusgemischen jedes Virus einzeln zu isolieren und zu charakterisieren. Dafür wurde eine anfällige Zuckerrübenlinie (Linie 6005512, von der Firma Syngenta seeds GmbH) in Erdproben von kontaminierten Feldern als Fangpflanzen eingesät und ca. 6 Wochen unter Klimakammerbedingungen (23°C, 14 Stunden Licht bei 10 klx) inkubiert. Danach wurden Mazerate aus den Faserwurzeln und dem Hypokotyl der Fangpflanzen hergestellt und auf Blätter der Indikatorpflanzen abgerieben. In Abhängigkeit vom Virus reagierten die Indikatorpflanzen nach verschiedenen Inkubationszeiten mit unterschiedlichen Virussymptomen. Die Differenzierung und Separierung der Viren wurde mittels RT-PCR kontrolliert. Es wurden Virus spezifische Primer kreiert (Tab. 3), die teilweise auch für die Multiplex-RT-PCR eingesetzt werden konnten (Fomitcheva, 2012).

Tabelle 3: Primersequenzen und Amplikongrößen für den spezifischen RT-PCR-Nachweis von bodenbürtigen Zuckerrübenviren und deren Vektoren.

(Die hochgestellten Zahlen bezeichnen die Nukleotidpositionen im jeweiligen RNA-Molekül: BNYVV-RNA2, BSBV-RNA3, BVQ-RNA2, BSBMV-RNA2, BBSV-monopartites Genom (Fomitcheva, 2012).

Virus	Primer	Primersequenz in 5'-3' Orientierung	Amplikon (bp)
BNYVV	BNYVV-Fw	²⁰⁹ ACAATCGCATGCTATGGACT ²²⁹	357
	BNYVV-Rv	⁵⁶⁵ GCCAAACCAGCAAGACTAAC ⁵⁴⁶	
BSBMV	BSBMV-Fw	²⁴⁶ CCAGGCTTTGAGCCTCGATC ²⁶⁵	360
	BSBMV-Rv	⁶⁰⁵ TTAAAAGCTTGTAAGTGGT ⁵⁸⁶	
	BSBMV-Lenn-F BSBMV-Lenn-R	5' GGAGAAGTTGCTTACAATATG 3' 5' TTCGAGCAGCATTTAATTGC 3'	576
BSBV	BSBV-Fw	¹⁸⁸⁹ ATGGATCCTCCAGCAATAATA ¹⁹⁰⁹	573
	BSBV-Rv	²⁴⁶¹ TTAGAAACGACACTTTACCAC ²⁴⁴¹	
BVQ	BVQ-Fw	³⁴⁶ GAGCATTGGACCGCGGAACAT ³⁶⁶	477
	BVQ-Rv	⁸²² TGAGCCGGTCCACTTCAATCC ⁸⁰²	
BBSV	BBSV-Fw	¹¹ ACCAGTTTCTCGTTGATCAGC ³¹	718
	BBSV-Rv	⁷²⁸ TGGTCCTCTCTTCACCAGCA ⁷⁰⁹	
Vektor			
<i>P. betae</i>	PB-Fw1	²⁰¹ ACGTTACTGGAGACCAAC ²¹⁸	480
	PB-Rv1	⁶⁸⁰ CTGTCATCATATCCTTTAGAC ⁶⁶⁰	
<i>O. brassica</i>	OB-Fw2	¹ ACTCAATCTCAAATCAGGTAGGAT ²⁴	455
	OB-Rv3a	⁴⁶³ TTGCTGATTTGCTGCAAAGATTACT ⁴³⁹	

Tabelle 2: Anbauregionen, die in die Erhebungen zum Auftreten bodenbürtiger Zuckerrübenviren einbezogen wurden (2009 bis 2011)

Bundesland	landschaftliche Region	Ort
Brandenburg	Oder-Spree-Region	Reichenwalde/Boxberg
Niedersachsen	Elm-Lappwald, Elbe-Seitenkanal	Dungelbeck Ingeleben Söllingen Uelzen
Sachsen-Anhalt	Altmark Magdeburger Börde Elbe-Havel-, Mittellandkanal Harzvorland, Ilse Saale-Unstrut Tal südliches Anhalt Schwarze Elster/Elbe	Gieseritz/Wallstawe Rottersdorf Berßel Schlanstedt Merseburg Prosigk Jessen
Sachsen	Lommatzscher Pflege	Lommatzsch
Hessen	Rheinhessen Hessisches Ried Main-Gebiet	Herchsheim (Giebelstedt) Riedstadt /Leeheim Trebur/Wallerstädten Seligenstadt
Nordrhein-Westfalen	sumpfige Niederterrassen des Rheins Rheinland, Elft-Rheingebiet Soester Börde, 'Hammer Land' Niederrhein	Neubrück Ramrath Vanikum Soest Wachtendonk
Baden-Württemberg	Necker-Tauber-Gäuplatten	Grombach
Bayern	Donau-Wald-Gebiet Donau-Ries Oberfranken Ostbayern, Oberpfalz	Auburger Atting/Einhausen Froschhammer (Regensburg) Judenmann (Neutrabling) Niederachdorf Oberviehhausen /Wallerfing Polkasing Tabertshausen Thurnhof Vierhöfen-Wallersdorf Genderkingen Friesendorf Neutrabling

Benyviren

I. Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)

Das Rübenwurzelbärtigkeitsvirus verursacht im Bereich des Rübenkörpers die Ausbildung von einer Vielzahl von Faserwurzeln. Durch die Entstehung von Wurzelbärten wird die Ausprägung des ertragsrelevanten Rübenkörpers beträchtlich geschmälert. Diese Virose beeinträchtigt den Zuckerrübenanbau durch hohe Ertragsausfälle.

Der serologische Nachweis des BNYVV und dessen molekularbiologische Differenzierung wurden im Laufe der letzten Jahrzehnte weltweit von verschiedenen Arbeitsgruppen (Lin et al., 1990; Koenig et al., 1995) methodisch entwickelt und etabliert.

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden BNYVV-Isolate verschiedener Virustypen aus verschiedenen geografischen Regionen Deutschlands, aus Bulgarien, aus Frankreich und aus Italien gewonnen (Tab. 4). Somit konnten der A-, B-, P- und J-Typ des BNYVV in vergleichende Untersuchungen einbezogen werden. Die Symptome des BNYVV an Feldpflanzen und nach mechanischer Übertragung auf Indikatorpflanzen sind in Abbildung 2 dargestellt. Erste leuchten gelbe Läsionen auf *Ch. quinoa* werden 5 dpi sichtbar. Eine systemische Virusausbreitung des Virus erfolgt in Rübe, Spinat und *Nicotiana benthamiana*.

Land	Standort	BNYVV-Typ
		
Deutschland		
Niedersachsen	Dungelbeck	B
	Wierthe	B
Sachsen-Anhalt	Berßel	B/J
	Magdeburg	B
	Schlanstedt	B
Hessen	Trebur	B
	Leeheim	B
Sachsen	Jessen/Lommatzsch	B
Baden-Württemberg	Grombach	B
Bayern	Auburger	B
	Friesendorf	B
	Froschhammer	B
	Gernderkingen	B
	Judenmann	B
	Niederachdorf	B
	Oberviehhausen	B
	Poekasing	B
	Rottersdorf	B
	Tabertshausen	B
	Thurnhof	B
	Vierhöfen	B
	Wallerfing	B
Bulgarien	Trojanovo	B
Frankreich	Erstein	B
	Pithiviers	P
Italien	Boggian	A
	Roviga	A



Tabelle 4: BNYVV-Isolate aus verschiedenen geografischen Regionen

Abbildung 2: Symptome des BNYVV an verschiedenen Indikatorpflanzen

Feldpflanze: 1: Wurzelbärtigkeit, 2: Adernvergilbung, 3: gelbe Lokalläsionen nach mechanischer Inokulation (LL) auf *Chenopodium quinoa* 9 dpi, 4: *Ch. quinoa* 12 dpi, 5: Vergilbungen und LL auf *Ch. rubrum* 12 dpi, 6: LL und Vergilbung auf Spinat, 7: LL auf *Beta vulgaris*, 8: LL auf *B. macrocarpa*.

Der serologische BNYVV-Nachweis wurde mit dem polyklonalen Antiserum (PAS) 270 durchgeführt, welches gegen den französischen BNYVV-Stamm FR-Q 240 hergestellt wurde (Kleinhempel, Stanarius, 1985, nicht publiziert). Da zwischen den Benyviren eine enge serologische Verwandtschaft besteht, erfolgte der serologische BNYVV-Nachweis in Mischinfektionen mit dem monoklonalen Antikörper (Mab) AS0709/1, der uns von Prof. Renate Koenig zur Verfügung gestellt wurde. Eine molekularbiologische Virus-Differenzierung wurde durch Einsatz spezifischer Primer (Tab. 3) in der RT-PCR abgesichert.

II. Beet soil-borne mosaic virus (BSBMV)

Obwohl das BSBMV in Europa nicht vorkommt, wurde es in unser Forschungsvorhaben als Modelorganismus für den Nachweis von Interaktionen zwischen den Benyviren mit einbezogen. Das infektiöse Ausgangsmaterial für unsere Untersuchungen erhielten wir 2010 von Prof. Ch. Rush (USA) und Dr. C. Ratti (Italien) in Form von infektiösen Bodenproben und getrocknetem Wurzelmaterial, die als Quarantänematerial behandelt wurden.

- Isolation des BSBMV

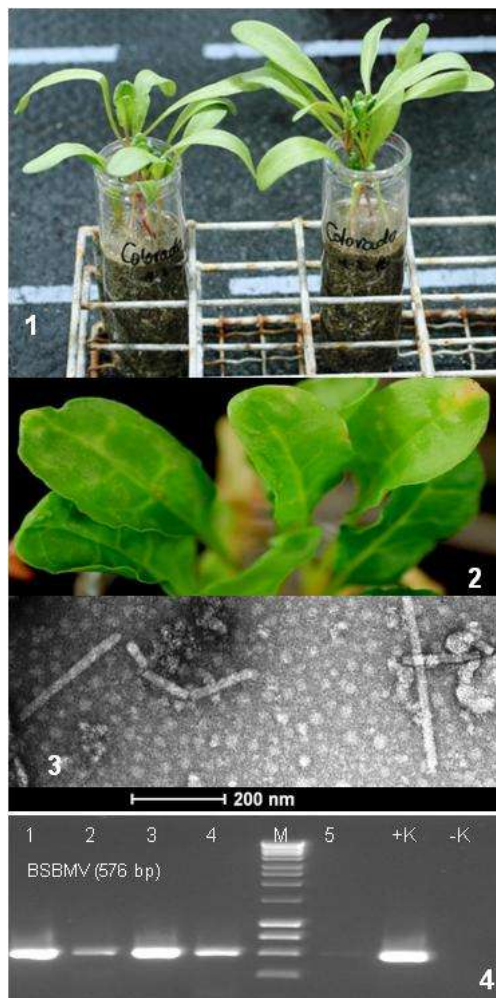


Abbildung 3: Isolation des BSBMV aus Colorado-Erde
 1: Kultivierung von Zuckerrübe in Colorado-Erde, 2: Blattsymptome auf Zuckerrübe (8wpi),
 3: Elektronenmikroskopischer Nachweis stäbchenförmiger Viruspartikel im Zuckerrübenblatt,
 4: BSBMV-Nachweis mittels RT-PCR: 1 und 3 aus Faserwurzeln, 2, 4 und 5 aus Blatt

Im Jahr 2010 erfolgte die Isolation des BSBMV. Mittels Fangpflanzenmethode wurden anfällige Zuckerrüben (Linie 6005512) in eine Erdprobe einer Befallsfläche aus Colorado

eingesät und unter Klimakammerbedingungen bei 23°C und 14 Stunden Licht (10 klx) inkubiert (Abb. 3-1).

Nach einer Inkubationszeit von 8 Wochen (wpi) zeigten sich auf den Blättern Virussymptome in Form von gelben Flecken im Blatt und entlang der Adern (Abb. 3-2). In diesem infizierten Gewebe wurden im Transmissionselektronenmikroskop stäbchenförmige Viruspartikel nachgewiesen (Abb. 3-3). Der elektronenmikroskopische Nachweis von Viruspartikel des BSBMV im Blattsaft infizierter Rübenpflanzen und Indikatorpflanzen erfolgte mittels Negativ-Staining-Verfahren (Negative stain) wobei der in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer gewonnene Blattsaft für 20 min. auf dem beschichteten Objektträger inkubierte und nach Abwaschen des Saftes das Präparat für 10 min. in 2% Uranylacetat kontrastierte (Abb. 4/6).

Der molekularbiologische Nachweis des BSBMV erfolgte durch RT-PCR nach Isolation der Total-RNA. Die RT-PCR verlief nach dem beschriebenen Standardprotokoll unter Verwendung Virus spezifischer Primer nach Lennefors et al., 2005 (BSBMV-Lenn-F/R, Tab. 3), die ein PCR-Produkt mit einer Fragmentgröße von 576 bp (Abb. 3-4) amplifizierten.

Tabelle 5: Infektion und Ausbreitung des BSBMV in verschiedenen Indikatorpflanzen

Wirtspflanze / Indikatorpflanze	BSBMV-Infektion
Zuckerrübe	<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris L.</i> systemisch
Mangold	<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris L.</i> systemisch
Großfrüchtige Rübe	<i>Beta vulgaris subsp. macrocarpa Guss.</i> systemisch
Spinat 'Matador'	<i>Spinacia oleracea L.</i> systemisch
Spinat 'Neuseeländer'	<i>Tetragonia tetragonoides (Pall.) Kuntze</i> systemisch
Roter Gänsefuß	<i>Chenopodium rubrum L.</i> systemisch
Quinoa	<i>Ch. quinoa Willd.</i> lokal
Spinatbaum	<i>Ch. amaranticolor (Coste et Reyn)</i> lokal
Erdbeerspinat	<i>Ch. foliosum Asch.</i> lokal
Wildtabak	<i>Nicotiana benthamiana</i> lokal

1	Zuckerrübe
2	Mangold
3	Spinat 'Matador'
4	Spinat 'Neuseeländer'
5	Roter Gänsefuß
6	Quinoa
7	Spinatbaum
8	Erdbeerspinat

(BSBMV-Fw:²⁴⁶CCAGGCTTTGAGCCTCGATC²⁶⁵, BSBMV-Rv:⁶⁰⁵TTAAAAGCTTGAAAGTGGT⁵⁸⁶, Amplikon von 360 bp)

- Infektionsausbreitung in verschiedenen Wirtspflanzen

Aus den Faserwurzeln und dem Hypokotyl dieser Zuckerrübensämlinge wurden Mazerate in 0,05 M Phosphatpuffer (PBS) hergestellt, die als Inokulum für die mechanische Inokulation von Indikatorpflanzen dienen, unter den gleichen klimatischen Bedingungen inkubierten und auf verschiedene Wirte übertragen wurden. Der spezifische BSBMV-Nachweis erfolgte mittels RT-PCR [Primer BSBMV-Fw/-Rv von der RNA 2 mit einem Fragment von 360 bp (V. Fomitcheva, 2012)]. Das gewonnene BSBMV-Isolat 'Colorado' (BSBMV-Col) wurde auf *Ch. quinoa* vermehrt und in Form von Kalzium-Trockenkultur und bei -20°C eingefrorenem Blattmaterial konserviert.

Die BSBMV-Infektion breitete sich nicht nur im natürlichen Wirt, der Zuckerrübe, systemisch aus, sondern auch in *B. macrocarpa*, Mangold, Spinat, *Tetragonia tetragonioides (expansa)* und im Roten Gänsefuß (Tab. 5/1-5), während sie in anderen *Chenopodium*-Arten auf die inokulierten Blätter lokalisiert blieb (Tab. 5/6-8). Auf *Ch. quinoa* wurde beobachtet, dass sich ca. 6 Tage nach Inokulation (dpi) frische grüne Lokalläsionen im inokulierten Blatt bildeten (Abb. 4/1-3), was für eine Folgevermehrung des Virus im inokulierten Gewebe spricht.

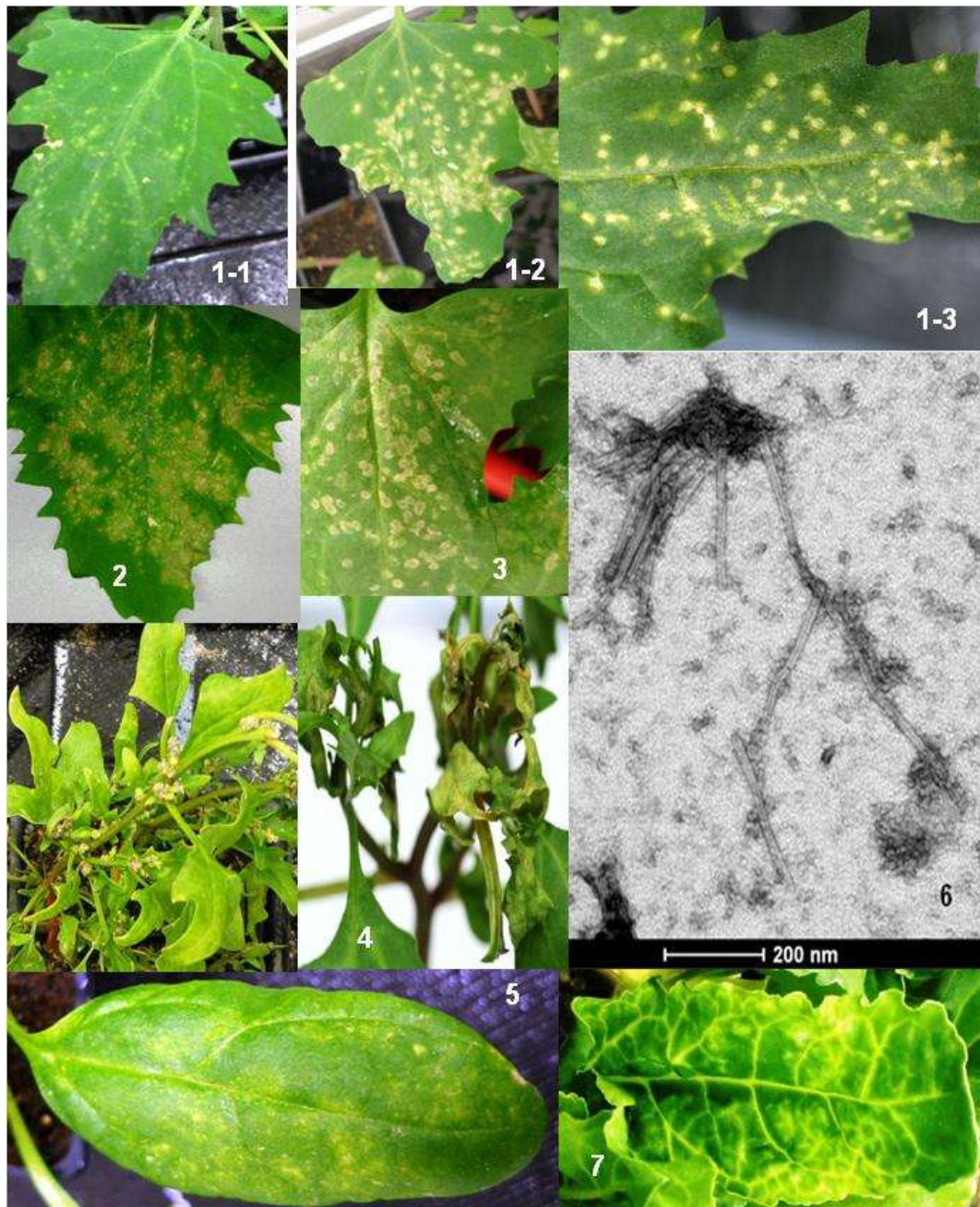


Abbildung 4: Isolation des BSBMV aus Zuckerrübenwurzeln nach Kultivierung in Colorado-Erde
 1-1: *Ch. quinoa* 4dpi, 1-2-3: *Ch. quinoa* 6dpi, 2: *Ch. amaranticolor* 6 dpi, 3: *Ch. foliosum* 6 dpi,
 4: systemische Ausbreitung in *Ch. rubrum* 12 dpi, 5: *Sp. oleracea* 'Matador' 12 dpi,
 6: Viruspartikel nach Isolation aus *B. vulgaris* in *Ch. quinoa*, 7: *Beta vulgaris*-Symptome 12 wpi.

Im Vergleich zum BNYVV bildete das BSBMV auf *Ch. quinoa*, *Ch. amaranticolor* und *Ch. foliosum* bereits 3 Tage nach Inokulation kleine Lokalläsionen (Abb. 4/1-1), die nach 6 Tagen zu größeren aschfarbenen Läsionen nekrotisierten (Abb. 4/1-2) und sich deutlich von den hellgrünen bis gelben Lokalläsionen des BNYVV unterscheiden. Auf *Ch. amaranticolor* sind



die Lokalläsionen sehr klein (Abb. 4/2) und auf *Ch. foliosum* (Abb. 4/3) ringförmig nekrotisiert. In *Ch. rubrum*, Spinat und Zuckerrübe breitete sich das Virus nach ca. 12 dpi systemisch in nachwachsende Blätter aus (Abb. 4/4-5-7). Die befallenen Zweige starben sehr schnell ab. Die Befunde wurden mittels RT-PCR und Elektronenmikroskopie bestätigt. Die Konzentration der Viruspartikel war in Spinat höher als in *Ch. quinoa*.

- Partikel-Klassifikation

In *Ch. quinoa* fanden wir kürzere Partikel in einem Längenbereich von 154nm bis 290nm und in *Spinacia oleracea* längere Partikel im Längenbereich von 274nm bis 670nm (Elke Zimmermann, Präparation 418, Tab. 6).

Im JKI-EP, in der Abteilung Elektronenmikroskopie in Braunschweig, wurden unter Leitung von Frau Dr. Richert-Pöggeler in 2015 gezielte Vermessungen der Partikellängen für Benyviren durchgeführt. Es wurden 330 Partikel der RNA's 1 und 2 des BSBMV von *Ch. quinoa* in die Vermessungen einbezogen (Abb. 5). Im Ergebnis der Vermessungen von BSBMV-Partikel konnten acht Häufigkeitsklassen erfasst werden. Drei der häufigsten Klassen beinhalten Partikel im Größenbereich von 100 nm bis 400nm.

Tabelle 6: Sporadischer Vergleich von Partikellängen des BSBMV in *Ch. quinoa* und in *S. oleracea*

<i>Ch. quinoa</i>	Partikelgröße (nm)	
	290	
	280	
	277	
	260	
	255	
	165	
	154	
<i>Spinacia oleracea</i>		
	670	463
	628	403
	587	393
	573	388
	563	316
	550	281
	507	274
	466	

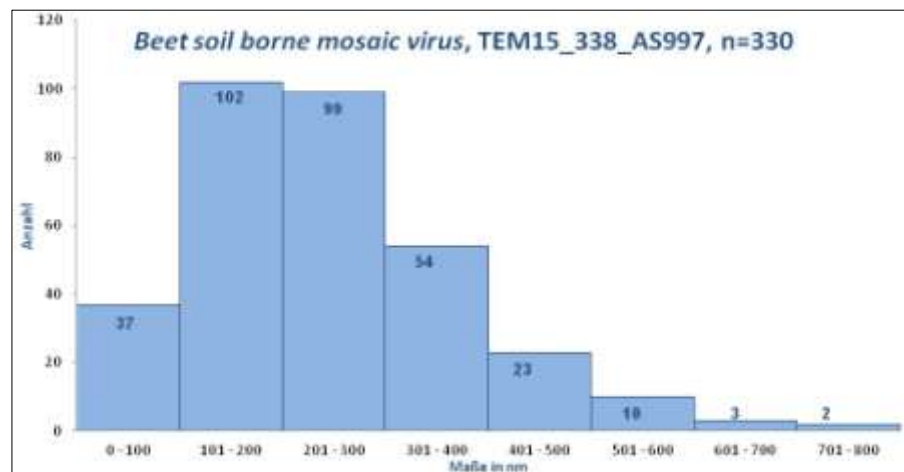


Abbildung 5: Ergebnisse der Erfassung von Häufigkeitsklassen nach Partikellängen des BSBMV

- Anreicherung und serologischer Nachweis des BSBMV-Col

Mit dem Ziel der Herstellung eines homologen polyklonalen Antiserums für das BSBMV sollte das Virus gereinigt werden. Wie Abbildung 4 zeigt, reagierten verschiedene Indikatorpflanzen mit heftigen Symptomen auf die BSBMV-Infektion. In Vorversuchen für die Virus-Reinigung wurde untersucht, von welcher Indikatorpflanze und nach welcher Inkubationszeit die Virusausbeute optimal ist (Tab. 7). Es wurde die Methode der Potyvirus-Reinigung unter Einsatz von K-Citrat oder Na-Borathpuffer angewendet. Von *Ch. quinoa*, wo die Virusvermehrung lokal auf die inokulierten Blätter beschränkt bleibt, wurde das Virus aus Symptom tragendem Blattmaterial 7 und 10 Tage nach Inokulation gereinigt. Von den Indikatorpflanzen mit systemischer Virusausbreitung wurde in Abhängigkeit von der Pflanze das Virus aus Blattmaterial 3, 4 und 12 Wochen nach Inokulation gewonnen.

Tabelle 7: Versuche zur Reinigung des BSBMV aus verschiedenen Indikatorpflanzen (dpi/wpi- Tage/Wochen nach Inokulation, ng- nicht getestet)

Methode	Indikatorpflanze	Inkubation	Blatt-	Ausbeute		
Potyvirusreinigung	Art	Zeit	Menge (g) Symptome	Menge	Partikel	RT-PCR
0,1 m K-Citratpuffer, pH=7,0	<i>Chenopodium quinoa</i>	7 dpi	25 aschfarbene LL	0,04 mg	-	ng
0,1 m K-Citratpuffer, pH=7,0	<i>Chenopodium quinoa</i>	10 dpi	30 hellgrüne, verlaufende LL	dünne Bande	-	ng
0,1 m K-Citratpuffer, pH=7,0	<i>Chenopodium quinoa</i>	10 dpi	110 hellgrüne, verlaufende LL	-	-	ng
0,1 m K-Citratpuffer, pH=7,0	<i>Beta vulgaris</i>	12 wpi	90 vergilbte Adern	dünne Bande	-	ng
0,5 m Na-Borathpuffer, pH=9,0	<i>Chenopodium quinoa</i>	7 dpi	25 aschfarbene LL	dünne Bande	einzelne	+
0,5 m Na-Borathpuffer, pH=9,0	<i>Chenopodium rubrum</i>	17 dpi	30 gelbe Flecken	diffuse Bande	-	ng
0,5 m Na-Borathpuffer, pH=9,0	<i>Chenopodium foliosum</i>	17 dpi	20 gelbe Flecken	diffuse Bande	+	+
0,5 m Na-Borathpuffer, pH=9,0	<i>Spinacia oleracea</i>	12 wpi	20 Mosaik	diffuse Bande	einzelne	+
0,5 m Na-Borathpuffer, pH=9,0	<i>Nicotiana benthamiana</i>	4 wpi	20 Mosaik	-	-	ng

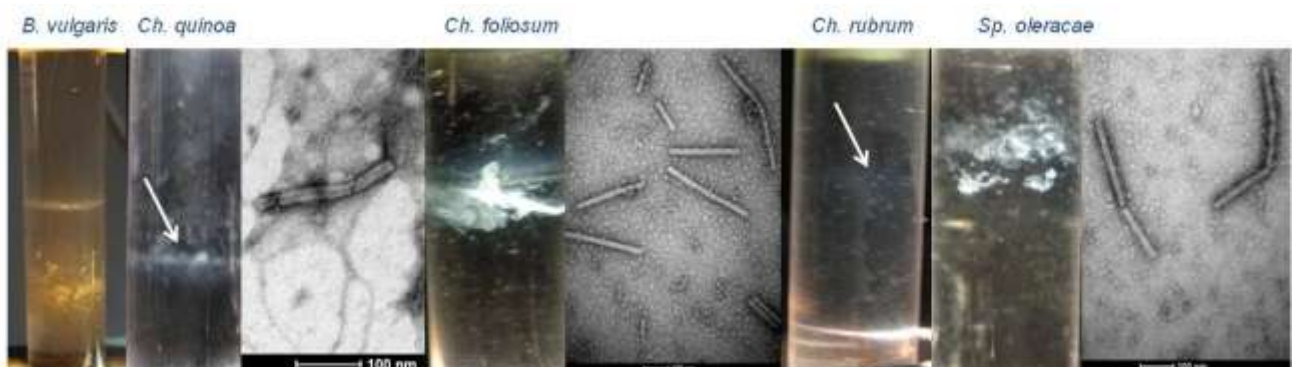


Abbildung 6: Ergebnisse der BSBMV-Reinigungsversuche von verschiedenen Indikatorpflanzen

Die Reinigung nach der Methode für Potyviren zeigte kein zufriedenstellendes Ergebnis. Trotz der guten Symptomausprägung nach mechanischer Inokulation konnten nur wenige Viruspartikel in *Ch. quinoa* und Spinat nachgewiesen werden (Abb. 6), wobei die Konzentration in Spinat höher war. In den aus *Ch. quinoa*, *Ch. foliosum* und Spinat angereicherten Banden konnte Viruspartikel nachgewiesen (AS997 hergestellt und abgegeben von Duffus, Isolat Californien) und mittels RT-PCR ein Virus spezifisches Fragment amplifiziert werden.

Für die Herstellung eines Antiserums war die Virusausbeute viel zu gering.

Das BSBMV zeigt deutliche Kreuzreaktionen mit dem homologen BNYVV-Antiserum 270. Aus diesem Grund konnte die Viruskontrolle in BNYVV- und BSBMV-Einzelfektionen serologisch mit diesem Antiserum durchgeführt werden. Der serologische Nachweis beider Benyviren in Mischinfektionen erfolgte durch spezifische Detektion des BNYVV mit dem monoklonalen Antikörper (AS0709/1) im TAS-ELISA und des BSBMV mit dem polyklonalen BNYVV-Antiserum (270) im DAS-ELISA (Tab. 8).

Tabelle 8: Spezifischer serologischer Differenzierung der Benyviren in Infektionsgemischen

Spezifischer Nachweis des BNYVV mittels TAS-ELISA		BSBMV mittels DAS-ELISA
1. Coating	IgG 270 in Coatingpuffer 1:100 inkubieren bei 37°C für 4 Stunden waschen	IgG 270 in Coatingpuffer 1:100 inkubieren bei 37°C für 4 Stunden waschen
2. Blockierung	2% TMin PBS-Tween inkubieren für 30 Minuten bei 37°C abkippen und trocken schütteln	
3. Antigen	Proben auftragen inkubieren üN bei 4°C im KS waschen	Proben auftragen inkubieren üN bei 4°C im KS waschen
4. Mab	Mab AS0709/1 verdünnt 1:2000 in Konjugatpuffer inkubieren bei 37°C für 4 Stunden waschen	
5. Konjugat	ZAMAK 1:2000 verdünnt in Konjugatpuffer inkubieren bei 37°C für 2 Stunden waschen	Konj 270 verdünnt in Konjugatpuffer inkubieren bei 37°C für 4 Stunden waschen
6. Substrat	10 mg/10ml 1 Stunde bei RT inkubieren	10 mg/10ml 1 Stunde bei RT inkubieren

III. Beet oak leaf virus (BOLV)

Liu et al. (2003) berichteten über den Nachweis und die Charakterisierung des BOLV, welches 2000 in mit Rizomania kontaminierten Feldern in Kalifornien erstmals erkannt wurde. Dieses Benyvirus ähnliche Pathogen an Zuckerrübe ist in den USA weit verbreitet und hat stäbchenförmige Partikel mit Längen von 80nm – 640nm, die durch drei modalen Längen (180-200nm, 260-280nm, 300-360nm) charakterisiert sind. Das BOLV unterscheidet sich serologisch und in der Symptomausprägung von den anderen Beny- und Pomoviren. Auf *Ch. amaranticolor*, *Ch. murale* und *Ch. quinoa* bildet es nach mechanischer Inokulation Lokalläsionen, die von einem nekrotischen Ring umgeben sind. In *Beta macrocarpa*, *B. vulgaris* und *Spinacia oleracea* breitet es sich systemisch in der Pflanze aus und erzeugt Eichenblatt ähnliche Blattflecken (Abb. 7).



Abbildung 7: BOLV-Symptome an Zuckerrübe (li) und -Viruspartikel (re) (Liu et al., 2003).

Das Molekulargewicht des Hüllproteins beträgt 46 kDa, während das des BNYVV bei 22 kDa und des BSBMV bei 24 kDa liegt (Wisler et al., 1994). Die Molekulargewichte der Pomovirus-Hüllproteine betragen 25 kDa beim BSBV und 26 kDa beim BVQ.

Nach Reinigung des Virus von Spinat wurden polyklonale Antiseren hergestellt, die im DAS-ELISA, Western Blot und für die Immunogoldmarkierung in elektronenmikroskopischen Untersuchungen eingesetzt wurden. Das Genom des BOLV umfasst vier RNA's mit den Größen 6,4kb; 6,0kb; 5,2kb und 4,6kb (Liu und Anju, 2011).

- Nachweis, Isolation und Charakterisierung eines BOLV-ähnlichen Isolates in Deutschland

Im Rahmen unserer Arbeiten zur Isolation bodenbürtiger Zuckerrübenviren aus Böden verschiedener Anbauregionen beobachteten wir 2010 Eichenblatt ähnliche Symptome auf Zuckerrübenblättern (Abb. 8). Die *Beta vulgaris*-Pflanzen wurden in einer Erdprobe vom Standort Ramrath (51°04'39.03"N; 6°63'98.93"O) in Nordrhein-Westfalen unter klimatisierten Gewächshausbedingungen (17°C-20°C) kultiviert (Isolat Ramrath RR-2). Diese Erdprobe war von besonderem Interesse, weil sie mit einer aggressiven BVQ-Population kontaminiert war.



Abbildung 8: Blattflecken an Zuckerrübenblättern aus Erde des Standortes Ramrath (Nordrhein-Westfalen), die von Eichenblatt ähnlichen nekrotischen Konturen umgeben sind (Foto: Ute Kastir).

Bei späteren Isolationsversuchen zur Gewinnung des BVQ-Isolates im Jahr 2014 wiederholte sich dieser Befund. Anfällige Zuckerrübensämlinge (Linie 6005512) wurden in Erde vom Standort Ramrath eingesät, unter klimatisierten Gewächshausbedingungen inkubiert, die Zuckerrübenwurzeln der Fangpflanzen mazeriert und zwecks Virus-Isolation mittels mechanischer Inokulation auf *Chenopodium quinoa*-Blätter übertragen. Das Mazerat wurde mittels RT-PCR auf Kontamination mit anderen Beny- und den Pomoviren untersucht. Wie Abbildung 9 zeigt, konnten die bekannten Beny- und Pomoviren nicht nachgewiesen werden.



Abbildung 9: Überprüfung von Zuckerrüben-Mazeraten aus Ramrath-Erde auf Kontamination mit Beny- und Pomoviren mittels RT-PCR (1-5: Mazerate von Ramrath, 6-10: Mazerate von Vanikum, M: Marker)

Neun Tage nach Inokulation zeigten sich auf den Blättern der Indikatorpflanzen, die mit Wurzelmazeraten der Pflanzen aus Erde vom Standort Ramrath abgerieben wurden, kleine Flecken, die von kreisförmig nekrotisiertem Gewebe umgeben waren und teilweise Blattflecken zeigten, deren nekrotische Umrandung an die Form von Eichenblättern erinnerten (Abb. 10).

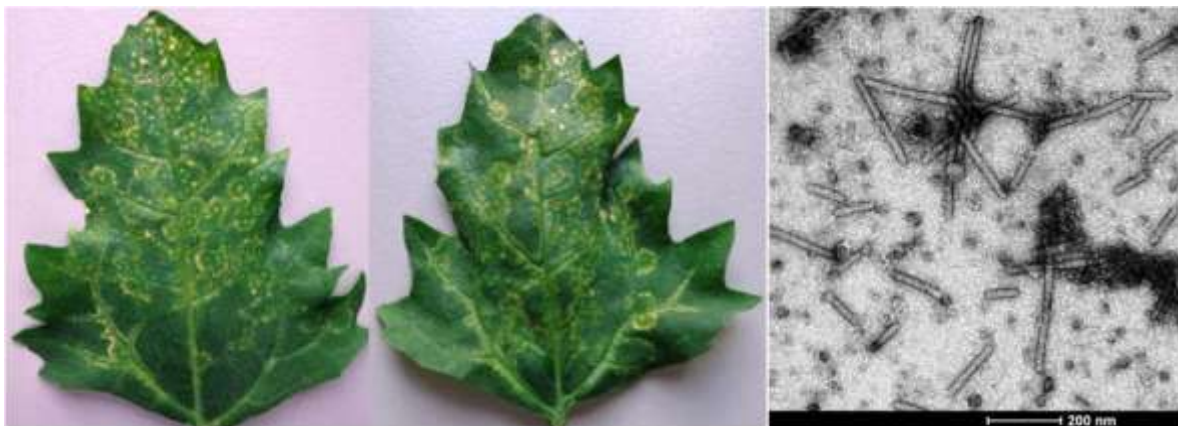


Abbildung 10: Mit Isolat RR-2a inokulierte *Ch. quinoa*-Blätter zeigen nach 9 dpi von nekrotischen Ringen und Eichenblatt ähnlichen Strukturen umgebenen Blattflecken (links), Rechts: Viruspartikel in den infizierten *Ch. quinoa*-Blättern.

Zwei Wochen nach der Inokulation reagierten auch die nicht inokulierten nachwachsenden *Ch. quinoa*-Blättern mit unterschiedlichen Blattflecken (Abb. 11). Typisch für die systemische Ausbreitung des BVQ in *Ch. quinoa* sind gelbe Blattflecken (2.1.Pomoviren II), die mit kleinen Nekrosen durchsetzt sind (Abb. 11A). In der Abbildung 11B/C sind auch eichenblattartig nekrotisch umrandete Flecken erkennbar. Offensichtlich handelt es sich bei dem Virusisolat RR-2a um eine Mischinfektion aus BVQ und dem BOLV-ähnlichen Virus.

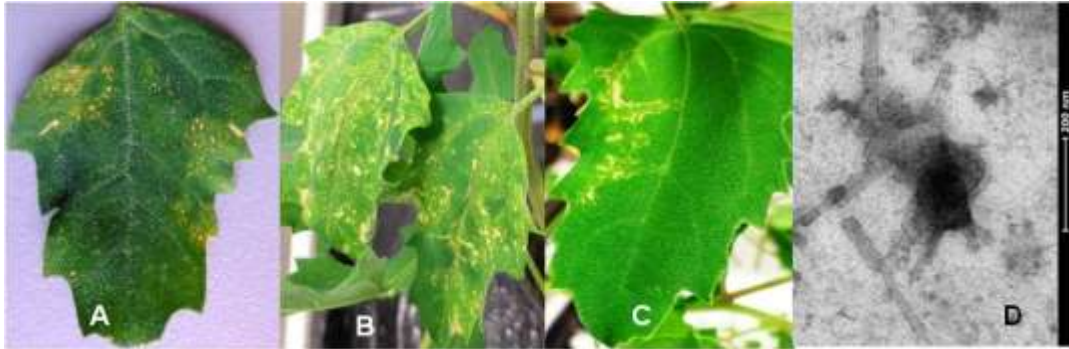


Abbildung 11: RR-2a in nachwachsenden *Ch. quinoa*-Blättern (20 dpi) mit kleine Nekrosen einschließende Blattflecken (A) und Eichenblatt ähnlichen, nekrotisch umrandeten Flecken (B, C) mit stäbchenförmigen Partikel in (D) nach mechanischer Übertragung des RR-2a-Isolates von Zuckerrübenwurzeln aus Fangpflanzen aus Erde vom Standort Ramrath.

Weiterhin konnte das Virusisolat RR-2a auch auf Spinat (Abb. 12), *Beta macrocarpa* (Abb. 13) *Ch. foliosum* und *Ch. murale* übertragen werden. In Spinat zeigten sich nach 2-3 wpi helle und dunkelgrüne Chlorosen mit systemischer Virusausbreitung.



Abbildung 12: RR-2a: systemisch infizierte Spinatblätter (14 dpi) mit chlorotischen Flecken nach mechanischer Übertragung des RR-2a-Isolates von infizierten *Ch. quinoa*-Blättern.

In *B. macrocarpa* wurden Vergilbungen entlang der Blattadern, die teilweise von kleinen braunen Nekrosen umgeben waren (Abb. 13A/B) und eine Virusausbreitung in die nachwachsenden Blätter (Abb. 13C) beobachtet.

Auch auf den inokulierten Blättern von *Ch. murale* und *Ch. foliosum* wurden runde, nekrotisch umrandete Flecken und in *Ch. foliosum* auch Vergilbungen entlang der Blattadern beobachtet (Abb. 14).

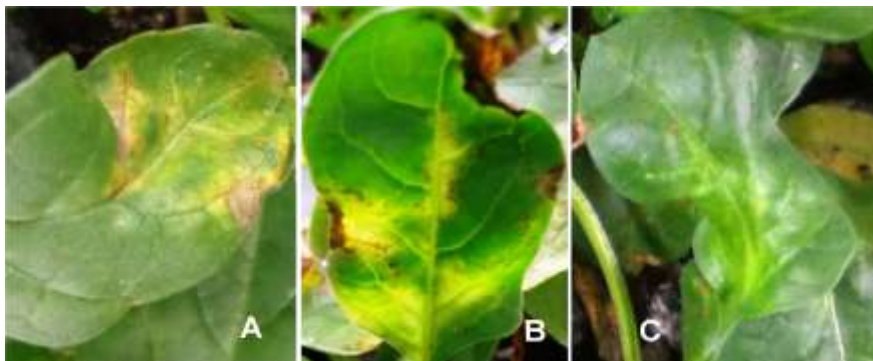


Abbildung 13: RR-2a: *B. macrocarpa*-Blätter (25-32 dpi) mit chlorotischen Flecken nach mechanischer Übertragung des RR-2a-Isolates von infizierten *Ch. quinoa*-Blättern, A-inokuliertes Blatt, B- von kleinen Nekrosen umgebene Flecken, C- Ausbreitung in das nachwachsende Blatt.



Abbildung 14: RR-2a: Inokulierte Blätter *Ch. foliosum* (li) und *Ch. murale* (re) mit chlorotischen, ringförmig umrandeten Flecken 8 dpi nach mechanischer Übertragung des RR-2a-Isolates von infizierten *Ch. quinoa*-Blättern.

In Kooperation mit Dr. Wulf Menzel von der DSMZ in Braunschweig und der Elektronenmikroskopikerin Dr. Katja Richert-Pöggeler vom JKI-EP konnten wir bestätigen, dass das bodenbürtige Zuckerrübenvirus-Isolat RR-2a serologisch dem von Liu et al. (2003) beschriebene BOLV sehr ähnlich ist.

Dr. Menzel erhielt aus den USA von Dr. Liu ein Roh-Serum, welches mit gereinigtem BOLV nach Immunisierung von Kaninchen erstellt wurde, und eine Positivkontrolle aus infizierter Zuckerrübe. Nach Inokulation von Rübe mit dieser Positivkontrolle wurden in der DSMZ die typischen BOLV-Symptome reproduziert (Abb. 15).

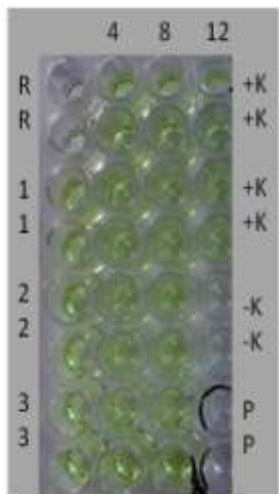
Aus dem Rohserum von Dr. Liu wurde in der DSMZ ein ELISA-fähiges IgG und IgG-AP (W11-086) hergestellt, mit dem wir die serologische Verwandtschaft unsers Isolates RR-2a mit dem BOLV identifizieren konnten (Tab. 9).



Abbildung 15: BOLV-Symptome an Rübe nach mechanischer Inokulation und Inkubation unter Klimakammerbedingungen bei kühlen Temperaturen. (Foto: Dr. Wulf Menzel)

Mittels DAS-ELISA untersuchten wir den Virusbefall in nach mechanischer Inokulation Symptom tragenden *Chenopodium quinoa*- (3 wpi), Spinat- (4 wpi) und *Beta macrocarpa*-Pflanzen (6 wpi) und kontrollierten parallel dazu Virusinfektionen durch die Benyviren BNYVV und BSBMV und die Pomoviren BSBV und BVQ mittels RT-PCR (Tab. 9).

Tabelle 9: Reaktion des bodenbürtigen Zuckerrübenvirus-Isolates RR-2a mit dem BOLV-Antiserum im DAS-ELISA
(R-Referenz, Proben 1-13, +K-Positivkontrolle, -K-Gesundkontrolle, P- Puffer)



Proben	Inokulation	Virus	Wirt			RT-PCR				DAS-ELISA
			von	auf	Blattstufe	BSBV	BVQ	BNYVV	BSBMV	BOLV
1	12.12.14	RR2a(5)	Sp	Spinat 'Matador'	inokBl	-	+	-	-	0,60
2	12.12.14	RR2a(5)	Sp	Spinat 'Matador'	nawBl	-	-	-	-	0,60
3	18.12.14	RR2a(2)	ZR	<i>Ch. quinoa</i>	nawBl	-	+	-	-	0,70
4	18.12.14	RR2a(2)	ZR	<i>Ch. quinoa</i>	nawBl	-	+	-	-	0,70
5	18.12.14	RR2a(2)	ZR	<i>Ch. quinoa</i>	nawBl	-	+	-	-	0,70
6	18.12.14	RR2a(2)	ZR	<i>Ch. quinoa</i>	inokBl	-	-	-	-	0,80
7	18.12.14	RR2a(2)	ZR	<i>Ch. quinoa</i>	inokBl	-	-	-	-	0,80
8	18.12.14	RR2a(2)	ZR	<i>Ch. quinoa</i>	inokBl	-	-	-	-	0,80
9	18.12.14	RR2a(2)	ZR	<i>Ch. quinoa</i>	inokBl	-	-	-	-	0,80
10	18.12.14	RR2a(2)	ZR	<i>Beta macrocarpa</i>	inokBl	-	-	-	-	0,70
11	18.12.14	RR2a(2)	ZR	<i>Beta vulgaris</i>	nawBl	-	-	-	-	0,70
12	positive Kontrolle	RR2a	<i>Ch. quinoa</i>			nicht getestet				0,60
13	positive Kontrolle	DSMZ				nicht getestet				0,70
14	Gesundkontrolle		<i>Ch. quinoa</i>							0,08

Wie die Ergebnisse zum serologischen Virusnachweis zeigten, reagierten alle ausgewählten Verdachtsproben mit dem BOLV-Antiserum. Offensichtlich war das BOLV-RR-2a Ursache für die Symptomausprägung in diesen Pflanzen. In den inokulierten Blättern von Spinat und den nachwachsenden Blättern von *Ch. quinoa* wurde auch das BVQ mittels PCR nachgewiesen. Die Isolation dieses Pomovirus von dem mit dem BVQ kontaminierten Standort war zu erwarten. Es ist uns bekannt, dass das BVQ sich systemisch in *Ch. quinoa* ausbreitet (Abschnitt 2.1. Pomoviren II.). Der serologische Nachweis des BOLV in den nachwachsenden Blättern spricht auch für eine systemische Ausbreitung dieses Virus in *Ch. quinoa*.

Die Isolation des RR-2a-Virusisolates von *Beta vulgaris* aus der Bodenprobe von Ramrath und die Übertragung auf *B. macrocarpa*, *Sp. oleraceae* und *Ch. quinoa* wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie im Labor von Dr. Richert-Pöggeler auf Vorkommen von möglichen anderen Viren überprüft (Tab. 10).

Tabelle 10: Nachweis von Partikeln des BOLV ähnlichen Virus RR-2a nach Isolation aus Zuckerrübe und Übertragung auf *Beta macrocarpa*, Spinat und *Ch. quinoa* im Transmissionselektronenmikroskop

Isolat	Isolation		BOLV-Nachweis AS 1814/21 im Blatt		BNYVV	BVQ	BSBV
	von	auf	Inokulierten	nachwachsenden	AS 9/1	AS 11/1	AS 949/1
RR-2a	<i>B. vulgaris</i>	<i>B. macrocarpa</i>	+				
		<i>Ch. quinoa</i>	++	++			
		<i>Sp. oleracea</i>	++	++	-	-	-

Die sehr gut infizierten Blätter der Spinatpflanzen der Sorte 'Matador' wurden für eine Reinigung des Virusisolates RR-2a eingesetzt. 70 g Blattmaterial wurden nach der Vorschrift von Liu et al. (2003) in 200 ml 0,1m Tris-Puffer (pH=9,0) aufgeschlossen, weiter in 2% Triton-X extrahiert und nach Vorschrift gereinigt. Das angereicherte Präparat (Abb. 16) wurde auf mögliche Kontamination mit anderen Zuckerrübenviren elektronenmikroskopisch überprüft (Tab. 11).

Tabelle 11: Nachweis von Viruspartikeln im RR-2a-Präparat nach Anreicherung aus Spinat im Transmissionselektronenmikroskop (AS-Antiserum)

Virusgruppe	Virus	Abkzg.	Antiserum	TEM-Nachweis	
				Partikel	Dekoration
Alphacrypto	<i>Beet cryptic</i>	BCV	605	-	-
Beny	<i>Beet necrotic yellow vein</i>	BNYVV	9	-	-
Beny ähnlich	<i>Beet oak leaf</i>	BOLV	1814/21	++	++
Bromo	<i>Cucumber mosaic</i>	CMV	1296, 1623	-	-
Clostero	<i>Beet pseudo yellows</i>	BPYV	107	-	-
Clostero	<i>Beet yellows</i>	BYV	116	-	-
Curto	<i>Beet curly top</i>	BCTV	741	-	-
Necro	<i>Beet black scorch</i>	BBSV	1391	-	-
Necro	<i>Tobacco necrosis</i>	TNV	587, 571	-	-
Nepo	<i>Beet ringspot</i>	BRSV	468	-	-
Polero	<i>Beet mild yellowing</i>	BMYV	842	-	-
Polero	<i>Beet western yellows</i>	BWYV	553	-	-
Pomo	<i>Beet Q</i>	BVQ	11	-	-
Pomo	<i>Beet soil-borne</i>	BSBV	949	-	-
Poty	<i>Beet mosaic</i>	BMV	245	-	-
Poty	<i>Turnip mosaic</i>	TuMV	277, 1014	-	-
Tobamo	<i>Tobacco mosaic</i>	TMV	958, 1357	-	-
Tobra	<i>Tobacco rattle</i>	TRV	TRV-Mix	-	-

Die Untersuchungen zeigten, dass das angereicherte Präparat des RR-2a-Isolates frei war von Kontaminationen mit anderen Zuckerrübenviren.

Leider wurde keine ausreichende Konzentration von Viruspartikeln erreicht, die eine Immunisierung von Kaninchen für eine Antiserumproduktion abgesichert hätte.

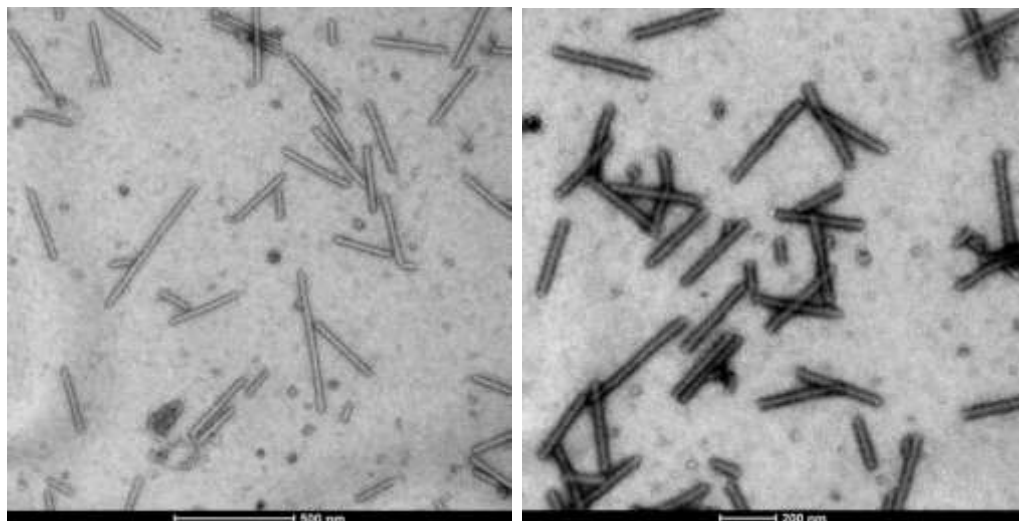


Abbildung 16: Viruspartikel des BOLV-ähnlichen RR-2a-Isolates von Spinat (li- undekoriert, re- dekoriert mit AS 1814/21)

Weiterhin wurde das angereicherte RR-2a-Isolat mittels Western Blot (Abb. 16) hinsichtlich der Größe seines Hüllproteins charakterisiert (Dr. Angelika Ziegler, unveröffentlicht).

Wie die Abbildung 17 zeigt, war die Viruskonzentration in der Positivkontrolle von der DSMZ und in den mechanisch inokulierten *Ch. quinoa*-Blättern zu gering und gab somit keine Signale im Western Blot. Das angereicherte Präparat aus Spinat bildete ein deutliches Bandenmuster. Das Hüllprotein-Fragment befindet sich auf der Höhe von ca. 46 kDa. Auch dieser Befund spricht dafür, dass das RR-2a-Isolat dem BOLV sehr ähnlich ist.

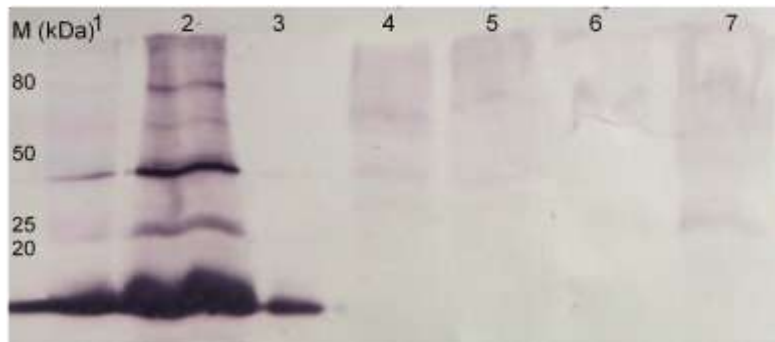


Abb. 17: Nachweis des RR-2a- Hüllproteins im Western Blot (Dr. Angelika Ziegler, 2015)
(IgG DSMZ 1:1000, Ziege anti Kaninchen AP, Färbung BCIT/NBT)
1- Marker, 2- partiell gereinigtes Virus aus Spinat, 3- leer, 4- *Beta macrocarpa* gesund,
5- *B. vulgaris* gesund, 6- BOLV Positivkontrolle (DSMZ, W11-086), 7- *Ch. quinoa* mechanisch
Inokuliert.

Zusammenfassend deuten folgende Charakteristika des RR-2a-Isolates auf eine Ähnlichkeit mit dem von Liu et al. (2003) beschriebenen BOLV hin:

- Eichenblattsymptome auf *Beta vulgaris*, *B. macrocarpa*, *Ch. quinoa* und *Ch. foliosum*
- Chlorotische Flecke mit nekrotischem Ring auf *Ch. quinoa*
- Serologische Reaktion mit dem polyklonalen Antiserum (W11-086) von Dr. Liu
- Ausschluss anderer bekannter bodenbürtiger Zuckerrüben-viren mittels RT-PCR
- Partikelnachweis mit Dekoration (AS1814/21) in Spinat, *B. macrocarpa* und *Ch. quinoa*
- Nachweis einer Hüllproteinbande bei 46 kDa im Western Blot.

Für den nachhaltigen Beweis des Vorkommens des BOLV in Deutschland und Europa müssten weitere Untersuchungen zur Isolation und Differenzierung dieses Virus durchgeführt werden. Wichtig ist es, eine effektive Virusreinigung für die Herstellung eines Antiserums zu gewährleisten. Auch die molekularbiologische Charakterisierung und Sequenzierung des Virusgenoms sind Voraussetzung für die spezifische Differenzierung von anderen bodenbürtigen Zuckerrüben-viren mittels RT-PCR und damit für die Durchführung eines sicheren Monitorings zum Vorkommen dieses Virus in Europa.


Pomoviren

Für den serologischen Nachweis der Pomoviren übernahmen wir von Prof. Renate Koenig das PAS 981 und den Mab Ahlum 3 (6G2-F6-B12) für den Nachweis des BSBV (Ahlum-Stamm) und das PAS 810 und den Mab Wierthe 2G2 für den Nachweis des BVQ (Wirthe-Stamm). Bei Kombination der polyklonalen IgG-s mit den Mab-s wurde im DAS-ELISA der Virusnachweis und eine Differenzierung zwischen beiden Viren möglich. Kreuzreaktionen zwischen den homologen Antiseren beider Viren konnten jedoch nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde für differenzierende Diagnosen die RT-PCR mit spezifischen Primern eingesetzt.

I. Beet soil-borne virus (BSBV)

Das BSBV konnten wir in vielen Zuckerrüben-Anbaugebieten nachweisen. Isolate des Virus wurden von 12 Standorten gewonnen (Tab. 12), vermehrt und als reine Isolate konserviert. Auf Zuckerrübe und Spinat kann das BSBV anhand seiner Symptome (Vergilbungen) nicht von den Benyviren differenziert werden (Abb. 18/5-6). Auf den *Chenopodium*-Arten unterscheiden sich die ca. drei Tage eher als bei Benyviren auftretende Symptome deutlich (Abb. 18).

Auf *Ch. quinoa* entstehen ca. ab dem dritten Tag nach Inokulation gelbe in sich verlaufende Blattflecke, die von kleinen punktförmigen Nekrosen durchsetzt werden. Ungefähr nach 11 dpi erkennt man Vergilbungen entlang der Adern und eine dunkelbraune Nekrotisierung der Flecken (Abb. 18/1-2). Auf *B. macrocarpa* entstehen ca. 5dpi hellgrüne eingefallene Blattflecken, die bis zu 11dpi nekrotisieren (Abb. 18/3).

Land	BSBV-Standort
	
Deutschland	
Sachsen-Anhalt	Berßel
Nordrhein-Westfalen	Wachtendonk
Bayern	Auburger Judenmann Tabertshausen Thurnhof Vierhöfen
Colorado	?
Frankreich	Pithiviers
Italien	Boggian Roviga
Niederlande	Lelystad

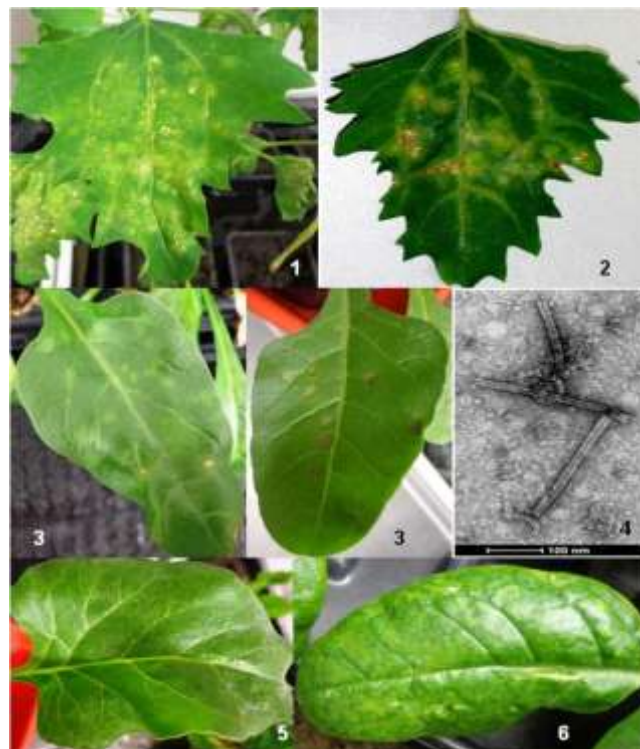


Tabelle 12: BSBV-Isolate aus verschiedenen geografischen Regionen

Abbildung 18: Isolation des BSBV aus Zuckerrübenwurzeln nach Kultivierung in Erde vom Standort Vierhöfen:

1: *Ch. quinoa* 7dpi, 2: *Ch. quinoa* 11dpi, 3: *li-B. macrocarpa* 5dpi, re-11dpi, 4: BSBV-Partikel- Stäbchen mit Zentralkanal, 5: Vergilbungen auf *B. vulgaris* 12dpi, 6: Vergilbungen auf *Sp. oleracea* 'Matador' 18 dpi.

Bei der Isolation des BSBV aus unterschiedlichen Befallsflächen beobachteten wir häufig die Entstehung von Pergament-artigen Blattflecken auf *Ch. quinoa* (Abb. 19). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachteten wir neben den Stäbchenförmigen Viruspartikeln des BSBV von verschiedenen Standorten (Tab. 13) auch kleine isometrische Partikel mit einem Durchmesser von 16nm bis 18nm, die sich in ihrer Größe von den isometrischen Partikeln des TNV und BBSV mit einer Größe von 28 nm differenzierten.

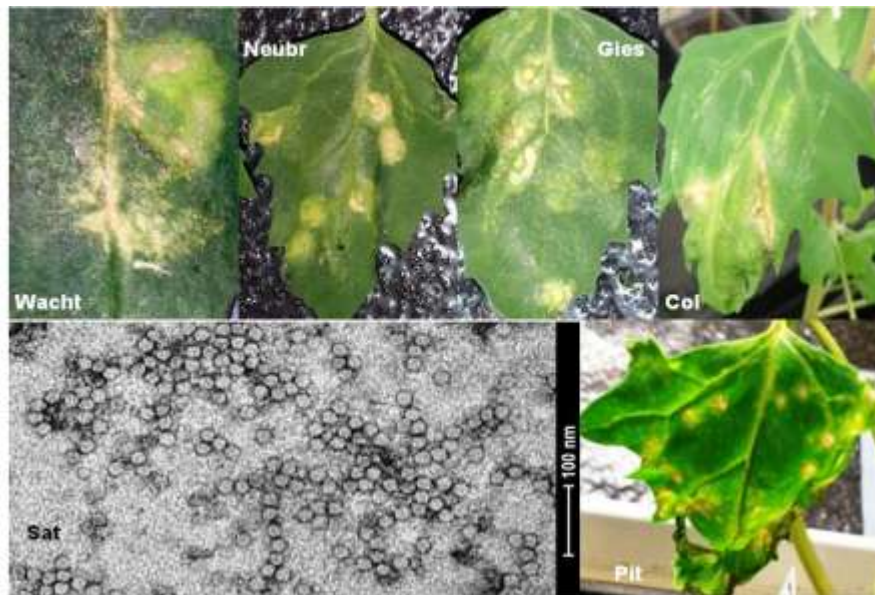


Abbildung 19: Nachweis von unbekannten Satelliten-Partikeln nach Isolation des BSBV aus Zuckerrüben-Wurzelmazeraten bei Übertragung auf *Ch. quinoa*

Tabelle 13: Vorkommen des BSBV gemeinsam mit nicht definierten Satelliten


Land	Bundesland	Befallsfläche
Deutschland	Niedersachsen	Wirthe
	Sachsen-Anhalt	Gieseritz
		Berßel
	Sachsen	Jessen
	Nordrhein-Westfalen	Neubrück
		Wachtendonk
Frankreich		Pithiviers
Colorado		

Ob diese Satelliten in Verbindung mit dem Pomovirus stehen oder an nicht nachgewiesenen Necoviren gebunden sind, konnte im Untersuchungszeitraum nicht aufgeklärt werden.

II. Beet virus Q (BVQ)

Das BVQ isolierten wir von sechs verschiedenen Standorten (Tab. 14). Diese Isolate wurden mit einem Referenzisolat des BVQ von der DSMZ in Braunschweig verglichen.

Auf den inokulierten Blättern von *Ch. quinoa* bildet das BVQ runde Blattflecken, die von ringförmig angeordneten, kleinen punktförmigen Nekrosen durchsetzt sind. Im Vergleich zu den anderen Benyviren und dem BSBV breitet sich das BVQ in *Ch. quinoa* systemisch aus. Etwa 11dpi erscheinen auf den nachwachsenden jungen Blättern (Abb. 20/2-3) gelbe Blattflecken unterschiedlicher Struktur, die ca. 15dpi nekrotisieren. Das BVQ wurde in diesen Blättern mittels RT-PCR nachgewiesen. Mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurden BVQ-Partikel aus nachwachsenden Blättern mittels PAS 810 mit Goldpartikel markiert (Abb. 20/ 4). Auf *Ch. murale* zeigten sich 7dpi runde hellbraun nekrotisierte Blattflecken (Abb. 20/ 5). Dieses infizierte Gewebe wurde mazariert und auf *Ch. quinoa*, *Ch. rubrum* und Spinat mechanisch übertragen. Wie Abb. 20/ 6-8 zeigt und durch RT-PCR bestätigt wurde, konnte das BVQ von *Ch. murale* identifiziert und auf diese Wirte übertragen werden.

Land	BVQ-Standort
	
Deutschland	
Niedersachsen	DSMZ
Sachsen-Anhalt	Berßel
Nordrhein-Westfalen	Ramrath
Bayern	Judenmann Vierhöfen
Colorado	?
Frankreich	Pithiviers

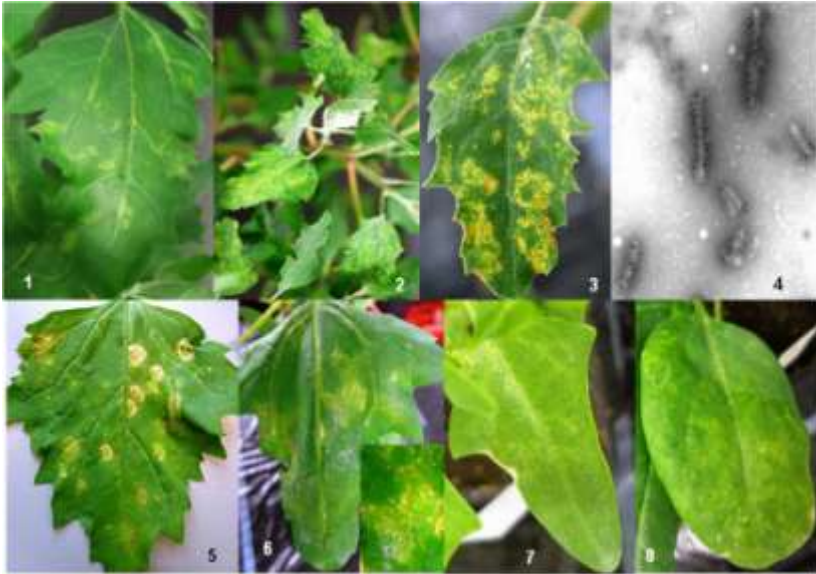


Tabelle 14: BVQ-Isolate aus verschiedenen geografischen Regionen

Abbildung 20: Isolation des BVQ aus Zuckerrübenwurzeln nach Kultivierung in Erde vom Standort Ramrath:

1: inokuliertes Blatt *Ch. quinoa* 6dpi, 2: nachwachsende Blätter von *Ch. quinoa* 11dpi, 3: 15dpi, 4: mit PAS 810 goldmarkierte stäbchenförmige BVQ-Partikel, 5: lokale Flecken auf *Ch. murale* 7dpi, 6: BVQ-Übertragung von *Ch. murale* auf *Ch. quinoa* 7dpi, 7: auf *Ch. rubrum* 7dpi, 8: auf *Sp. oleracea* 'Matador' 7 dpi.

Tombusviridae

I. *Beet black scorch virus (BBSV)*

Die Isolate aus den bisher bekannten Befallsregionen in den USA, China und im Iran wurden durch Prof. R. Koenig näher charakterisiert und in ihrer phylogenetischen Abstammung gegenüber gestellt (Abb. 21). Das Isolat aus den USA steht in enger Beziehung zu den chinesischen Isolaten, während der Unterschied zum iranischen Isolat etwas größer ist.

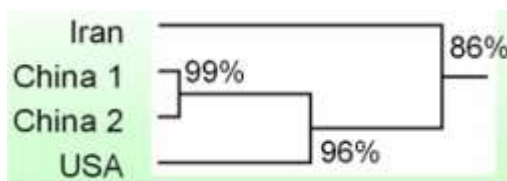
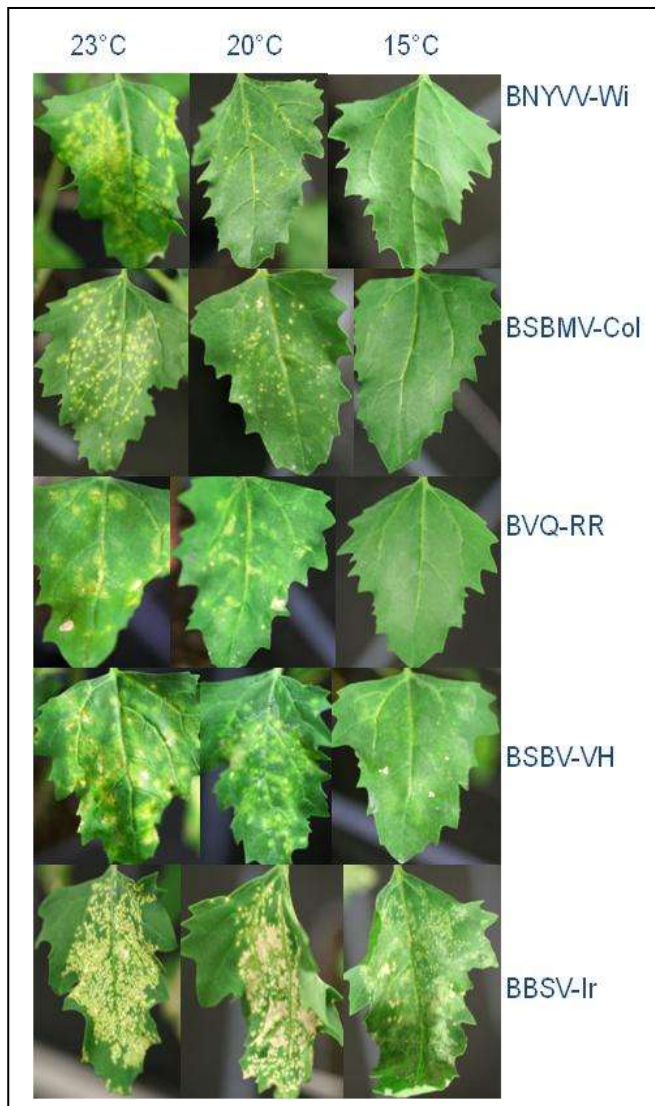


Abbildung 21: Phylogenetischer Stammbaum zur Beziehung der bekannten BBSV-Isolate (Prof. R. Koenig, 2007)

Die Isolate des BBSV aus Iran und China sowie ein Roh-Serum gegen das iranische Isolat (268) wurden uns von Frau Prof. Koenig zur Verfügung gestellt. In Zusammenarbeit mit dem Labor Dr. Rabenstein wurden IgG und Konjugat aus dem Serum gegen das iranische Isolat hergestellt, die für den DAS-ELISA sehr gut geeignet sind. Weiterhin wurde eine Virusreinigung durchgeführt. Drei Tage nach mechanischer Inokulation von *Ch. quinoa* mit dem BBSV-Isolat wurden 50g der Blätter mit hoher Anzahl von Lokalläsionen geerntet, in

Kaliumcitratpuffer aufgeschlossen, nach der Reinigungsvorschrift für Potyviren gereinigt und in Cäsiumchlorid über Nacht bei 45.000 UpM bei 10°C angereichert (Abb. 23).

Für die geplanten Infektionsversuche wurde die Auswirkung eines Temperatur-Regimes zwischen 23°C und 15°C auf die Symptomausprägung der Viren auf *Ch. quinoa* untersucht (Abb. 22).



Wie aus der Abbildung 22 ersichtlich wird, unterscheiden sich die bodenbürtigen Zuckerrübenviren in ihrer Vermehrung in Abhängigkeit von der Temperatur.

Die Benyviren (BNYVV, BSBMV) bilden die stärksten Symptome bei 23°C aus, zeigen bei 20°C viel weniger Lokalläsionen und bleiben bei 15°C symptomlos.

Die Pomoviren (BVQ, BSBV) zeigen bei 23°C und 20°C eine ähnlich gute Symptomentwicklung. Bei 15°C bleibt das BVQ ebenfalls symptomlos und das BSBV zeigt schwache Vergilbungen, was für eine langsamere Virusvermehrung und schwächere Symptomausprägung spricht.

Das Betanecrovirus (BBSV) reagiert bei 23°C und 20°C mit einer schnellen und starken Nekrotisierung des Blattgewebes und entwickelt auch bei 15°C noch intensive Symptome.

Abbildung 22: Temperatur abhängige Symptom-Entwicklung der bodenbürtigen Zuckerrübenviren nach mechanischer Inokulation von *Ch. quinoa* bei Temperaturen von 23°C, 20°C und 15°C

Ausgehend von den Ergebnissen des Temperaturversuches, wurden Untersuchungen zum Wirkkreis des BBSV unter Klimakammerbedingungen bei 15°C durchgeführt (Abb. 23).



Abbildung 23: Nachweis von unterschiedlichen Wirtspflanzen für das BBSV.
 1: angereichertes BBSV in Cäsiumchlorid, 2: isometrische Partikel des BBSV (28nm), 3-8: nekrotische Lokalläsionen auf *Chenopodium*-Arten, 9-14: auf Spinat, *Celosia* und Tabak-Arten.

Die Infektionsergebnisse wurden sieben Tage nach der Inokulation mittels DAS-ELISA (PAS 268) überprüft und wiesen deutliche Virusentwicklung in verschiedenen Pflanzenarten aus (Tab. 15). Auf *B. vulgaris* entwickelten sich einzelne lokale gelbe Flecke, die später vom Zentrum her nekrotisierten und sich braun verfärbten (Abb.24). Die typischen schwarzen Brandflecke, wie sie in Befallsflächen beschrieben werden, konnten unter den künstlichen Infektionsbedingungen nicht erzeugt werden.

BBSV-Übertragung auf		DAS-ELISA
Gattung	Art	7dpi
Beta	<i>vulgaris</i>	0,7
<i>Chenopodium</i>	<i>amaranticolor</i>	3,0
	<i>capitatum</i>	2,8
	<i>foetidum</i>	3,0
	<i>foliosum</i>	3,0
	<i>quinoa</i>	2,9
	<i>rubrum</i>	2,7
	<i>urbicum</i>	2,5
<i>Nicotiana</i>	Bel'	0,3
	<i>benthamiana</i>	0,4
	<i>clevelandii</i>	0,0
	<i>glutinosa</i>	0,0
	<i>megalocriphon</i>	0,0
	<i>occidentalis</i>	0,1
	<i>tabacum</i> 'Sams	0,7
<i>Celosia</i>	<i>argentae</i>	2,9
<i>Datura</i>	<i>stramonia</i>	2,5
<i>Gomphrena</i>	<i>glubosa</i>	2,5
Amerikanischer Mais		0,0
Ackerbohne	<i>Vicia fabae</i>	1,3
Buschbohne	Pinto'	2,7
Blumenkohl		1,3
Chinakohl		2,1
Gurke		0,3
Kürbis		0,5
Spinat	Matador'	2,8

Tabelle 15: Serologischer Nachweis der BBSV-Übertragung auf unterschiedliche Wirtspflanzen



Abbildung 24: BBSV-Lokalläsionen auf *B. vulgaris* nach mechanischer Inokulation

II. Tobacco necrosis virus (TNV)

Im Rahmen der Isolation bodenbürtiger Zuckerrübenviren von Fangpflanzen aus infektiöser Erde vom Standort Vierhöfen in Bayern wiesen wir das TNV nach. Auffällig waren die hellen und pergamentartig nekrotisierten Blattflecken, die nach Inokulation von *Ch. quinoa* mit Wurzelmazeraten der Zuckerrüben-Fangpflanzen entstanden. (Abb. 25/1). Bei Übertragung eines Mazerates aus diesem nekrotisierten Gewebe auf *B. macrocarpa* und *Ch. quinoa* entstanden wiederholt diese Nekrosen (Abb. 25/2-3).



Abbildung 25: Nachweis des TNV nach Isolation aus Zuckerrübenwurzel vom Standort Vierhöfen
1: helle pergamentartige Flecken 14 Tage nach Inokulation von *Ch. quinoa* mit einem Mazerat aus *B. vulgaris*-Wurzeln, 2: nekrotische Flecken 12 Tage nach Übertragung der nekrotischen Flecken von 1 auf *B. macrocarpa* und 3: 7 Tage nach Inokulation von *Ch. quinoa*

Bei weiterer Kultivierung zeigten sich 3 Tage nach Inokulation (dpi) auf *Ch. quinoa* helle kleine Nekrosen (Abb. 26/1). Das TNV breitete sich in diesem Wirt systemisch in die nachwachsenden Blätter aus, die nach 15 Tagen mit hellen pergamentartigen Nekrosen reagierten (Abb. 26/2). Im infizierten Blattgewebe wurden im Elektronenmikroskop isometrische Partikel nachgewiesen, die mit dem JKI-EP-Antiserum 279 für den TNV-E Serotyp dekorierten (Abb. 26/3).



Abbildung 26: Nachweis des TNV vom Standort Vierhöfen (VH) in *Ch. quinoa*.
1: helle pergamentartige Flecken 4 dpi auf inokulierten Blättern von *Ch. quinoa* 2: nekrotische Flecken 15 dpi auf den nachwachsenden Blättern von *Ch. quinoa* 3: isometrische Partikel dekoriert mit dem TNV-E – Antiserum.

Das gewonnene TNV-VH-Isolat wurde mittels Vortex-Inokulation in Sämlingswurzeln von *B. vulgaris* und *B. macrocarpa* übertragen. Aufgrund des unterschiedlichen Keimungs- und Wachstumsverlaufes beider Rübenarten waren die eingesetzten Sämlinge bei vergleichbarem Entwicklungsstadium von *B. vulgaris* sieben Tage alt und die von *B. macrocarpa* 21 Tage alt. Aus den gut nekrotisierten Blättern von *Ch. quinoa* wurde 3 dpi in der Walzenpresse Virus haltiger Blattsaft in Natriumphosphatpuffer aufgenommen, mit

Karborund versetzt und als Inokulum eingesetzt. Die Sämlingswurzeln wurden zweimal 45 Sekunden mit einer Pause von 90 Sekunden bei 2800 rpm gevortext, wobei das Karborund kleine Wunden in die Wurzeln setzte, durch die das Virus eindringen konnte. Nach 5-minütiger Inkubation in der Inokulum-Lösung wurden die Wurzeln unter einem Wasserstrahl gut abgespült, in autoklavierten Sand pikiert und unter Klimakammerbedingungen inkubiert. Drei, vier und fünf Wochen nach der Inokulation (wpi) wurde die Virusinfektion in den Wurzeln mittels DAS-ELISA nachgewiesen. Es wurden die PAS des JKI-EP 338/ für das TNV-A, 279 für das TNV-E, und die PAS der Loewe Biochemica GmbH 07046 für das TNV-A, 07043 für das TNV-E, 07036 für das TNV-BR und 07035 für das TNV-Ch für den Virusnachweis eingesetzt (Tab. 16).

Tabelle 16: Serologischer Nachweis des TNV-VH-Isolates mittels polyklonaler Antiseren (PAS) in Rüben 5 Wochen nach Vortex-Übertragung (Extinktionswerte nach Messung bei 405nm)

Wirtspflanze 5 wpi	PAS JKI-EP		PAS Loewe Biochemica GmbH			
	TNV-A 338/3	TNV-E 279	TNV-A 7046	TNV-E 7043	TNV-BR 7036	TNV-Ch 7035
<i>B. vulgaris</i>	0,0	3,5	0,0	2,1	0,1	1,0
<i>B. macrocarpa</i>	0,0	4,1	0,0	2,0	0,8	1,8
<i>Ch. quinoa</i>	0,0	3,9	0,0	2,3	1,5	3,4
positive Kontrollen	2,2	2,9	2,2	0,6	0,9	1,4

Die Ergebnisse des serologischen Nachweises des von uns gewonnenen TNV-VH-Isolates zeigten, dass drei und vier Wochen nach Inokulation die Virustiter noch sehr gering waren und Extinktionen von 0,25 nicht überschritten. Fünf Wochen nach Inokulation waren die Titer erheblich angestiegen. Die Antiseren aus dem JKI-EP wiesen homologe Reaktionen nur gegen das TNV-E aus. Die Antiseren der Loewe Biochemica GmbH zeigten auch Reaktionen gegen die TNV-BR- und TNV-Ch-Seren. In beiden Fällen wurde der Serotyp des TNV-A nicht nachgewiesen. Die höchsten Virustiter wurden gegen das TNV-E erreicht. Somit konnte bestätigt werden, dass wir aus Zuckerrübe ein TNV-Isolat gewonnen haben, welches dem Serotyp-E sehr ähnlich ist. Eine phytopathologische Wirkung an Zuckerrübe wurde nicht nachgewiesen.

2.2. Erstellung definierter Virus-Vektor-Populationen

2.2.1. Separierung der bodenbürtigen Viren

➤ **Isolation der einzelnen bodenbürtigen Viren aus Pathogengemischen**

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Benyviren und das Betanecrovirus sich in Reinkultur im Symptombild auf den inokulierten Blättern von *Ch. quinoa* gut differenzieren (Abb. 19). Die Benyviren und das Betanecrovirus bilden Lokalläsionen aus: BNYVV- hellgrüne bis leuchtend gelbe, BSBMV- aschfarbene, BBSV- hellgelbe und schnell weiß nekrotisierende Lokalläsionen. Die Pomoviren bringen unterschiedlich geformte gelbe Blattflecken hervor, die nicht immer eindeutig zu differenzieren sind: BSBV- verschmelzende, sich entlang der Adern ausbreitende, später braun nekrotisierende, BVQ- mit kleinen Nekrosen durchsetzte Flecken (Abb. 27).



Abbildung 27: Differenzierende Symptomausprägung bodenbürtiger Zuckerrübenviren auf *Ch. quinoa*

Die separate Isolation und Vermehrung der einzelnen Viren des Rizomania-Komplexes war zur Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen den Krankheitserregern notwendig. Deshalb wurde eine Isolationsmethode für die Trennung der Pathogene über Indikatorpflanzen entwickelt. Die Trennung der im Gemisch vorkommenden Beny- und Pomoviren ist schwierig, weil sie gleichzeitig durch *P. betae* in die Wurzeln übertragen werden können und sich dort fast gleichzeitig vermehren. Bei Übertragung von Wurzelmazeraten auf Indikatorpflanzen wird der gesamte Viruskomplex übertragen und die Viren sind vorerst wegen der zeitlich unterschiedlichen Symptom-Erscheinung und -Bilder nicht sicher zu trennen.

Während unserer Versuche zu Virusisolation stellten wir fest, dass sich die einzelnen Viren nach Vektorübertragung unterschiedlich schnell in die oberirdischen Pflanzenteile bewegen und sich in einzelnen Indikatorpflanzen unterschiedlich ausbreiten.

Trennung der Pomoviren vom BNYVV aus Zuckerrübe

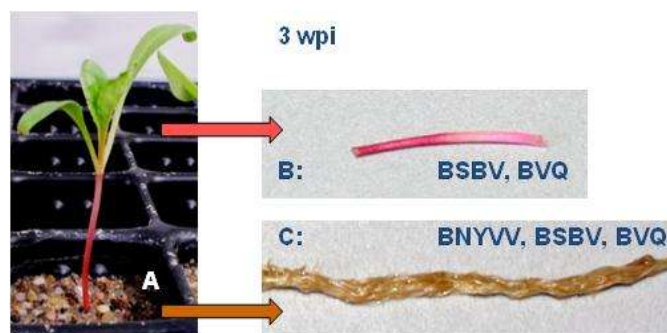


Abbildung 28: Trennung der Pomoviren BVQ und BSBV vom BNYVV aus mischinfizierten Zuckerrübenpflanzen (C) 3 Wochen nach Inokulationsbeginn (A) durch Isolation aus dem Hypokotyl (B)

Für die Inokulation von Indikatorpflanzen wurden Pflanzenwurzeln und Hypokotyl nach 3-wöchiger Inkubation unter Klimakammerbedingungen in kontaminierten Erdproben separat mazeriert. Nach dieser Inkubationszeit konnten die Pomoviren bereits aus dem Hypokotyl der Sämlinge durch Inokulation von *Ch. quinoa* mit dem Hypokotylmazerat isoliert werden, während BNYVV noch im Wurzelbereich lokalisiert blieb. Somit war es möglich, aus dem Viruskomplex die Pomoviren vom BNYVV zu trennen (Abb. 28).

Trennung des BVQ von BSBV und Benyviren in *Chenopodium quinoa*

Nach mechanischer Inokulation der Blätter von *Ch. quinoa* mit beiden Pomo- und Benyviren wurde beobachtet, dass die Vermehrung von BSBV, BSBMV und BNYVV nur auf die inokulierten Blätter beschränkt blieb. Das BVQ hingegen breitet sich systemisch in die nachwachsenden Blätter von *Ch. quinoa* aus und bildet in ihnen 10 bis 12 Tage nach Inokulation kräftige Blattflecken, die von den Blattadern ausgingen und mit vielen kleinen braunen Nekrosen durchsetzt waren (Abb. 20). Durch die systemische Ausbreitung des BVQ in dieser Indikatorpflanze, konnte dieses Virus von den anderen Viren des Pathogenkomplexes separiert werden.

Trennung von Beny- und Pomoviren in *Chenopodium rubrum*

Weiterhin war es auch möglich, die beiden Benyviren in *Ch. rubrum* von den Pomoviren zu trennen. BNYVV und BSBMV breiten sich systemisch in dieser Indikatorpflanze aus und verursachen ca. 10 dpi Symptome auf den nachwachsenden Blättern, in denen die Pomoviren nicht nachgewiesen wurden (Abb. 4).

Die vergemeinschaftet vorkommenden bodenbürtigen Zuckerrübenviren können durch gezielte Übertragung auf Indikatorpflanzen separiert werden. Somit wurde die Grundlage für die Bereitstellung von definierten Pathogenpopulationen zur Untersuchung von Virus-Vektor-Wirt-Wechselwirkungen geschaffen.

2.2.2. Etablierung der Vortex-Inokulationsmethode

Für die Entwicklung einer effektiven Methode zur reproduzierbaren Virusinfektion in Zuckerrübe übernahmen wir die Methode der Vortex-Inokulation, die von Prof. R. Koenig für die Übertragung des BNYVV etabliert wurde (Koenig et al., 1991 und 2009).

Die Virusisolate der bodenbürtigen Zuckerrübenviren wurden auf *Ch. quinoa* vermehrt. In Abhängigkeit von der Entwicklung der verschiedenen Viren wurden die infizierten Blätter 3 dpi für das BBSV, 5 dpi für die Pomoviren und 7 dpi für die Benyviren geerntet. Aus je 4g dicht mit Lokalläsionen bzw. Blattflecken bedeckten Blättern wurde mittels einer Walzenpresse (MEKU, Erich Pollähne GmbH) virushaltiger Pflanzensaft gewonnen, in 4 ml PBS (pH 7,4) aufgenommen und in 5 ml-Röhrchen gefüllt (Abb.29/1-2). Dieser wurde mit 0,4g Karborund (Siliciumcarbid, ALDRICH, Nr. 357391) gemischt und für die nachfolgende Vortex-Inokulation der Wurzeln von Zuckerrübensämlingen (Abb. 29/3-4) eingesetzt.

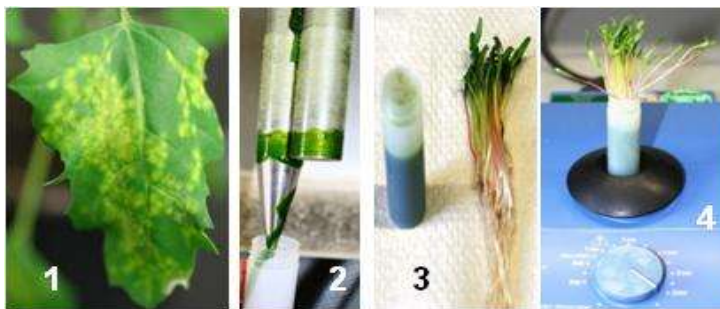


Abbildung 29: Inokulation von Zuckerrübensämlingen mittels Vortex-Methode

1-2: Gewinnung infektiösen Blattsaftes durch Mazeration von infizierten *Ch. quinoa*-Blättern an der Walzenpresse, 3-4: Inokulation von Zuckerrüben-Sämlingswurzeln im infektiösen Blattsaft durch vortexen.

Die Zuckerrübensämlinge einer Rizomania anfälligen Zuchtlinie wurden in autoklaviertem Sand in einer Klimakammer (22°C, 16 h Licht mit 10 klx) angezogen. Für Mischinokulationen mit mehreren Viren wurden die Blattsäfte der jeweiligen Viren im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Sämlinge wurden über dem Wurzelbereich mit Papiertüchern abgedeckt, damit während des Vortexens das Inokulum nicht Hypokotyl und Blätter erreichen kann. Bei 2800 rpm auf dem Minishaker MS2 (IKA) erfolgte die Inokulation nach folgendem Schema: 45 s Schütteln, 90 s Ruhen, 45 s Schütteln, 5 min Ruhen. Danach wurde das Inokulum unter einem starken Leitungswasserstrahl abgespült, die Pflanzen in autoklavierten Sand pikiert und in der Klimakammer bei 23°C kultiviert. Wöchentlich wurde die Virusinfektion in den Wurzeln, im Hypokotyl und in den Blättern von jeweils 5 Einzelpflanzen mittels RT-PCR erfasst. Als Gesundheitskontrolle wurden Sämlinge unter der beschriebenen Prozedur in PBS (pH 7,4) behandelt.

Wie aus Tabelle 17 ersichtlich wird, eignet sich die Vortex-Inokulation auch für die Infektion von Rübenwurzeln mit Beny- und Pomoviren sehr gut. Durch gezielten Einsatz einer verhältnismäßig hohen Inokulumdichte bei der Vortex-Inokulation etabliert sich die Virusinfektion in den Wurzeln schnell. Drei Wochen nach der Inokulation (wpi) konnte eine Virusausbreitung der Benyviren in Hypokotyl und nachwachsende Blätter beider Rübenarten beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Ausbreitung der Pomoviren nur in *B. macrocarpa*, in der eine höhere Infektionsrate erreicht wurde als in *B. vulgare*.

Tabelle 17: Virusnachweis nach Vortex-Inokulation in Rübenwurzeln 1-3 wpi und Nachweis der Virusausbreitung in Hypokotyl und Blatt 3 wpi

Virus	Wirt wpi	Wurzelninfektion (%infizierter Pflanzen)						Virus	Wirtspflanze	Pflanzenteile		
		<i>B. vulgaris</i>			<i>B. macrocarpa</i>					3 wpi	Wu	Hy
BVQ-RR		75	75	75	100	75	75		<i>B. vulgare</i>	25	0	0
										<i>B. macrocarpa</i>	100	50
BSBV-VH		75	0	0	100	25	25		<i>B. vulgare</i>	25	0	0
										<i>B. macrocarpa</i>	25	50
BSBMV-Col		0	75	75	75	100	75		<i>B. vulgare</i>	75	50	25
										<i>B. macrocarpa</i>	75	50
BNYVV-Wie		100	75	75	100	100	100		<i>B. vulgare</i>	100	25	0
										<i>B. macrocarpa</i>	100	100

2.2.3. Erstellung von definierten Virus-Vektor-Populationen

Für die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen den bodenbürtigen Zuckerrübenviren sollten definierte Virus-Vektor-Populationen folgender Kombinationen geschaffen werden: Virus-freie *P. betae*, BNYVV-tragende *P. betae*, BVQ-tragende *P. betae*, BSBV-tragende *P. betae*, und BSBMV-tragende *P. betae* sowie Populationen mit unterschiedlicher Viruskombination in *P. betae*.

Es wurden zwei *P. betae*-Populationen (Pb2 und Pb4) wiederholt auf gesunder Zuckerrübe vermehrt und die Vektor tragenden Wurzeln mittels RT-PCR gegen die bekannten bodenbürtigen Viren getestet. Virusfreies *P. betae*-Wurzelmateriale wurde auf Zuckerrübenwurzeln vermehrt, getrocknet, in einer Schlagmühle (Mikro-Feinmühle Culatti, Typ MFC, Janke&Kunkel GmbH&Co. KG) zu Mehl zerkleinert und als Wurzelmehl-Inokulum bei Raumtemperatur konserviert.

Die Virusbeladung des Vektors erfolgte folgendermaßen: gesunde Zuckerrübensämlinge wurden wie beschrieben über Vortex-Inokulation mit den Viren einzeln und in Viruskombinationen infiziert und vor dem Pikieren der inokulierten Sämlinge in sterilen Sand wurden die Wurzeln in virusfreies *P. betae* beladenes Wurzelmehl getaucht. Aus den anhafteten Dauersporen des Protisten keimen in der Sandkultur Zoosporen aus, die aktiv über ein Stilet die Wurzelzellen durchbohren und ihr Zytoplasma in die Pflanze übertragen. Bei weiterer Differenzierung des Zoosporenzytoplasmas zu Zoosporangien wird die Aufnahme der in die Wurzeln übertragenen Viren in den Vektor möglich. Der Vektor und die Viren können bereits 8 dpi mittels RT-PCR sehr gut nachgewiesen werden (Abb. 31). Für die Entwicklung einer hohen Konzentration an Virus tragendem Vektor ist jedoch eine längere Inkubationszeit (ca. 8 Wochen) nötig, in der sich Viren und Vektor vermehren und eine hohe Dichte an Virus beladenem Inokulum entwickeln können.

Diese mit Vektor und Virus infizierten Pflanzen werden als Inokulum für gesunde Zuckerrübensämlinge verwendet. Der Erfolg der Virusbeladung und der Effizienz der Virusübertragung des Vektors zeigt sich anhand der Infektionsrate in den inokulierten Sämlingen. Nach Infektionserfolg müssen die künstlich geschaffenen *P. betae*-Isolate vermehrt und die Virusbeladung kontrolliert werden, ehe sie als Inokulum für Infektionsversuche eingesetzt werden können.

➤ Schaffung definierter Virus-Vektor-Populationen

In einem nächsten Schritt wurde die Vektorpopulation Pb4 einzeln mit BNYVV, BSBMV, BSBV und BVQ und mit einer Kombination aus BNYVV/BSBMV beladen (Abb. 30).

Folgende 8 Virus-Vektor-Populationen wurden im Rahmen des Vorhabens erzeugt, vermehrt und konserviert:

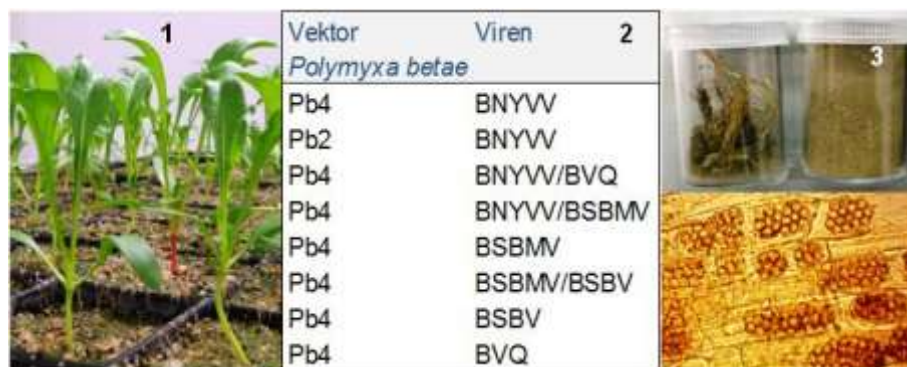


Abbildung 30: Gewinnung von Vektor-Virus-Populationen:
 1: Sandkultur für die Vermehrung, 2: Vektor-Virus-Populationen,
 3: Dauersporen-haltiges Wurzelmehl.

Die erfolgreiche Virusübertragung aus künstlich geschaffenen Virus-Vektor-Wurzelmehl-Populationen auf Rübensämlinge konnte bis zum Projektabschluss für drei Populationen (BNYVV, BSBMV, BNYVV+BSBMV) experimentell nachgewiesen werden. Der limitierende Faktor für die Virusübertragung aus den Pomovirus-Populationen ist die geringe Konzentration dieser Viren nach der Inokulum-Vermehrung.

An der Schaffung von Pomovirus-Populationen mit einer höheren Effizienz der Virusübertragung muss noch gearbeitet werden.

3. Beobachtung von Interaktionen zwischen Benyviren in künstlichen Infektionssystemen

Nach erfolgreicher Etablierung der Vortex-Übertragung aller Viren auf Zuckerrübenpflanzen und Erzeugung Virus-spezifischer Populationen von *P. betae* konnten Infektionsversuche durchgeführt werden, deren Ziel es war, die Virusentwicklung in Einzel- und Mischinfektionen zu untersuchen.

Die Bewertung der Virusentwicklung erfolgte zum Einen durch die Bestimmung der Rübenengewichte im Verlauf von acht Wochen nach Inokulation (wpi) unter verschiedenen Befallsbedingungen.

Zum Anderen wurden die Viruskonzentrationen durch absolute Quantifizierung mit Standardkurvenmethode mittels quantitativer Echtzeit-PCR (real-time quantitative PCR, kurz qPCR) unter Einsatz des analytikjena/Biometra qTowers 2.2 bestimmt. Diese Methode wurde durch Dr. Angelika Ziegler 2014 für die Benyviren BNYVV und BSBMV etabliert.

Für das BSBMV wurden aus dem Sequenzbereich der RNA2 die Primer BSBMV 5' (fwd) – 5'-TCG CTA TTC TTA TGA CGA AAG-3' und BSBMV 3' (rev) – 5'-TTA AAA GCT TGT AAA GTG GT-3' abgeleitet (Amplikon 174bp). Die Kontroll-Verdünnungsreihe wurde aus der Plasmid-DNA (ID 38 EA 27, Klon 6) mit 414,2 ng/µl DNA-Gehalt in sechs 10-er Stufen verdünnt. Die qPCR lief mit 40 Zyklen bei dem Temperaturregime 95°C-2', 95°C-15'', 58°C-15'', 72°C-30'', 83,5°C-20'' mit dem BIOLINE PCR-Mix Sensi Fast TM SYBR No-Rox.

Für das BNYVV wurden die Primer BNYVV-CP26 F (fwd) – 5'-CAT GGA AGG ATA TGT CTC ATA GGT-3', BNYVV-CP96 R (rev) – 5'-AAC ACT CAC GAC GTC CGA AAC-3' (Amplikon 70bp) und eine Sonden-Sequenz BNYVV-CP56T – 5'-TGA CCG ATC GAT GGG CCC G-3' abgeleitet. Die Kontroll-Verdünnungsreihe wurde aus linearisierter Plasmid-DNA (BNYVV-2, Klon 1) mit einem DNA-Gehalt von 146 ng/µl in sechs 10-er Stufen verdünnt. Die qPCR lief mit 45 Zyklen bei dem Temperaturregime 95°C-2', 95°C-15'', 60°C-45'' mit dem BIOLINE PCR-Mix Sensi Fast Probe No-Rox.

Bestimmt wurde die Virus-RNA-Konzentration in pg/100ng Total-RNA.

- Bestimmung von RNA-Konzentration und Virusausbreitung der Benyviren nach Vortex-Inokulation von Zuckerrübe

Für die Bewertung von Infektionsverläufen mittels Virus-RNA-Konzentrationen wurden die RNA-Konzentrationen verschiedener BNYVV-Isolate/Typen in 0,5g hochinfiziertem Ausgangsmaterial (*Ch. quinoa*-Blätter mit hoher Anzahl von Lokalläsionen) verglichen. Dabei beobachteten wir, dass sich die RNA-Konzentrationen der Isolate im P-, A- und B-Typs des Virus deutlich unterscheiden. Wie Tabelle 18 beispielsweise demonstriert, liegt die RNA-Konzentration des P-Typs, BNYVV-Isolat Pithiviers, um ein Vielfaches höher als die Konzentrationen der A- und B-Typ-Isolate. Eventuell ist die erhöhte RNA-Konzentration im P-Typ auf das Vorhandensein der zusätzlichen RNA 5 zurückzuführen. Im DAS-ELISA hingegen zeigten sich im infektiösen Presssaft hohe Titer für das Virus-Hüllprotein in vergleichbaren Größenordnungen für alle Virusisolate (Tab. 18). Der Nachweis der BSBMV-RNA wurde in ähnlichen Konzentrationsbereichen wie der des BNYVV-B-Types beobachtet, wobei die Titer des Hüllproteins ebenfalls sehr hoch waren.

Tabelle18: Bestimmung der Virus-RNA-Konzentration in Isolaten unterschiedlicher BNYVV-Typen und des BSBMV-Col in *Ch. quinoa* (0,5g Blattmaterial) vergleichend zu deren Virustiter im Presssaft mittels DAS-ELISA

Inokulum			RNA-Konzentration	DAS-ELISA
Herkunft	BNYVV-Isolat	BNYVV-Typ	pg in 100 ng Total-RNA	E _(405nm)
Frankreich	Pithiviers	P	33,96	2,8
Italien	Roviga	A	2,30	2,6
	Bogian	A	1,33	2,2
Österreich		B	1,72	2,6
Deutschland	Judenmann	B	0,70	2,4
Herkunft BSBMV-Isolat				
Colorado	Colorado	-Col	0,98	2,1

Weiterhin wurde untersucht, wie sich die RNA-Konzentration im Inokulum für die Vortex-Virusübertragung nach Verdünnung des in der Walzenpresse aufgeschlossenen infektiösen Blattsaftes verändert. Es wurde BNYVV-RNA direkt aus drei im Durchmesser 7mm großen Stanzstücken mit deutlichen Lokalläsionen isoliert und dazu vergleichend die Virus-RNA aus Presssaft von drei Stanzstücken (Ststü) mit 300µl PBS verdünnt, von 100µl Presssaft in 3 ml PBS und in 6 ml PBS verdünnt isoliert.

Tabelle19: Bestimmung der Virus-RNA-Konzentration in Isolaten unterschiedlicher BNYVV-Typen nach Verdünnung des infektiösen Presssaftes

BNYVV-		RNA-Konzentration in <i>Ch. quinoa</i> pg Virus-RNA in 100ng Total-RNA aus Blattsaft			
Isolat	Typ	3 Stanz- stücke (Lokal- läsionen)	Presssaft nach Presse		
			3 Ststü +300µl PBS	100µl in 3ml PBS	100µl in 6ml PBS
Pithiviers	P	60,71	23,68	17,93	13,05
Italien (Ro)	A	6,83	1,51	0,54	0,00
Judenmann	B	7,01	1,89	0,63	4,16

Auch dieses Experiment zeigte (Tab. 19), dass im Isolat Pithiviers eine wesentlich höhere RNA-Konzentration vorliegt, die auch bei einer Verdünnung bis 1:60 deutlich über der Nachweisgrenze bleibt. Die RNA-Konzentrationen der A- und B-Typ-Isolate, die schon im Ausgangsmaterial 10-fach geringer waren als im P-Typ, sanken bei Verdünnung des Inokulums schnell unter die Nachweisgrenze.

Die RNA-Konzentrationen der BNYVV-Typen sind trotz der beschriebenen Unterschiede wesentlich höher als die bisher nachgewiesenen RNA-Konzentrationen des BSBMV und der Pomoviren. Wie die Versuche zur Anreicherung von Viruspartikeln zeigten, ist nur das BNYVV in hoher Konzentration zu gewinnen. Trotz einer guten Symptombildung sind die Partikel der anderen Viren in den bisher geprüften Wirten nicht gut zu konzentrieren. Eventuell degenerieren die Partikel durch die schnelle Nekrotisierung des infizierten Gewebes wie beim BSBMV und auch teilweise bei den Pomoviren sehr schnell oder sie vermehren sich generell in geringerem Umfang.

Aus diesem Grund eignete sich die von uns etablierte qPCR-Methode wenig für den Vergleich der RNA-Konzentrationen zwischen den Beny-, zwischen den Pomo- und zwischen Beny- und Pomoviren während des Infektionsverlaufes.

Die RNA-Quantifizierung muss so optimiert werden, dass die RNA-Konzentrationen vergleichbar werden und ein Maßstab gefunden wird, der die mittels RT-PCR und DAS-ELISA gut nachweisbare Virusinfektion auf RNA-Ebene erfassbar macht.

Da auf Basis der qPCR die Quantifizierung der RNA unterschiedlicher Viruskomponenten nicht erfassbar war, verfolgten wir die Virusentwicklung im Infektionsverlauf durch Virusnachweis mittels RT-PCR und DAS-ELISA.

Nach der Vortex-Inokulation von Zuckerrübensämlingen wurde der Infektionserfolg mittels RT-PCR und DAS-ELISA in regelmäßigen Abständen (wöchentlich) überprüft. Ungeachtet der unterschiedlichen RNA-Konzentrationen im Inokulum infizierten alle BNYVV-Isolate anfällige Zuckerrübensämlinge und führten zur Virusvermehrung in den Wurzeln und zur Ausbreitung in die oberirdischen Pflanzenteile. Acht Tage nach der Inokulation wurden in den Wurzeln aller Genotypen der Vektor, *P. betae*, und in den Wurzeln des anfälligen Standards das BNYVV nachgewiesen (Abb. 31). Im Genotyp mit Rz1/2-Resistenz ist nur ein sehr schwaches Fragment erkennbar, was für unterdrückte Virusvermehrung sprechen kann.

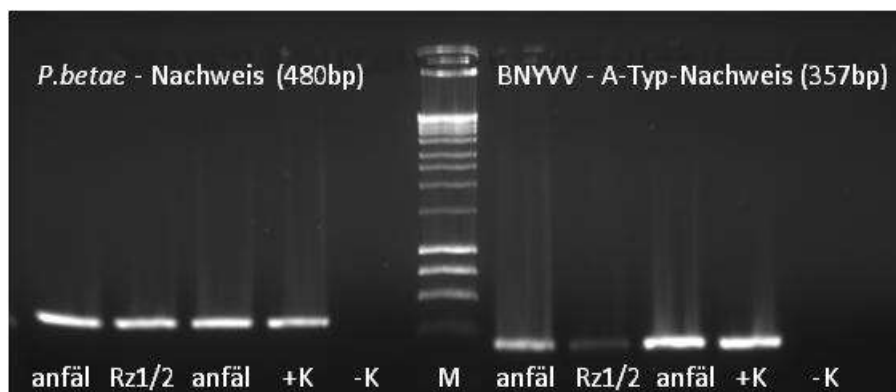


Abbildung 31: Nachweis von *P. betae* und des BNYVV acht Tage nach Vortex-Inokulation von *Beta vulgaris*-Wurzeln.

Die Beobachtung des Infektionsverlaufes des BNYVV-P-, -A- und -B-Typen in anfälliger Zuckerrübe nach Vortex-Inokulation der Wurzeln zeigte, dass offensichtlich Aggressivitätsunterschiede zwischen den Isolaten bestehen. Im P-Typ steigen die Virustiter im Verlauf von fünf Inkubationswochen schneller höher an als bei den anderen beiden Typen. Eine ähnliche Tendenz ist für die Virusausbreitung ins Hypokotyl zu verzeichnen (Abb. 32).

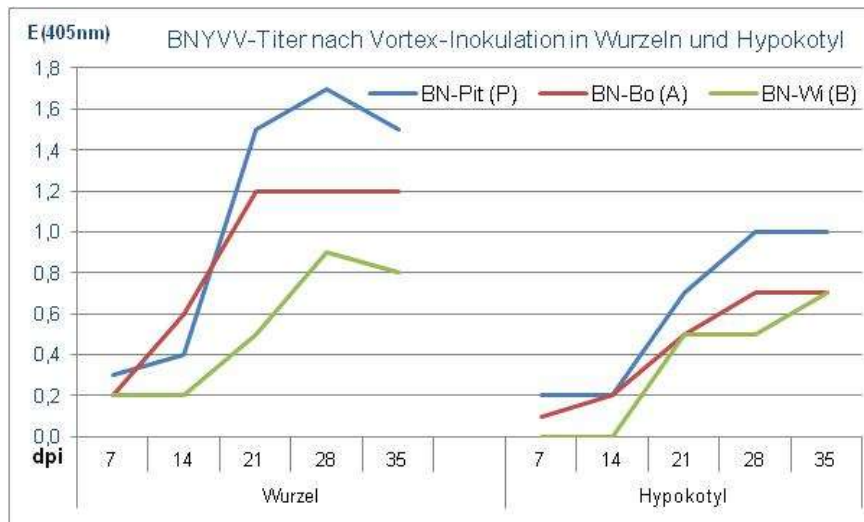


Abbildung 32: Ausbreitung und Vermehrung von BNYVV-Typen nach Vortex-Inokulation der Sämlingswurzeln im Verlauf von 5 Inkubationswochen.

- Untersuchung von synergistischen Effekten zwischen verschiedenen Viren

Von Wisler et al. (2003) wurde gezeigt, dass Interaktionen zwischen den Benyviren in mischkontaminierten Böden dazu führen, dass die Virustiter des BSBMV bei Anwesenheit des BNYVV abfallen. In Rüben mit dem Rz2-Resistenzgen wurde jedoch die Infektion mit dem BSBMV einzeln nicht reduziert. Dieser Fakt deutet darauf hin, dass die gegen das BNYVV wirksamen Resistenzgene keine Wirkung gegen das BSBMV haben.

Unser Ziel war es, in einem vom infektiösen Boden unabhängigen Infektionssystem Interaktionen zwischen den Benyviren zu beobachten. Dafür nutzten wir die Vortex-Inokulationsmethode zur gezielten Infektion von Zuckerrübensämlingen mit den beiden Viren einzeln und im Gemisch. Zuckerrübensämlinge der anfälligen Linie 6005512 wurden in den Varianten 1 bis 5 (Abb. 33) inokuliert, in autoklavierten Sand pikiert, für acht Wochen unter Klimakammerbedingungen inkubiert und wöchentlich wurden die Gewichte von fünf Einzelpflanzen und von Rübenkörper und Blattanteil getrennt bestimmt.

Im Ergebnis der Erhebungen zur Veränderung des Rübengewichtes während des achtwöchigen Krankheitsverlaufs zeigte sich, dass im Vergleich zur Gesundkontrolle die mit dem Vektor beladenen Pflanzen ein durchschnittlich leicht höheres Pflanzengewicht aufwiesen. Bei Einzelinfektion mit den Benyviren wurde das Gewicht durch das BNYVV stärker reduziert als durch das BSBMV. Nach Infektion der Pflanzen mit beiden Viren wurde ein deutlich höherer Abfall des Gewichtes als bei den Einzelinfektionen nachgewiesen. Offensichtlich ist die Infektion durch zwei viröse Pathogene ein größerer Stress für die Pflanze.

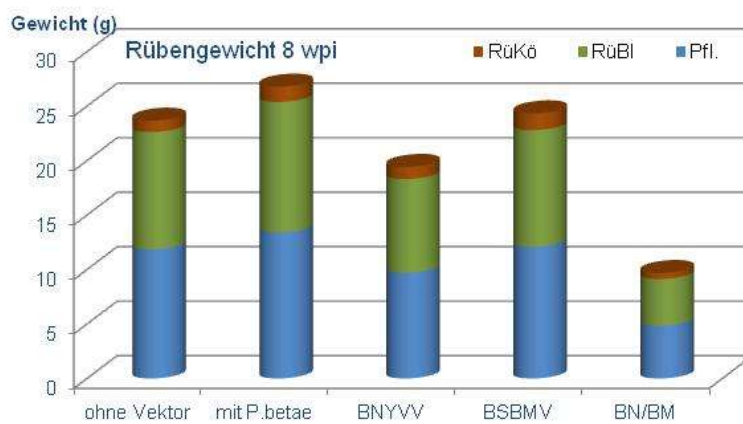
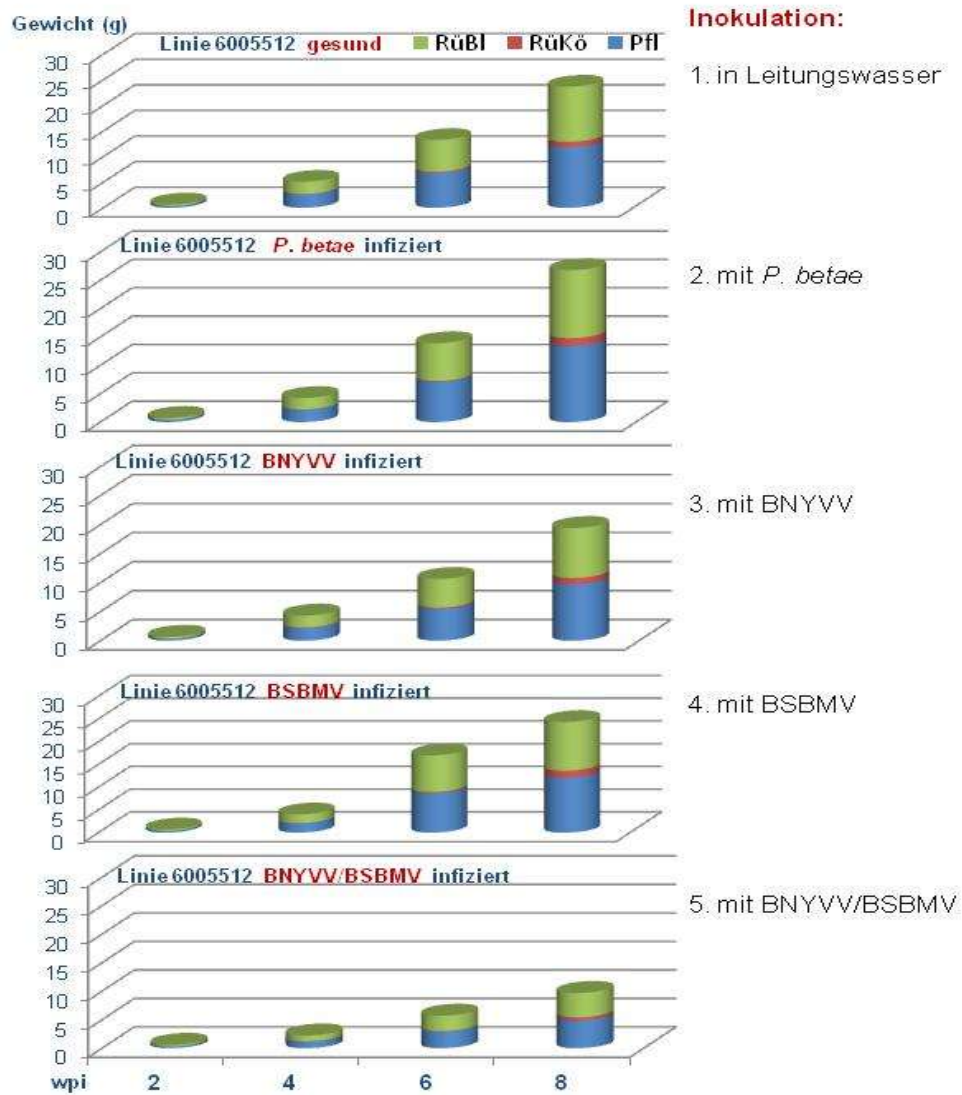


Abbildung 33: Entwicklung der Rüben gewichte unter Einfluss der Infektion durch Benyviren und *P. betae* im Verlauf von 8 Inkubationswochen.

Beobachtungen zu möglichen synergistischen Effekten bei Mischinfektionen konnten auch durch Nachweis der Virusinfektion mittels RT-PCR während eines 6-wöchigen Krankheitsverlaufes gezeigt werden. Anfällige Sämlinge wurden mit dem Vektor beladen, mit dem BNYVV und BSBMV einzeln und mit beiden Viren im Gemisch inokuliert und drei und sechs Wochen nach Inokulation der Virusnachweis in den Wurzeln von 5 Einzelpflanzen durchgeführt. Der Virusvektor war in allen Infektionsvarianten über den Krankheitsverlauf nachweisbar. Nach Einzelinokulation konnten beide Benyviren in allen Pflanzenwurzeln sowohl nach drei als auch nach sechs Wochen detektiert werden (Abb. 34). In den mischinfizierten Wurzeln wurde ein Verlust der BSBMV-Infektion nach sechs Wochen verzeichnet. Dieser Effekt kann für eine Verdrängung des BSBMV durch das BNYVV sprechen.

Pathogennachweis	In Wurzeln des anfälligen Genotyps 6005512																			
	BNYVV										BSBMV									
	3 wpi					6 wpi					3 wpi					6 wpi				
Einzelpflanze	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Inokulation mit:																				
BNYVV-Jud	+					+														
BSBMV-Col											+									
BNYVV/BSBMV	+					+					+					-				
<i>Polymyxa betae</i>	+																			

Abbildung 34: Infektionsverlauf der Benyviren in Einzel- und Mischinfektion im Verlauf von sechs Inkubationswochen.

Ein ähnlicher Effekt wurde in Mischinfektionen mit BNYVV und BVQ im Infektionsverlauf von neun Wochen beobachtet. In Rübenwurzeln, die durch Vortex-Inokulation einzeln mit dem Benyvirus BNYVV und dem Pomovirus BVQ beladen wurden, konnten beide Viren über den gesamten Krankheitsverlauf nachgewiesen werden. Nach der Mischinfektion wurde das BVQ bereits ab der dritten Inkubationswoche verdrängt (Abb. 35).

Virus	BNYVV															BVQ																			
	3 wpi					6 wpi					9 wpi					3 wpi					6 wpi					9 wpi									
Einzelpflanzen	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
BNYVV-Jud	+					+					+																								
BVQ-RR																+																			
BNYVV/BVQ	+					+					+					-																			

Abbildung 35: Infektionsverlauf des BNYVV und BVQ in Einzel- und Mischinfektion im Verlauf von neun Inkubationswochen.

Wie die Interaktionen zwischen den Benyviren und zwischen BNYVV und BVQ zeigten, ist in beiden Fällen das BNYVV das aggressivere und dominierende Pathogen.

Während der Projektlaufzeit konnten keine weiteren interessanten Interaktionen zwischen beiden Pomoviren, zwischen Pomo- und Benyviren und die Rolle des BOLV untersucht werden. Hierfür ist es notwendig, die einzelnen Isolate in hochkonzentrierte Kulturen zu bringen und auch Vektor-Virus-Populationen in ausreichender Menge mit hoher Effizienz der Virusübertragung zu schaffen.

Danksagung

Die Untersuchungen zu Interaktionen zwischen bodenbürtigen Zuckerrübenviren setzten vielseitige Charakterisierungen der Virus-Vektor-Populationen voraus, die nur in Kooperation verschiedener Spezialisten durchgeführt werden konnten, denen wir unseren Dank für ihr Interesse und ihre kooperative Unterstützung aussprechen möchten.

Durch Kooperation mit den Züchtern der GFPi-Abteilung Betarüben war es uns möglich infektiöses Material aus Befallsflächen in Deutschland und definiertes Pflanzenmaterial in die Untersuchungen einzubeziehen.

Der Nachweis und die Differenzierung der bodenbürtigen Viren wurde durch die Bereitstellung von Antisera und monoklonalen Antikörpern aus dem Labor von Frau Prof. Renate Koenig, Dr. Wulf Menzel, der DSMZ und Dr. Frank Rabenstein unterstützt.

Durch die Bereitstellung von Referenzmaterial für das BBSV, BSBV und BVQ durch Prof. R. Koenig, für das BSBMV durch Prof. Charles Rush (Amarillo) und Dr. Claudio Ratti (Bologna) und für das BOLV durch Prof. Liu und Dr. W. Menzel war es uns möglich, diese Viren zu charakterisieren und Interaktionen zu beobachten.

Wir danken weiterhin Dr. Angelika Ziegler für die Etablierung der qPCR-Methode und CP-Analyse und Dr. Viktoria Fomitcheva für die molekularbiologische Analyse der Virussequenzen und Bereitstellung spezifischer Primer.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und die Virusidentifizierung mittels ISEM danken wir Frau Elke Zimmermann vom JKI-EP Quedlinburg und den Mitarbeiterinnen Frau Christina Maaß und Frau Sabine Schuhmann des Labors von Dr. Katja Richert-Pöggeler.

Nicht zuletzt gilt unser Dank den sehr engagierten technischen Assistentinnen Viola Papke, und Marion Urban aus dem Labor von Dr. Ute Kastirr.

Literatur

- Babos, P., Kassanis, B. (1963): Serological Relationships and some Properties of *Tobacco Necrosis Virus* Strains. J. gen. Microbiol. 32, 135-144.
- Barbarossa, L., Vetten, H.-J., Kaufmann, A., Lesemann, D.-E., Koenig, R. (1992): Monoclonal antibodies to *beet soil-borne virus*. Ann. appl. Biol. 121, 143-150.
- Bode O, 1958. *Tobacco necrosis virus*. In Klinkowski M, Pflanzliche Virologie, Vol II. Berlin, Germany: Akademie-Verlag.
- Bornemann, K. And Varrelmann, M. (2011): Analysis of the resistance-breaking ability of different *Beet necrotic yellow vein virus* isolates loaded into a single *Polymyxa betae* population in soil. Phytopathology 101, pp. 718-724.
- Bornemann, K. (2012): Charakterisierung von resistenzüberwindenden Isolaten des *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in Zuckerrüben und Stabilität der Resistenz in Abhängigkeit von Umweltbedingungen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen, 978-3-95404-357-6, 170 p.
- Burgermeister, W.; Kastirr, U. (1993): Untersuchungen über die Vektorübertragung und Translokation beim Rizomaniavirus, DFG-Abschlussbericht, Mai 1993.
- Burgermeister, W. ; Kastirr, U. (1995): Zum Mechanismus der Übertragung von Zuckerrübenviren durch *Polymyxa betae*, DFG-Abschlussbericht, November 1995.
- Camporota, P., Bordai, V., Richard-Molard, M. (1988): Lutte biologique contre *Polymyxa betae* (Keskin) au moyen de *Trichoderma* sp. Resultats preliminaires in vivo. Agronomie 8 (3), 223-225.
- D'Ambra, V., Murro, S. (1986): Parassitismo di *Trichoderma harzianum* su cistosori die *Polymyxa betae*. J. Phytopathology 115 (1986), 61-72.
- Canova, A. (1959): Appunti di patologia della bietola. Informatore Fitopatologico 9, 390-396.
- Cao, Y., Cai, Z., Ding, Q., Li, D., Han, C., Yu, J., Liu, Y. (2002): The complete nucleotide sequence of *Beet black scorch virus* (BBSV), a new member of the genus Necrovirus. Archives of Virology, Vol 147 (12), pp. 2431-2435.
- Cai, X. M. (1988): An icosahedral virus found in sugar beet. J Xinjiang ShiHeZi Agric College (Ch) 10 (1), 73-78.
- Cai, Z.N.; Chen, Y.H.; Wu, M.S.; Cui, X. M.; Yu, J.L.; Liu, Y. (1993): Identification of pathogenic virus of beet black scorch disease and detection by synthesized cDNA probes. J. China Agric Univ. (Ch) 19 (3), 112.
- Gonzales-Vazquez, M.; Ayala, J; Garcia-Arenal, F.; Fraile, A. (2009): Occurrence of *Beet black scorch virus* Infecting Sugar Beet in Europe. Plant Disease Jan 2009, Volume 93, Number 1, 21-24.
- Hamdorf, G.; Lesemann, D.-E.; Weidemann, H.-L. (1977): Untersuchungen über die Rizomania-Krankheit an Zuckerrübe in der Bundesrepublik Deutschland. J. Phytopathol. 90, 97-103.
- Harrison, B.D. (2002): Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. Euphytica 124, 181-192.
- Heidel, G. B., Rush, C. M., Kendall, T. L., Lommel, S. A., and French, R. C. (1997): Characteristics of *beet soilborne mosaic virus*, a furo-like virus infecting sugar beet. Plant Dis. 81:1070-1076.
- Henry, C. M.; Jones, R. A. C.; Coutts, R. H. A. (1986): Occurrence of a soil-borne virus of sugar beet in England. Plant Pathology 35, 585-591.
- Hutchinson, P. J., Henry, C. M. & Coutts, R. H. A. (1992): A comparison, using dsRNA analysis, between *beet soil-borne virus* and some other tubular viruses isolated from sugar beet. Journal of General Virology 73, 1317-1320.
- Ivanovic, M.; Macfarlane, I. (1981): A tubular virus associated with infection of sugar beet by *Polymyxa betae*. Rothamst Exp Stat 1981, 190-191.
- Jiang, J.-X.; Zhang, J.-F.; Che, S.-C.; Yang, D.-J.; Yu, J.-L.; Cai, Z.-N.; Liu, Y. (1999): Transmission of *beet black scorch virus* by *Olipidium brassicae*. J. Jiangxi Agric Univ 21, 525-528.
- Lesemann, D.-E; Koenig, R.; Lindsten, K.; Henry, C. (1989): Serotypes of Beet soil-borne Furovirus from FRG and Sweden. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 19, 539-540.

- Kastirr, U., Widera, A. (1988): Erste Ergebnisse zum Vorkommen der Vektoren des Gerstengelmosaik-Virus und Rübenwurzelbärtigkeits-Virus in der DDR und deren Vermehrung an ihren Wirtspflanzen. Arch. Phytopathol. Plant Prot. 24:93–101.
- Kastirr, U.; Ehrig, F.; Schubert, J.; Proll, E. (1989): Zum Nachweis des *Beet Soil-Borne Virus* (BSBV) an Zuckerrüben in der DDR, Symposium "Recent Results in Plant Virology" Oktober 1989, Eberswalde, S.40.
- Kastirr, U.; Schmidt, K. (1990a): Wirkung von *Trichoderma*-Stämmen gegen den Befall von Zuckerrübenwurzeln durch *Polymyxa betae* Kesk. Arch. Phytopathol. u. Pflanzenschutz, Berlin 26, 1990 (5), S. 507 – 508.
- Kastirr, U.; Kleinhemperl, H.; Richter, J.; Kegler, H.; Ehrig, F.; Proll, E.; Schubert, J.; Ziegler, A.; Richter, K. (1990b): Nachweis von bodenbürtigen Viren an Zuckerrübe in der DDR. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz, Berlin 26 (4), 343-352.
- Kastirr, U. (1991): Infektion transformierter Zuckerrüben-Wurzelkulturen durch *Polymyxa betae* Kesk., Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz, Berlin 27 (4), 333-334.
- Kastirr, U., Pfeilstetter, E., Burgermeister, W. (1994): Virus content and virulence of *Polymyxa betae* Kesk. isolates obtained from different regions in Europe. J. Phytopathol. 141, 369-374.
- Kastirr, U.; Gippert, R.; Spicher, J. (1995): Erstnachweis der Rizomania an Zuckerrüben in Sachsen-Anhalt. Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst, 47, 245.
- Kastirr, U., Fomitcheva, V. (2012): Aufklärung des Rizomania-Komplexes als Beitrag zur Ethanolproduktion aus Zuckerrüben. Schlussbericht des JKI-EP (FKZ 22013608, BR 45/09 BR), 46 pp.
- Kaufmann, A., Li, Y., Koenig, R., Breyel, E., Maiss, E., Lüddecke, P., Commandeur, U. (1992): Single- and double-stranded RNAs associated with an isolate of *beet soil-borne virus*. Intervirology 33, 97-102.
- Kegler, H., Proll, E., Schmidt, H.-B., Opel, H. (1969): Evidence of *tobacco necrosis virus* in fruit trees. Phytopathologische Zeitschrift, 65 (1), 21-42.
- Keskin, B. 1964. *Polymyxa betae*. sp., ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. Archiv für Mikrobiologie. 49(4):348-374.
- Koenig, R. and Burgermeister, W. (1989): Mechanical inoculation of sugar beet roots with isolates of *Beet necrotic vein virus* having different RNA compositions. Journal of Phytopathol. 124, 249-255.
- Koenig, R., Commandeur, U., Lesemann, D.-E., Burgermeister, W., Torrance, L., Grassi, G., Alric, M., Kallerhoff, J., Schots, A. (1990): Antigenic analysis of the coat protein of *beet necrotic yellow vein virus* by means of monoclonal antibodies. J. Gen Virol 71, 2229-2232.
- Koenig, R., Jarausch, W., Li, Y., Commandeur, U., Burgermeister, W., Gehrke, M. & Lüddecke, P. (1991). Effect of recombinant *beet necrotic yellow vein virus* with different RNA compositions on mechanically inoculated sugarbeets. J Gen Virol 72 , 2243-2246.
- Koenig, R., Lüddecke, P., Haeblerle, A.M. (1995): Detection of *Beet necrotic yellow vein* variants, and mixed infections by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. Journal of General Virology 76, 2051-2055.
- Koenig, R., Commandeur, U., Loss, S., Beier, C., Kaufmann, A. and Lesemann, D.-E. (1997): *Beet soil-borne virus* RNA 2 : similarities and dissimilarities to the coat protein gene-carrying RNAs of other furoviruses. Journal of General Virology (1997), 78, 469–477.
- Koenig, R.; Pleij, C. W. A.; Beier, C.; Commandeur, U. (1998): Genome properties of *beet virus Q*, a new furo-like virus from sugar beet, determined from unpurified virus. Journal of General Virology 79, 2027-2036.
- Koenig R, Lennfors BL (2000): Molecular analyses of European A, B and P type sources of *Beet necrotic yellow vein virus* and detection of the rare P type in Kazakhstan. Archives of Virology 145(8), 1561-1570.
- Koenig R, Kastirr U, Holtschulte B, Deml G, Varrelmann M (2008a): Distribution of various types and P25 subtypes of *Beet necrotic yellow vein virus* in Germany and other European countries. Archives of Virology 153, 2139 – 2144.

- Koenig R, Ward L, Kastirr U, Budge G and Boonham N (2008b): Occurrence of two different types of RNA 5-containing *Beet necrotic yellow vein virus* in the UK and in Germany. Book of abstracts of 7th IWGPVVFV Symposium, 1.-4 September 2008, Quedlinburg, Germany, 37.
- Koenig, R.; Valizadeh, J. (2008c): Molecular and serological characterization of an Iranian isolate of *Beet black scorch virus*. Archives of Virology Jul 2008, Volume 153, Number 7, 1397-1400.
- Koenig, R., Loss, S., Specht, J., Varrelmann, M., Lüddecke, P., Deml, G. (2009): A single U/C nucleotide substitution changing alanine to valine in the *beet necrotic yellow vein virus* P25 protein promotes increased virus accumulation in roots of mechanically inoculated, partially resistant sugar beet seedlings. J. Gen. Virol. 90, 759-763.
- Kruse, M., Koenig, R., Hoffmann, A., Kaufmann, A., Commandeur, U., Solovyev, A. G., Savenkov, I., Burgermeister, W. (1994): Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of *beet necrotic yellow vein virus*. Journal of General Virology 75, pp.1835-1842.
- Lee L, Telford EB, Batten JS, Scholthof K-B G and Rush CM (2001) Complete nucleotide sequence and genome organization of *Beet soilborne mosaic virus*, a proposed member of the genus Benyvirus. Arch Virol, 146, 2443-2453.
- Lennefors, B.-L., Savenkoc, E.I., Mukasa, S.B., Valkonen, J.P.T. (2005): Sequence divergence of four soilborne sugarbeet-infecting viruses. Virus Genes 31: 57-64.
- Lin NS, Hsu YH, Hsu HT (1990): Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. Phytopathology 80, 824.
- Liu, H.-Y.; Duffus, J. E. (1988): The occurrence of a complex of viruses associated with rhizomania of sugar beet. Phytopathology 78, 1583.
- Liu, H.-Y.; Sears, J.L.; Lewellen, R. T. (2003): *Beet oak-leaf virus* - a new *Polymyxa betae* transmitted sugar beet virus in the United States. Proc. 8th Int. Congress Plant Pathology, Christchurch, New Zealand, p. 268.
- Liu, H.Y., Sears, J.L., Lewellen, R.T. (2005): Occurrence of resistance-breaking *Beet necrotic yellow vein virus* of sugar beet. Plant Dis. 89, 464-468.
- Liu H.-Y. and Lewellen R.T. (2008): Suppression of Resistance-Breaking *Beet necrotic yellow vein virus* isolates by – *Beet oak-leaf virus* in Sugar beet. Plant Disease 92, 1043-1047.
- Liu, H.-Y. and Anju, G.-S. (2011): Biological and molecular characterization of *beet oak-leaf virus*. ABSTRACTS Presented at the 2011 General Meeting of the ASSBT, Hyatt Regency Albuquerque, New Mexico, March 2 - March 5, 2011, J. of Sugar Beet Research Vol. 48, No. 1 & 2, 88.
- Merhvar, M., Bragard, C.(2009): *Beet black scorch virus* in Iran is more diverse than anywhere Phytopathology Vol. 99, no. 6, p. S84-S85.
- Montabini, P., Polverari, A. (1996): Characterization of a *tobacco necrosis virus* strain isolated from tomato leaves. Phytopathol. Medit. 35, 105-110.
- Obermeier, C.; Pfeilstetter, E.; Kastirr, U.; Lesemann, D.-E.; Burgermeister, W. (1995): Detection of *Polymyxa betae* in sugarbeet roots by molecular techniques. Schriftenreihe: Züchtungsforschung - Berichte aus der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen. 366-369.
- Pfeilstetter, E.; Lesemann, D.-E.; Kastirr, U.; Burgermeister, W. (1994): Ultrastrukturelle Untersuchungen zur Übertragung von Zuckerrübenviren (BNYVV,BSBV) durch *Polymyxa betae*. In: Laux,W.(ed.), Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, 301, 49. Deutsche Pflanzenschutztagung; Heidelberg, 26.-29.9.94, Blackwell, Berlin, 237.
- Prillwitz H and Schlosser E (1992): *Beet soil-borne virus*: occurrence, symptoms and effect on plant development. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent, 57, 295-302.
- Putz, C. (1977): Composition and structure of *beet necrotic yellow vein virus*, J. gen. Virol. 35, 397-401.
- Rush, C. M. (2003): Ecology and epidemiology of benyviruses and plasmodiophorid vectors. Annual Review of Phytopathology 41, 567-592.

- Wang, X., Cao, X., Liu, M., Zhang, R., Gao, Z., Xu, K., Li, D., Zhang, Y. (2018): Hsc70-2 is required for *Beet black scorch virus* infection through interaction with replication and capsid proteins Scientific Reports volume 8, Article number: 4526.
- Weiland, J.J.; Larson, R. L.; Freeman, T. P.; Edwards, M. C. (2006): First Report of *Beet black scorch virus* in the United States. Plant Diseases, Volume 90, Number 6, Page 828.
- Weiland, J. J.; Van Winkle, D.; Edwards, M. C.; Larson, R. L.; Shelver, W. L.; Freeman, T. P. and Liu, H.-Y. (2007): Characterization of a U.S. Isolate of *Beet black scorch virus*. *Phytopathology*, Volume 97, Number 10, 1245-1254.
- Wisler, G. C., Liu, H.-Y., and Duffus, J. E. (1994): *Beet necrotic yellow vein virus* and its relationship to eight sugar beet furo-like viruses from the United States. Plant Dis. 78, 995-1001.
- Wisler GC, Lewellen RT, Sears JL, Wasson JW, Liu H-Y and Wintermantel WM (2003): Interactions between *Beet necrotic yellow vein virus* and *Beet soilborne mosaic virus* in Sugar beet. Plant Disease 87, 1170-1175.
- Xu, J., Liu, D., Zhang, Y., Wang, Y., Han, C., Dawei Li, D., Yu, J.-L., Xian-Bing Wang, X.-B. (2016): Improved Pathogenicity of a *Beet Black Scorch Virus* Variant by Low Temperature and Co-infection with Its Satellite RNA. Front. Microbiol., <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01771>.

Dr. Ute Kastirr

Quedlinburg, den 30. 10. 2018

(Wissenschaftliche Direktorin)

„Berichte aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft“
erscheinen seit 1995 in zwangloser Folge

Seit 2008 werden sie unter neuem Namen weitergeführt:
„**Berichte aus dem Julius Kühn-Institut**“

- Heft 175, 2014 NEPTUN-Gemüsebau 2013. Dietmar Roßberg, Martin Hommes, 44 S.
- Heft 176, 2014 Rodentizidresistenz. Dr. Alexandra Esther, Karl-Heinz Berendes, Dr. Jona F. Freise, 52 S.
- Heft 177, 2014 Siebentes Nachwuchswissenschaftlerforum 2014, 26. - 28. November in Quedlinburg - Abstracts -, 57 S.
- Heft 178, 2015 Netz Vergleichsbetriebe Pflanzenschutz, Jahresbericht 2013, Analyse der Ergebnisse der Jahre 2007 bis 2013. Bearbeitet von Bernd Freier, Jörg Sellmann, Jörn Strassemeyer, Jürgen Schwarz, Bettina Klocke, Hella Kehlenbeck, Wolfgang Zornbach, 103 S.
- Heft 179, 2015 Fachgespräch: „Kupfer als Pflanzenschutzmittel“ Berlin-Dahlem, 21. November 2014. Stefan Kühne, Britta Friedrich, Peter Röhrig, 56 S.
- Heft 180, 2015 Fachgespräch: „Gesunderhaltung von Pflanzen im Ökolandbau im Spannungsfeld von Grundwerteorientierung, Innovation und regulatorischen Hemmnissen“ Berlin-Dahlem, 20. November 2014. Stefan Kühne, Britta Friedrich, Peter Röhrig, 40 S.
- Heft 181, 2015 Achstes Nachwuchswissenschaftlerforum 2015, 19. - 21. Oktober in Quedlinburg - Abstracts -, 42 S.
- Heft 182, 2015 Netz Vergleichsbetriebe Pflanzenschutz, Jahresbericht 2014, Analyse der Ergebnisse der Jahre 2007 bis 2014. Bearbeitet von Bernd Freier, Jörg Sellmann, Jörn Strassemeyer, Jürgen Schwarz, Bettina Klocke, Silke Dachbrodt-Saaydeh, Hella Kehlenbeck, Wolfgang Zornbach, 42 S.
- Heft 183, 2016 Pflanzen für die Bioökonomie – Welche Herausforderungen ergeben sich für die Qualität nachwachsender Rohstoffe? 50. Vortragstagung - Abstracts - , 94 S.
- Heft 184, 2016 23rd International Symposium of the International Scientific Centre of Fertilizers Plant nutrition and fertilizer issues for the cold climates. Bearbeitet von/ Compiled by Silvia Haneklaus, Peder Lombnæs, Ewald Schnug. Son (Norway), September 8-10, 2015, 30 S.
- Heft 185, 2016 24th International Symposium of the International Scientific Centre of Fertilizers Plant nutrition and fertilizer issues for specialty crops. Bearbeitet von/ Compiled by Silvia Haneklaus, Eduardo Rosa, Ewald Schnug. Coimbra (Portugal), September 6-8, 2016, 65 S.
- Heft 186, 2016 9th Young Scientists Meeting 2016, 9th - 11th November in Quedlinburg – Abstracts –, 2016, 59 S.
- Heft 187, 2017 Handlungsempfehlung zur Anwendung von Glyphosat im Ackerbau und der Grünlandbewirtschaftung der Bund-Länder-Expertengruppe. 11 S.
- Heft 188, 2017 2. Symposium Zierpflanzenzüchtung 13./14. März 2017 in Quedlinburg – Abstracts –, 2017, 48 S.
- Heft 189, 2017 Bericht über Erkenntnisse wissenschaftlicher Untersuchungen über mögliche direkte und indirekte Einflüsse des Pflanzenschutzes auf die Biodiversität in der Agrarlandschaft. Bearbeitet von/ Compiled by Bernd Freier, Sandra Krengel, Christine Kula, Stefan Kühne, Hella Kehlenbeck, 2017, 72 S.
- Heft 190, 2017 Schlussbericht zum Vorhaben Thema des Verbundprojektes: Untersuchung zur Epidemiologie bodenbürtiger Viren in Triticale mit dem Ziel der Entwicklung von virusresistenten Sorten mit hohen Biomasseerträgen für die Biogas- und Ethanolgewinnung. Ute Kastirr, Angelika Ziegler, 2017, 50 S.
- Heft 191, 2017 25th International Symposium of the Scientific Centre for Fertilizers “Significance of Sulfur in High-Input Cropping Systems” Groningen (Netherlands), September 5-8, 2017. Bearbeitet von/ Compiled by: Luit J. De Kok, Silvia Haneklaus, Ewald Schnug, 2017, 58 S.
- Heft 192, 2017 9th Young Scientists Meeting 2017, 6th – 7th November in Siebeldingen - Abstracts -, 2017, 80 S.
- Heft 193, 2018 Sekundäre Pflanzenstoffe – Rohstoffe, Verarbeitung und biologische Wirksamkeiten, 52. Vortragstagung, 2018, 65 S.
- Heft 194, 2018 Netz Vergleichsbetriebe Pflanzenschutz, Zwei-Jahresbericht 2015 und 2016, Analyse der Ergebnisse der Jahre 2007 bis 2016. Bearbeitet von/ Compiled by: Silke Dachbrodt-Saaydeh, Jörg Sellmann, Jörn Strassemeyer, Jürgen Schwarz, Bettina Klocke, Sandra Krengel, Hella Kehlenbeck, 2018.
- Heft 195, 2018 Abschätzung der Habitatwirkung veränderter Produktionsverfahren auf Indikatorvogelarten der Ackerbaugelände im Forschungsvorhaben „Maisanbau für hohen Ertrag und biologische Vielfalt“ am Beispiel der Feldlerche (*Alauda arvensis*). Jörg Hoffmann, Udo Wittchen, 2018, 48 S.
- Heft 196, 2018 **SPISE 7**, 7th European Workshop on Standardized Procedure for the Inspection of Sprayers in Europe Athens, Greece, September 26-28, 2018. Bearbeitet von/ Compiled by: Paolo Balsari, Hans-Joachim Wehmann, 2018, 302 S.
- Heft 197, 2018 Schlussbericht zum Vorhaben Vorkommen und Schädigung des *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) in Winterweizen. Dr. Ute Kastirr, Dr. Angelika Ziegler, 2018, 34 S.
- Heft 198, 2018 Schlussbericht zum Vorhaben Monitoring zum Vorkommen bodenbürtiger Viren in Weizen, Triticale und Roggen in den wichtigsten Getreideanbaugeländen Deutschlands. Dr. Ute Kastirr, Dr. Angelika Ziegler, Dr. Annette Niehl, 2018, 58 S.
- Heft 199, 2018 NEPTUN-Gemüsebau 2017. Dietmar Roßberg, Martin Hommes, 2018, 42 S.
- Heft 200, 2018 11th Young Scientists Meeting 2018, 14th – 16th November in Braunschweig, - Abstracts -, 86 S.

