

Bearbeitet von/ Compiled by:
Ute Kastirr, Angelika Ziegler

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**



Berichte aus dem Julius Kühn-Institut

190

Kontaktadresse

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

Telefon + 49 3946 47-0
Telefax + 49 3946 47-500
E-Mail: ep@julius-kuehn.de

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:
<https://www.julius-kuehn.de/publikationsreihen-des-jki/> -> Berichte aus dem Julius Kühn-Institut.

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 <https://www.julius-kuehn.de/en/jki-publication-series/> -> Reports from the Julius Kühn Institute.

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

ISSN 1866-590X

DOI 10.5073/berjki.2017.190.000



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons – Namensnennung – Weitergabe unter gleichen Bedingungen – 4.0 Lizenz.

This work is licensed under a Creative Commons – Attribution – ShareAlike – 4.0 license.

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

Teilvorhaben 1:

Untersuchung zur Epidemiologie bodenbürtiger Viren in Triticale

Zuwendungsempfänger und ausführende Stelle:

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

Förderkennzeichen:

22019311

Laufzeit:

01. 03. 2012 bis 31. 03. 2016

Monat der Erstellung:

August 2016

Datum der Veröffentlichung:

23. 05. 2017

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Untersuchung zur Epidemiologie bodenbürtiger Viren in Triticale mit dem Ziel der
Entwicklung von virusresistenten Sorten mit hohen Biomasseerträgen für die
Biogas- und Ethanolgewinnung

Teilvorhaben 1: Untersuchung zur Epidemiologie bodenbürtiger Viren in Triticale

Abschlussbericht vorgelegt von:

Ute Kastir

Angelika Ziegler

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	5
I. Ziele des Forschungsvorhabens	6
1. Aufgabenstellung	6
2. Stand der Technik	9
3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	10
II. Ergebnisse	11
1. Erzielte Ergebnisse	11
1.1. AP1: Erfassung des Virusspektrums an unterschiedlichen Triticale-Genotypen in definierten Befallsstandorten mittels RT-PCR	11
1.1.1. Nachweis von <i>Polymyxa</i> und der Viren aus Bodenproben	11
1.1.2. Virusnachweis aus Pflanzenproben	12
1.1.3. Nachweis und Differenzierung des <i>Soil-borne wheat mosaic virus</i> (SBWMV) in Deutschland	13
1.1.4. Charakterisierung von Isolaten des <i>Wheat spindle streak mosaic virus</i> (WSSMV)	16
1.1.5. Nachweis verschiedener Typen des <i>Soil-borne cereal mosaic virus</i> (SBCMV)	18
1.2. AP2: Differenzierung des Spektrums von <i>Polymyxa graminis</i> an Triticale und anderen Getreidearten mittels PCR	19
1.2.1. Differenzierung der <i>P. graminis</i> formae speciales	19
1.2.2. Verbreitung der <i>P. graminis</i> formae speciales in Verbindung mit dem Virusauftretens	21
1.3. AP3: Quantitative Bewertung der Infektion von Triticale durch Pathogenpopulationen an unterschiedlichen Befallsstandorten mittels Real-Time qPCR	26
1.3.1. Optimierung der Real-Time qPCR für die Quantifizierung bodenbürtiger Getreideviren und deren Vektorspezies	26
1.3.2. Quantifizierung der Virusinfektion in Triticale-Sorten und -Zuchtlinien	28
1.4. AP4: Untersuchung der Befallsintensität von Triticale-Genotypen mittels ELISA an unterschiedlichen Standorten	31
1.4.1. Resistenzreaktionen von Triticale gegen das SBWMV-NY unter Gewächshausbedingungen	32
1.4.2. Bewertung der Resistenz von Triticale gegen bodenbürtige Viren in verschiedenen Umwelten	33
1.4.3. Bewertung des Europäischen Triticale-Sortiments auf Resistenz gegen bodenbürtige Viren	34
1.4.4. Bewertung der Resistenzsituation gegen bodenbürtige Viren in Triticale	37
2. Verwertung	38
2.1. Wissenschaftlich-technischer Nutzen	38
2.2. Wissenschaftlich-technische Erfolgsaussichten	40
3. Erkenntnisse von Dritten	40

4. Veröffentlichungen
- III. Literaturverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Institutionen

JKI Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
 PZO Pflanzenzucht Oberlimpurg

Getreidekulturen

Di Dinkel
 DW Durumweizen
 WG Wintergerste
 WR Winterroggen
 WT Wintertriticale
 WW Winterweizen
 BBCH-Code zitiert das Entwicklungsstadium der Pflanze, benannt nach den ursprünglich beteiligten Organisationen, nämlich der **B**iologischen Bundesanstalt, dem **B**undessortenamt sowie für die **chemische** Industrie dem Industrieverband

Pathogene

BaMMV *Barley mild mosaic virus*
 BaYMV *Barley yellow mosaic virus*
 SBCMV *Soil-borne cereal mosaic virus*
 SBWMV *Soil-borne wheat mosaic virus*
 SBWMV-N SBWMV-Stamm Nebraska
 SBWMV-NY SBWMV-Stamm New York
 WSSMV
 "type strain" typischer Vertreter der Virusgruppe
Polymyxa graminis formae speciales
 Ribotyp I - *temperata*
 Ribotyp II - *tepida*
 f. sp. formae speciales
 wpi 'week post inoculation' - Wochen nach der Inokulation

serologischer Virusnachweis

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

Molekularbiologische Nachweisverfahren

RT-PCR Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
 Real-Time qPCR quantitative Echtzeit-PCR
 FAM-Sonde Fluorescein-Farbstoff-Sonde
 SYBR Green I asymmetrischer Cyanin-Farbstoff
 DNS Desoxyribonukleinsäure
 cDNS komplementäre Desoxyribonukleinsäure
 RNS Ribonukleinsäure
 E.coli *Escherichia coli*

<u>Tabellenverzeichnis</u>	14
Tabelle 1: Primer für die konventionelle PCR für den Virusnachweis	23
Tabelle 2: Nachweis der SBWMV-NY-Infektion von Winterweizen in unterschiedlichen Böden der südöstlichen Befallsstandorte Schleswig-Holsteins	23
Tabelle 3: Nachweis von Pathogen-Kombinationen in einzelnen Feldpflanzen	24
Tabelle 4: Vorkommen von <i>Polymyxa graminis</i> - Ribotypen in Bodenproben verschiedener Befallsregionen	25
Tabelle 5: Vorkommen von <i>Polymyxa graminis</i> - f.sp. in verschiedenen Regionen Deutschlands und Europas	33
Tabelle 6: Polyklonale Antiseren zum Nachweis bodenbürtiger Viren	33
Tabelle 7: Resistenzreaktionen von Getreidearten eines Differentialsortiments in verschiedenen Umwelten	35
Tabelle 8: Resistenzreaktionen von Triticale-Sorten des Europäischen Sortiments gegen SBWMV-N, SBCMV und WSSMV in 2012	36
Tabelle 9: Bewertung der Resistenz von Triticale-Sorten gegen bodenbürtige Viren mittels DAS-ELISA	
 <u>Abbildungsverzeichnis</u>	 11
Abbildung 1: Nachweis von <i>Polymyxa graminis</i> in Boden- und Wurzelproben	12
Abbildung 2: SBCMV-Nachweis mit Primern SBCfor RNS2 und SBCre RNS2	14
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Darstellung von stäbchenförmigen Partikeln mit Zentralkanal des SBWMV-NY	15
Abbildung 4: Auftreten des SBWMV-N und des SBWMV-NY in Deutschland	16
Abbildung 5: Phylogenetische Analyse der SBWMV-Sequenzen	17
Abbildung 6: Partielle Aminosäuresequenzen von verschiedenen Isolaten des WSSMV	17
Abbildung 7: Geografische Verteilung der Sequenzvarianten des WSSMV	18
Abbildung 8: Geografische Verteilung der Sequenzvarianten des SBCMV	19
Abbildung 9: Phylogenetische Analyse der partiellen SBCMV-Sequenzen	20
Abbildung 10: Beschriebene Ribotypen bzw. formae speciales von <i>Polymyxa graminis</i>	21
Abbildung 11: Vergleich der nachgewiesenen <i>Polymyxa graminis</i> Sequenzen	22
Abbildung 12: <i>Polymyxa graminis</i> - Lebenszyklus nach Kanyuka et al., 2003	26
Abbildung 13: qPCR Nachweis von <i>Polymyxa graminis</i> f.sp. <i>temperata</i> in Weizenwurzeln	27
Abbildung 14: Einsatz der FAM-Sonde für den Nachweis WSSMV-infizierter Proben	28
Abbildung 15: Verdünnungsreihe (8800 pg/µl bis 0,0088 pg/µl) der Standard-DNS für WSSMV	28
Abbildung 16: Standardkurve zur Quantifizierung von viraler RNS	28
Abbildung 17: WSSMV-Nachweis in Feldproben mittels qRT-PCR	29
Abbildung 18: WSSMV-Kopien in RNS-Extrakten aus Feldproben und korrespondierenden ELISA-Werte	30
Abbildung 19: SBCMV RNS-Konzentration (pg/ 90ng Gesamt-RNS) in Feldproben	30
Abbildung 20: Quantitative Bewertung der Infektion von Triticale-Material mit SBCMV und WSSMV (Feldversuch Gödnitz 2013/14)	31
Abbildung 21: Versuchsfelder in Regionen mit unterschiedlicher Viruskontamination	32
Abbildung 22: Nachweis von Resistenzreaktionen ausgewählter Triticale-Sorten/ -Zuchtlinien in Wurzel (Wu), Stängel (St) und Blatt (Bl) 4, 8 und 12 Wochen nach Aussaat	37
Abbildung 23: Gruppierung der Stärke der Virusinfektion in Triticale-Sorten und -Zuchtlinien	

I. Ziele des Forschungsvorhabens

Triticale besitzt ein hohes Ertragspotential und stellt somit eine potentielle Pflanzenart für die effiziente Produktion von Ausgangssubstrat für die Gewinnung von Bioethanol und Biogas dar (Senn, 2010). Das Gesamtziel des Forschungsvorhabens war die Schaffung von Grundlagen für die Züchtung von leistungsstarken Triticale-Sorten auf Standorten mit bodenbürtigen Viren als Alternative zu Mais.

In vielen Kulturregionen wird der Triticaleanbau durch bodenbürtige Viren gefährdet. Für eine Nutzung von Triticale als nachwachsenden Rohstoff ist jedoch die Pflanzengesundheit von großer Bedeutung.

Das Vorhaben zielte auf die Aufklärung der Epidemiologie bodenbürtiger Viren in Triticale und die Schaffung von Grundlagen für die Züchtung von leistungsstarken Energiepflanzen der Getreideart Triticale für Standorte mit bodenbürtigen Viren ab. Die Ergebnisse des Projekts leisten für das BMEL Entscheidungshilfe für die Entwicklung von Maßnahmen zur Sicherung der Inwirtschafthaltung von Anbauflächen in Befallsgebieten und für den Triticaleanbau zur Produktion nachwachsender Rohstoffe.

Die Aufgaben des Forschungsvorhabens wurden als Verbundprojekt vom Wissenschaftspartner des Julius Kühn-Instituts und dem Wirtschaftspartner Pflanzenzucht Oberlimpurg in zwei Teilprojekten bearbeitet.

Das JKI stellt sich die Aufgabe, Aspekte der Epidemiologie von bodenbürtigen Viren und deren Plasmodiophorid-Vektoren der Art *Polymyxa graminis* in Triticale aufzuklären und damit die Entwicklung virusresistenter Sorten zu unterstützen.

1. Aufgabenstellung

Aufgaben

Im Rahmen der Zielstellung des Forschungsvorhabens wurden für das Teilvorhaben 1: 'Untersuchungen zur Epidemiologie bodenbürtiger Viren in Triticale' folgende Arbeitspakete (AP) formuliert:

1.1. *Charakterisierung von Virus-Vektor-Pathogenpopulationen hinsichtlich ihrer Aggressivität und der Effizienz der Virusübertragung*

AP 1: Erfassung des Virusspektrums an unterschiedlichen Triticale-Genotypen in definierten Befallsstandorten mittels RT-PCR zur Erfassung der Variabilität von Resistenzreaktionen von Triticale gegen bodenbürtige Viren

AP 2: Differenzierung des Spektrums von *P. graminis* an Triticale und anderen Getreidearten mittels PCR

AP 3: Quantitative Bewertung der Infektion von Triticale durch bodenbürtige Viren

an unterschiedlichen Befallsstandorten mittels Real-Time qPCR

1.2. Phänotypisierung des Virusbefalls in Triticale-Ressourcen

AP 4: Untersuchung der Befallsintensität von Triticale-Genotypen mittels ELISA an unterschiedlichen Standorten, die in ihrer Viruskontamination variieren und die Erfassung der Schadwirkung einzelner Viruskomponenten erlauben (SBWMV am Standort Heddesheim, SBCMV am Standort Eickeloh, WSSMV am Standort Schleesen und SBCMV und WSSMV als Mischkontamination am Standort Gödnitz).

Planung des Vorhabens

Der Wissenschaftspartner plante für das erste Projektjahr die Charakterisierung der Virus-Vektor-Populationen unterschiedlicher Befallsstandorte, die Entwicklung der Real-Time PCR-Methode für den Nachweis der Virus-Vektor-Komplexe und das Resistenzscreening in unterschiedlichen Triticale-Genotypen.

Im zweiten Projektjahr sollte die Etablierung der Real-Time qPCR abgeschlossen werden, eine quantitative Resistenzbewertung an ausgewählten Triticale-Genotypen erfolgen und die Resistenzprüfung fortgesetzt werden.

Im dritten Projektjahr war die Bewertung neuer Zuchtlinien unter Infektionsbedingungen verschiedener Umwelten, die Quantifizierung der Virusinfektion in aussichtsreichen Triticale-Linien und die abschließende Charakterisierung der bodenbürtigen Viren und deren Vektoren in Triticale geplant.

Meilenstein	Zielstellung	Termin
M 1-1	Charakterisierung der Virus-Vektor-Populationen unterschiedlicher Befallsstandorte	Aug. 2012
M 1-2	Vorscreening auf Virusresistenz/-toleranz ausgewählter Triticale-Genotypen	Aug. 2012
M 1-3	Etablierung von Real-Time PCR Nachweismethoden für bodenbürtige Viren und deren pilzliche Vektoren	Dez. 2013
M 1-4	Bewertung der Resistenz von Triticale gegen bodenbürtige Viren	Dez. 2014

Ablauf des Vorhabens

Das Spektrum der an Triticale auftretenden bodenbürtigen Viren wurde an ausgewählten Genotypen im Verlaufe der Vegetation an 4 Befallsstandorten erfasst und mittels Multiplex RT-PCR für die drei Viren analysiert. Die aus den Pflanzen- und Bodenproben isolierten *P. graminis*-Populationen wurden hinsichtlich des Auftretens bestimmter Subspecies mittels RT-PCR analysiert.

Die Resistenz von Triticale-Genotypen gegen bodenbürtige Viren wurde anhand der Viruskonzentration mittels Real-Time qPCR verglichen. Für die Quantifizierung des Virus- und Vektorbefalls wurde die Real-Time PCR-Methode für die entsprechenden Virus-Vektor-Komplexe (WSSMV-, SBCMV- und SBWMV- und *P. graminis*) einzeln etabliert.

In die Selektion auf Resistenz unterschiedlicher Triticale-Herkünfte gegen bodenbürtige Viren wurden randomisierte Feldversuche in 2 Wiederholungen an 4 Befallsstandorten, die durch unterschiedliche Viruskontaminationen geprägt sind (Gödnitz-SBCMV und WSSMV, Eickeloh-SBCMV, Schleesen-WSSMV, Heddesheim-SBWMV), angelegt. Die Resistenzbewertung erfolgte an unterschiedlichen Materialgruppen wie ein Europäisches Sortiment und aktuelle Zuchtlinien. Die Befallsintensität der Viren wurde separat und in Mischkontamination erfasst. Die Virusinfektion wurde in den Blättern mittels DAS-ELISA durch Messung der Virustiter (Extinktionswerte bei 405 nm Wellenlänge) bewertet.

Die Verifizierung der in den ersten beiden Versuchsjahren erzielten Ergebnisse und die Erfüllung der Ziele für das dritte Versuchsjahr wurden durch nicht beeinflussbare Umweltbedingungen stark beeinträchtigt.

Die Aussaat am WSSMV-Standort Schleesen wurde fast komplett durch Wildschaden vernichtet und konnte nicht bewertet werden. Am SBWMV-N - Standort Heddesheim konnte wegen stauender Nässe im Feld die Aussaat erst am 19. Dezember 2013 durchgeführt werden. Sowohl die verspätete Aussaat als auch die weiter anhaltende Staunässe im Frühjahr beeinträchtigten die Pflanzenentwicklung so stark, dass sich keine bewertbaren Pflanzen entwickelten. Der Standort für das SBWMV-NY im Norden Deutschlands zeigte deutliche Auswinterungsschäden. Somit konnte die epidemiologische Untersuchung der Schadwirkung bodenbürtiger Viren in Triticale und die phänotypische Erfassung der Virusresistenz in Triticale-Sorten und -Zuchtlinien nur unvollständig durchgeführt werden und vergleichende Analysen zwischen den ausgewählten Pathogenpopulationen waren sehr schwierig bzw. nicht möglich.

Aus diesen Gründen wurde es unbedingt notwendig, die ausgefallenen Feldversuche in einem weiteren Projektjahr erneut anzulegen und zu bewerten, um die Charakterisierung der Pathogenpopulationen und die Resistenzbewertung des Zuchtmaterials absichern zu können.

Deshalb wurde vom Projektträger eine kostengebundene Verlängerung des Vorhabens um ein Jahr (bis zum 29.02.2016) und eine kostenneutrale Verlängerung des wissenschaftlichen Mitarbeiters (bis 31.03.2016) bewilligt.

2. Stand der Technik

Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den das Vorhaben angeknüpfte

Der Wintertriticale-Anbau wird in Deutschland durch Befall mit den Furoviren *Soil-borne cereal mosaic virus* (SBCMV) und *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) mit den Virusstämmen Nebraska (N) und New York (NY) sowie mit dem Bymovirus *Wheat spindle streak mosaic virus* (WSSMV) sehr stark geschädigt. Vorrangig in Niedersachsen, Sachsen-Anhalt und Sachsen kommt es großflächig auf den leichten Böden der typischen Roggen- und Triticaleanbauggebiete zu Kornertragsminderungen bis zu 70% bei Roggen (für Triticale sind noch keine Zahlen bekannt). In Schleswig-Holstein und Mecklenburg-Vorpommern wurden ebenfalls Befallsregionen dokumentiert.

Zur Resistenz von Triticale gegen bodenbürtige Viren gab es nur wenige internationale und nationale Arbeiten, die auf widerstandsfähige Genotypen hinweisen. Im Rahmen vorhergehender Forschungsvorhaben wurden in Deutschland ausgewählte Triticale in die Resistenzprüfung einbezogen (Kastirr et al., 2005 a, b). In diesen Sorten konnten keine Resistenzen festgestellt werden. Im Zuge eines GFP-Forschungsprojekts wurden an der Landessaatzuchtanstalt der Universität Hohenheim Untersuchungen zur Genetik der Resistenz von Triticale gegen bodenbürtige Viren durchgeführt (Bauer, 2008). Über 200 Triticale-Herkünfte wurden mittels mechanischer Blatinokulation unter Gewächshausbedingungen auf Virus-Resistenz getestet. Alle Herkünfte waren anfällig für das SBCMV. Da die Resistenz gegen die Furoviren jedoch auf der Verhinderung der Ausbreitung des Virus aus den Wurzeln in die oberirdischen Pflanzenteile beruht (Translokationsresistenz; Huth et al., 2007), ist die mechanische Blatinokulation kein geeignetes Selektionsverfahren für SBCMV-Resistenz in Getreide.

Für das Bymovirus WSSMV wurden einige WSSMV-resistente Genotypen gefunden. Für Nachkommenschaften aus 4 putativ resistenten und 4 anfälligen Sorten wiesen die Spaltungsergebnisse nach mechanischer Inokulation auf unterschiedliche mögliche Erbgänge hin. Unter Feldbedingungen wurden jedoch alle Kreuzungseltern mit dem WSSMV infiziert.

Das Forschungsvorhaben sollte die Resistenzzüchtung gegen bodenbürtige Viren in Triticale unterstützen. Durch die Beobachtung unterschiedlicher Triticale-Formen unter dem Einfluss verschiedener Pathogen-Populationen an unterschiedlichen Befallsstandorten werden Resistenzreaktionen erfasst und analysiert sowie Resistenzquellen gesucht. In ersten Vorversuchen in Heddesheim und Gödnitz wurden sehr deutliche Unterschiede in der Symptomausprägung nach einer Virusinfektion bei verschiedenen Triticale-Herkünften beobachtet.

Im Rahmen internationaler und eigener Forschungsvorhaben wurden bisher spezifische Methoden zur Diagnose und Differenzierung der bodenbürtigen Viren und des Vektors *P. graminis* erarbeitet. Für die serologische Diagnose der Viren wurden spezifische Antiseren hergestellt (z.B. Carroll et al., 1995; Mutasa-Gottgens et al., 2000; Rabenstein et al., 2005). Für PCR-Techniken zum Virusnachweis wurden verschiedene Primer vorgeschlagen, die bei der konventionellen und der Multiplex RT-PCR (Deb und Anderson, 2008; Fomitcheva et al., 2008) sowie der quantitativen RT-PCR (Vaianopolous et al., 2009; Ratti et al., 2004) zum Einsatz kommen. Auch zum Nachweis des Plasmodiophoriden *P. graminis* wurden molekularbiologische Techniken etabliert (Obermeier et al., 1995; Delfosse et al., 2000).

Stellungnahme zur Patentsituation

Es liegen keine Patente vor und es ist nicht beabsichtigt, eigene Schutz- und Patentrechte zu erheben.

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Mit dem Ziel der Charakterisierung aktueller Pathogenpopulationen und deren Einbeziehung in die Resistenzprüfung bei Triticale erfolgte eine Zusammenarbeit mit der Landwirtschaftskammer Schleswig-Holstein und der Landesanstalt für Landwirtschaft und Gartenbau Sachsen-Anhalt. Im Rahmen der allgemeinen Schaderregerüberwachung beobachteten die Pflanzenschutzdienste beider Einrichtungen das Vorkommen bodenbürtiger Viren, die durch den Wissenschaftspartner des Forschungsvorhabens charakterisiert wurden.

II. Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

Wissenschaftliche Ergebnisse des Vorhabens

1.1. AP1: Erfassung des Virusspektrums an unterschiedlichen Triticale-Genotypen in definierten Befallsstandorten mittels RT-PCR

1.1.1. Nachweis von *Polymyxa* und den Viren aus Bodenproben

Es wurden Protokolle für die Extraktion von Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Ribonukleinsäure (RNS) aus Bodenproben (Boden mit den enthaltenen organischen Resten) erarbeitet. Bei der Präparation der Gesamt-DNS war es wichtig, verbleibende Huminsäuren zu entfernen, um eine Inhibition der anschließenden PCR zu verhindern. Dies wurde durch Reinigung der DNS über eine Säule erreicht. Für die Extraktion der Gesamt-RNS aus Boden erwies sich das FastRNA ProSoil Direct-Kit (MP) als am besten geeignet.

Da zu erwarten war, dass virushaltige *Polymyxa*-Dauersporen oder virushaltige organische Reste nicht gleichmäßig im Boden verteilt sind, wurden die Bodenproben von verschiedenen Stellen eines Feldes genommen sowie die Extraktionen aus Boden und die RT-PCR immer in mehreren Wiederholungen durchgeführt. *P. graminis* konnte in der Gesamt-DNS aller getesteten Bodenproben nachgewiesen werden (Abb. 1).

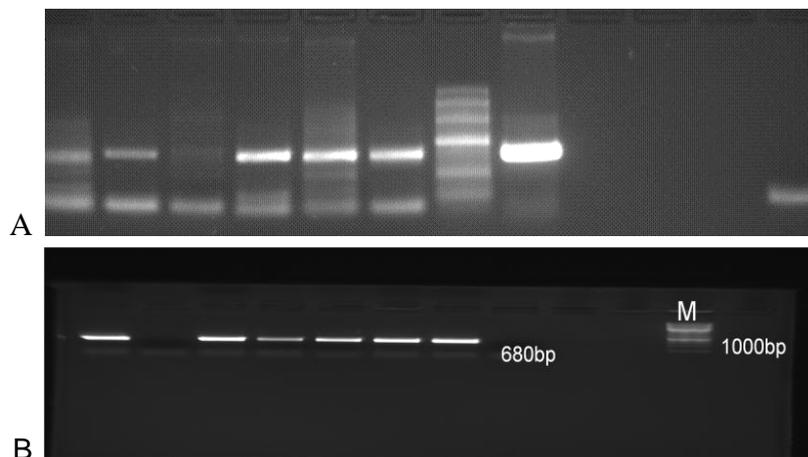


Abbildung 1: Nachweis von Furoviren und *Polymyxa graminis* in Boden- und Wurzelproben
A: *P. graminis*-Detektion: v.l.: 2x Eickeloh, 2x Heddesheim, 2x Gödnitz, Amplikon mit 978 bp, Marker, Positivkontrolle Walternienburg, rechts: Negativkontrolle (Wasser)
B: SBWMV- Detektion aus Wurzelproben von Heddesheim

Auch der Nachweis von Furoviren in aus Boden gewonnener Gesamt-RNS verlief erfolgreich. Wie Abbildung 2 zeigt, ließ sich das SBCMV aus Erde vom Befallsstandort Walternienburg sicher nachweisen.

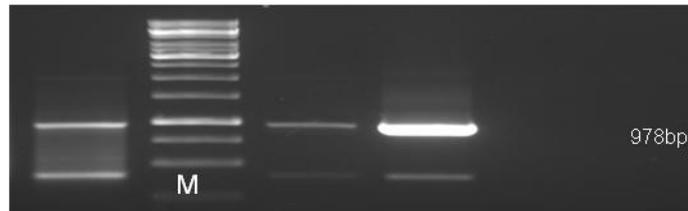


Abbildung 2: SBCMV-Nachweis mit Primern SBCfor RNS 2 und SBCre RNS 2 (978 Basenpaare) v.l. Walternienburg, Marker, Walternienburg, Positivkontrolle, Stöffin, Negativkontrolle (Wasser)

Das WSSMV ließ sich in Gesamt-RNS aus Boden nicht nachweisen, auch nicht für Flächen mit nachgewiesenem starkem WSSMV-Vorkommen. Die Menge Virus-RNS, die aus Boden isoliert werden konnte, war wahrscheinlich nicht ausreichend.

Sowohl für Furo- als auch Bymoviren lässt sich sagen, dass die Virus-RNS aus den Bodenproben sicher eher aus Pflanzenresten als aus *P. graminis*-Dauersporen stammte. Es ist auch noch nicht abschließend geklärt, in welcher Form die Viren in den *P. graminis* Dauersporen vorliegen, ob als Viruspartikel oder als Ribonukleoproteid. Driskel et al. (2004) haben z. B. gezeigt, dass das SBWMV movement protein und die RNS sowie das WSSMV Hüllprotein sich innerhalb der Dauersporen nachweisen lassen. Merz fand (1995) PMTV-ähnliche Partikeln in Dauersporen von *S. subterranea*.

1.1.2. Virusnachweis aus Pflanzenproben

Unter Nutzung der Erfahrungen aus vorhergehenden Projekten sowie aus der Literatur (siehe Anhang) wurden die Methoden zur RNS-Isolation aus Pflanzenmaterial, für die komplementäre cDNS-Synthese und die konventionelle PCR optimiert und angepasst.

Um die Extraktion von RNS aus Pflanzenmaterial möglichst effektiv zu gestalten, wurde ein Teil des Presssaftes, der zur Durchführung der ELISA Tests gewonnen wurde, abgenommen und zur Gewinnung der Gesamt-RNS verwendet. Das für ELISA und qPCR eingesetzte Ausgangsmaterial stammt also von derselben Probe.

Für den Aufschluss der Proben und die Gewinnung der Gesamt-RNS wurde RNA tri-liquid (Bio&Sell, Feucht) verwendet; eine schnelle und sichere RNS-Präparation wird dadurch gewährleistet. Wir haben außerdem festgestellt, dass mit RNA tri-liquid versetzter Presssaft für eine spätere Aufarbeitung eingefroren werden kann, ohne dass mit einem Abbau der RNS gerechnet werden muss. Somit gibt es keine Probleme, wenn große Probenzahlen über einen kurzen Zeitraum anfallen.

Das Virusspektrum wurde an den Befallsstandorten kontinuierlich durch konventionelle PCR erfasst. Die PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert, um die Pathogen-Sequenzen miteinander sowie mit Sequenzen aus Datenbanken vergleichen zu können.

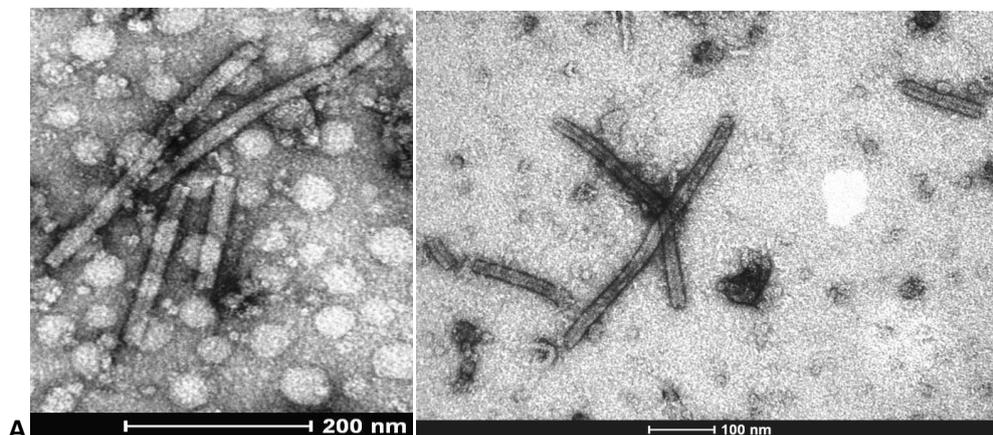
Die Ergebnisse sind im Folgenden für die verschiedenen Pathogene aufgezeigt.

1.1.3. Nachweis und Differenzierung des *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) in Deutschland

Bei der Untersuchung von Winterweizen-Proben von Standorten in Schleswig-Holstein auf Virusbefall mittels ELISA, RT-PCR und Immun-Elektronenmikroskopie wurde in mehreren Feldern der Region Cashagen Mitte Mai 2012 das SBWMV festgestellt.

Bisher war nur der Nebraska-Stamm des SBWMV in Deutschland am Standort Heddesheim in Baden-Württemberg bekannt (Koenig et al., 2003).

Deshalb erfolgte eine detaillierte Untersuchung der befallenen Pflanzen aus Schleswig-Holstein (Kastirr et al., 2012). Die immunelektronenmikroskopische Identifizierung des SBWMV durch spezifische Markierung der Viruspartikel aus infizierten Blättern von Feldpflanzen der Sorte *Primus* zeigte stäbchenförmige Viruspartikel mit Zentralkanal mit zwei Partikel-Längen. In den Blattsaftpräparaten wurden Virionen im Längenbereich von 125 nm bis 175 nm und von 200 nm bis 340 nm beobachtet (Abb. 3A). Für die Identifizierung der Partikel wurde eine Dekoration mit dem spezifischen mAK 4G4 vorgenommen (Abb. 3B) und eine Immunogold-Markierung durchgeführt (Abb. 3C).



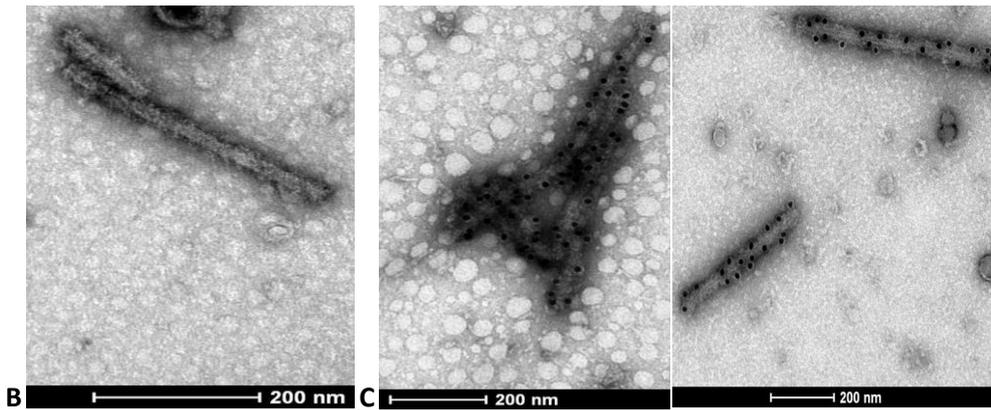


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Darstellung von stäbchenförmigen Partikeln mit Zentralkanal des SBWMV-NY aus infizierten Blättern von Feldpflanzen der Weizensorte *Primus*
A-undekorierte stäbchenförmige Partikel mit Zentralkanal mit zwei unterschiedlichen Längen (kleine Virionen von ca. 125 nm-175 nm, große Virionen von 200 nm-340 nm), **B**- dekorierte Partikel nach Anwendung der ISEM-Technik mit dem SBWMV spezifischen mAK 4G4, **C**- Immunogold-Markierung mit mAK 4G4

Weiterhin wurde ein Abschnitt des Virus-Genoms, der das Hüllprotein und einen Teil des sogenannten „read-through“ Proteins umfasst, kloniert und sequenziert (Tab. 1 zeigt die verwendeten Primer).

Ein Vergleich mit den Sequenzen vom Standort Heddesheim zeigte, dass in Schleswig-Holstein ein anderer, nämlich der New York Stamm des SBWMV auftritt (Abb. 4). Die SBWMV-NY Sequenzen wurden bei GenBank eingereicht und sind unter den Accession-Nummern JX468081 und JX468082 abrufbar (siehe Anhang und Verzeichnis der Veröffentlichungen).

Tabelle 1: Primer für die konventionelle PCR für den Virus-Nachweis (Fomitcheva et al., 2008)

SBCMV	sense	SBCMVfor_RNA2	ACTTACCCATTTAGGTGTAA
	antisense	SBCMVrev_RNA2	TTATAATCACGCAAGTACCT
SBWMV	sense	PGRV4a	CTGCGACTCACGCTTACATA
	antisense	PGRV4b	TAACCGCTTTGGGATGATAG
WSSMV	sense	7a	CAACCGTTTTCTCAGCACTT
	antisense	7b	GCTTTCTCATTCCAACCTATCG

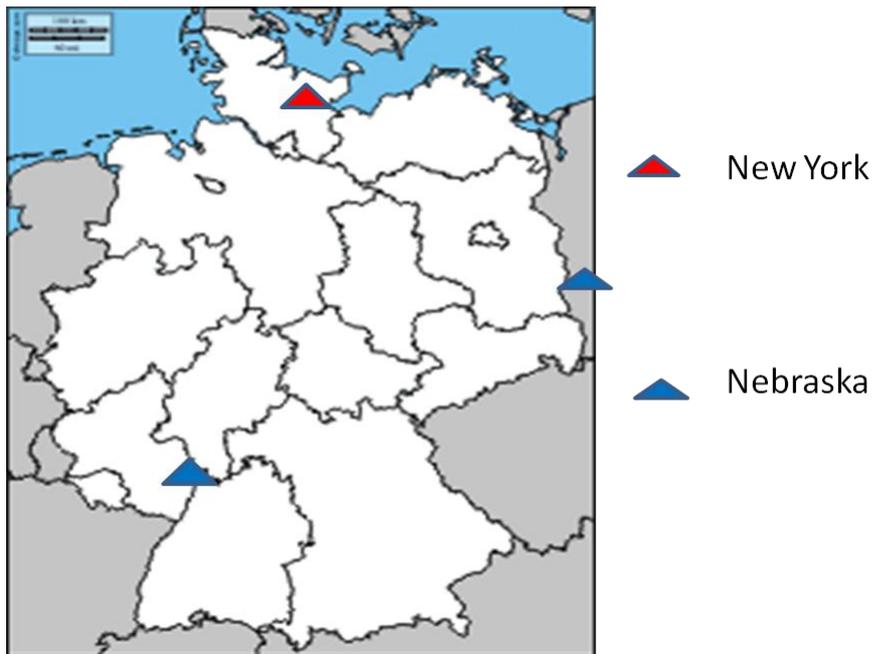


Abbildung 4: Auftreten des SBWMV-Nebraska und des SBWMV-New York in Deutschland und Polen

Für den Standort Heddeshheim wurden die Weizensorten MUSIK und MIRAGE sowie die Wintergerste *Muju covered 2* untersucht. Aminosäure-Substitutionen im Hüllprotein eines Virus können sich auf die Symptom-Expression auswirken, desweiteren sind Auswirkungen auf die Interaktion zwischen Virus und Vektor möglich. Ein PCR-Produkt, welches das Hüllprotein sowie einen Teil des sogenannten read-through Proteins des SBWMV umfasst (Nukleotide 386-967 der genomischen RNA 2 des SBWMV) wurde gewonnen, kloniert und sequenziert.

Ein Vergleich der Isolate durch phylogenetische Analyse (Abb. 5) zeigt, dass keine Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz zwischen den SBWMV-Sequenzen aus Weizen, Gerste sowie der ursprünglich von Koenig et al. (2003) publizierte Sequenz für SBWMV De (Nebraska-Stamm des SBWMV) bestehen. Das ist besonders interessant, da es wahrscheinlich das „read-through“ Protein ist, welches mit *P. graminis* interagieren muss, damit das Virus übertragen wird.

Das SBWMV-N wurde 2003 in Heddeshheim (Koenig und Huth, 2003) und im Jahre 2010 in Westpolen (Trzmiel et al., 2012) nachgewiesen. In Westerrade (Cashagen, Schleswig-Holstein) konnten wir den New York-Stamm des SBWMV in Deutschland erstmals nachweisen (Ziegler et al., 2012, 2013). Es muss demnach mindestens zwei unabhängige Einschleppungsereignisse des SBWMV nach Deutschland gegeben haben. Über ein weiter verbreitetes Auftreten des SBWMV in Deutschland können wir noch keine Angaben machen. Das Auftreten des SBWMV in Westpolen ist jedoch ein Hinweis darauf, dass auch andere

Standorte in Deutschland und Europa betroffen sein könnten. Ein zukünftiges Monitoring sollte über die SBWMV-Verbreitung Aufschluss geben.

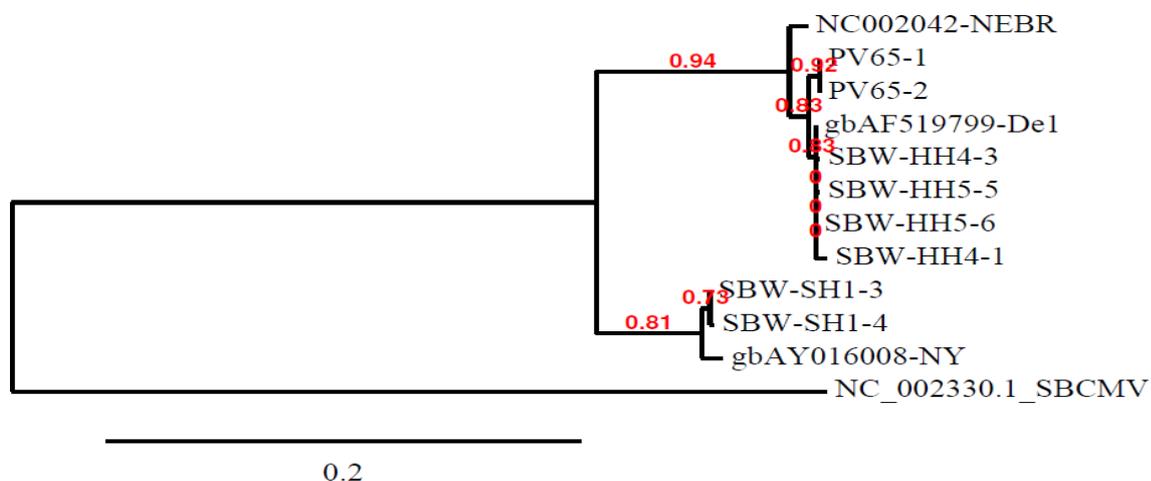


Abbildung 5: Phylogenetische Analyse der SBWMV Sequenzen. Die Nebraska- und New York-Gruppe sind deutlich erkennbar. SBW-HH 4-3/1 - von Wintergerste und SBW HH 5-5/6 - von Winterweizen sind identisch mit dem SBW-De 1- Isolat.

1.1.4. Charakterisierung von Isolaten des *Wheat spindle streak mosaic virus* (WSSMV)

An den Versuchsstandorten Gödnitz und Schleesen ist das WSSMV vertreten, in Schleesen ausschließlich und in Gödnitz gemeinsam mit dem SBCMV. Vom WSSMV sind noch keine vollständigen Sequenzdaten in Datenbanken hinterlegt; nur die 4646 Nukleotide der 3' Hälfte der RNS1 (Sohn et al., 1994) können eingesehen werden. Wir haben diese Sequenzinformation um 253 Nukleotide der 5' Hälfte der RNS1 erweitern können. Die Sequenz für einen Teil des Polyproteins wurde unter Accession Nummer KJ609243 in der NCBI Datenbank hinterlegt. Aufgrund der Homologie zum eng verwandten Virus *Wheat yellow mosaic virus* (WYMV), welches in Asien verbreitet ist, kann geschlussfolgert werden, dass die von uns analysierte WSSMV-Sequenz für das Protein 7K (6K2) und einen Teil des CI-Proteins kodiert.

WSSMV 6K2 Proteinsequenz

Bei der Analyse von WSSMV-Sequenzen unterschiedlicher Herkunft wurde festgestellt, dass bei allen Sequenzen aus Deutschland (außer Bülstringen 1981; Proeseler und Stanarius, 1983) im 6K2 Protein eine Insertion von 3 Aminosäuren vorlag. Bei den Sequenzen von Versuchsfeldern aus den USA und Frankreich sowie auch dem „type strain“ (Sohn et al., 1994; Isolat aus Frankreich) war dies nicht der Fall (Abb. 6 und 7). Es ist noch nicht klar, welche biologische Auswirkung diese Insertion hat. Da beim WYMV, einem nahen Verwandten des WSSMV in Asien, Pathotypen beschrieben wurden (Ohki et al., 2014), ist es möglich, dass auch beim WSSMV Pathotypen auftreten. Es ist noch nicht klar, ob eine

Mutation zu der von uns beschriebenen Insertion geführt hat, oder ob die neue Sequenzvariante eingeschleppt wurde.

WSSMV type (Fra)	LSYQVFQRWQSQVR---RKKSSLNSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
USA	LSYQVFQRWQSQVR---RKKSSLDSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
US5	LSYQVFQRWQSQVR---RKKSSLDSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
US11	LSYQVFQRWQSQVR---RKKSSLDSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
4-3	LSYQVFQRWQSQVR---RKKSSLDSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
Cez2015	LSYQVFQRWQSQVR---RKKSSLDSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
Luc2015	LSYQVFQRWQSQVR---RKKSSLDSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
2-5	LSYQVFQRWQSQVR---RKKSSLDSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
WSSKK1 Bülstringen 1981	LSYQVFQRWQSQVR---RKKSSLDSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
Sch5	LSYQVFQRWQHQVR RVR RKKSYLNSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
Wietzel	LSYQVFQRWQHQVR RVR RKKSYLNSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
Tulus Schl	LSYQVFQRWQHQVR RVR RKKSYLNSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
WSS2	LSYQVFQRWQHQVR RVR RKKSYLNSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
Lindau73	LSYQVFQRWQHQVR RVR RKKSYLNSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
Wss3 Schleesen	LSYQVFQRWQHQVR RVR RKKSYLNSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
Göd	LSYQVFQRWQHQVR RVR RKKSYLNSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM
Walternienburg	LSYQVFQRWQHQVR RVR RKKSYLNSSDELSNTMPVSEGE GILKEVMQMSKEQRNQVKVDM

Abbildung 6: Partielle Aminosäure-Sequenzen von verschiedenen Isolatn des WSSMV. Die Unterschiede zur Aminosäure-Sequenz des „type strain“ sind rot markiert.

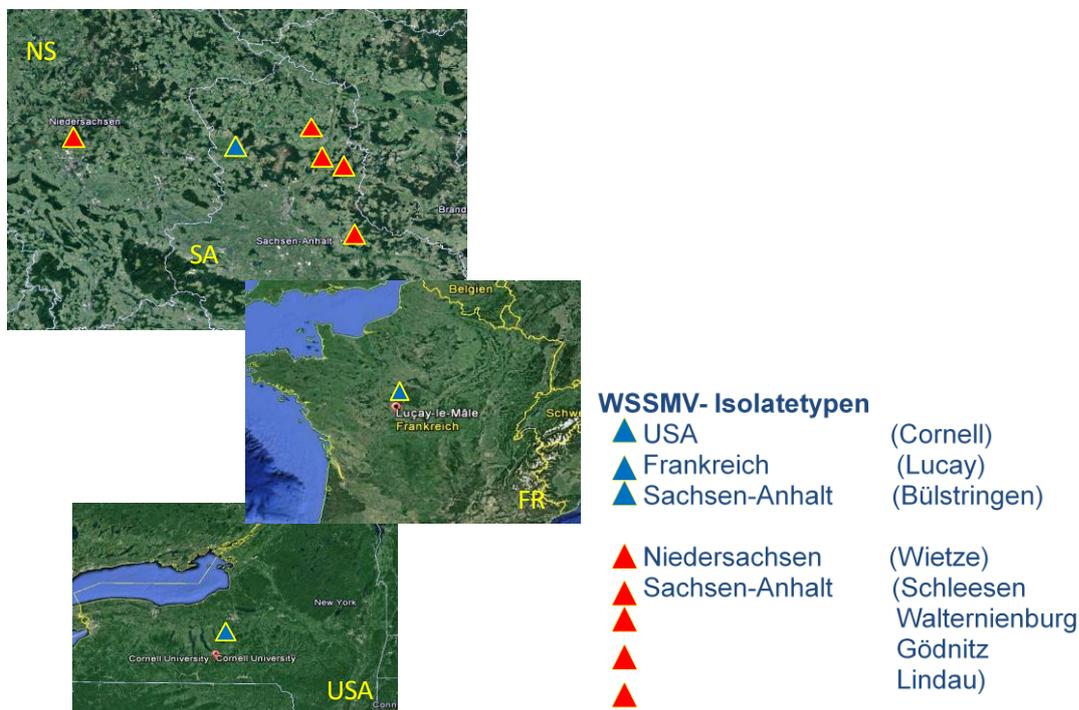


Abbildung 7: Geografische Verteilung der Sequenzvarianten des WSSMV
rotes Dreieck: mit Insertion von 3 Aminosäuren

1.1.5. Nachweis verschiedener Typen des *Soil-borne cereal mosaic virus* (SBCMV)

Koenig et al. (1999) und Goetz und Huth (2005) berichteten bereits über das Auftreten verschiedener Varianten (Typen) von SBCMV-Sequenzen.

Bei unserer Untersuchung von SBCMV-infiziertem Material von verschiedenen Standorten zeigte sich eine geografische Diversität. Sequenzen von deutschen Befallsflächen (Eickeloh, Gödnitz, Walternienburg, Negenborn, Lohe) konnten dem C-Stamm zugeordnet werden. Sequenzen anderer europäischer Standorte gehören zum O-Typ (Abb. 8). Phylogenetische Analysen im Bereich der Hüllproteinsequenz auf RNA 2 unterstreichen dieses Bild (Abb. 9).

Zu möglichen Aggressivitätsunterschieden zwischen den zu den verschiedenen Stämmen gehörenden Isolaten gibt es noch keine gesicherten Ergebnisse. Trotzdem ist es wichtig, bei der Durchführung von Feldversuchen die spezifischen Pathogen-Populationen des jeweiligen Standorts zu kennen, um die Ergebnisse der Versuche richtig einordnen zu können. Während des geförderten Projekts wurde z.B. an den Standorten Eickeloh (sporadisches Auftreten mit geringer Verbreitung) und Lindau (hohe Infektionsraten) erstmalig das WSSMV nachgewiesen.

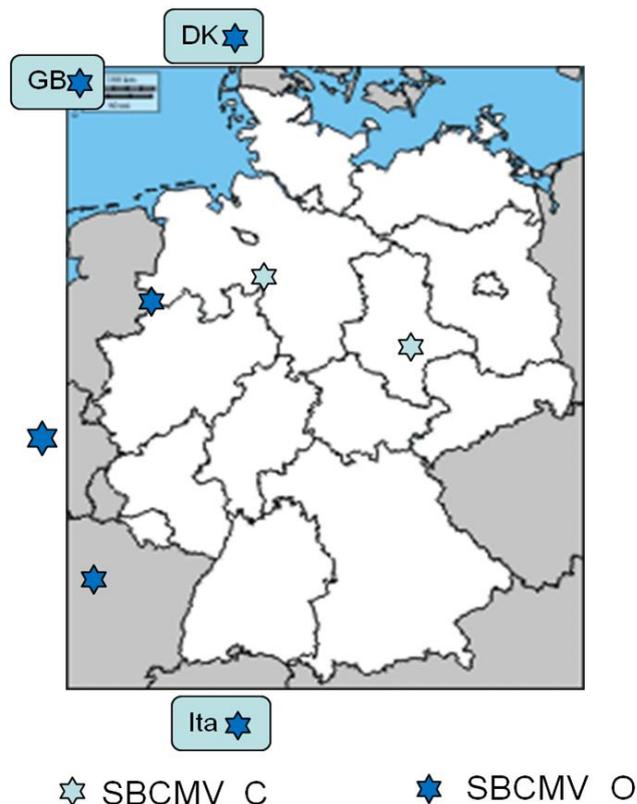


Abbildung 8: Geografische Verteilung der Sequenzvarianten des SBCMV

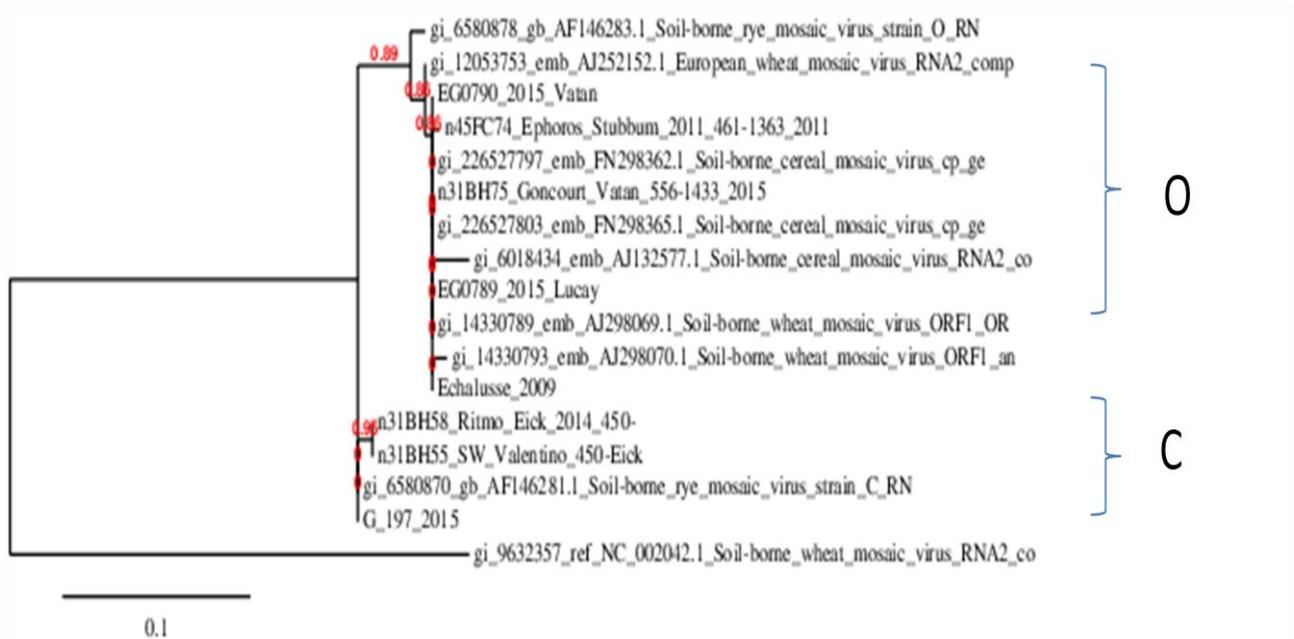


Abbildung 9: Phylogenetische Analyse der partiellen SBCMV-Sequenzen. Vergleich der Hüllproteinsequenz auf RNA 2

1.2. AP2: Differenzierung des Spektrums von *Polymyxa graminis* an Triticale und anderen Getreidearten mittels PCR

1.2.1. Differenzierung der *P. graminis* formae speciales

Der obligate Parasit *P. graminis* tritt ubiquitär auf und verursacht selbst kein Schadbild in Getreide; seine besondere Bedeutung liegt in der Übertragung phytopathogener Viren bei Getreide. Kastirr und Widera (1988) hatten gezeigt, dass *P. graminis* in Ostdeutschland weit verbreitet war. Die große Diversität der Sequenzen innerhalb der ribosomalen rDNS Region der Species *P. graminis* hat zur Unterscheidung verschiedener Ribotypen geführt (Ward et al. 1994, 1998, 2005). Aufgrund ökologischer Unterschiede haben Legreve et al. (2002) die Unterscheidung von 5 formae speciales (f.sp.) vorgeschlagen (siehe Abb. 10). Zwei dieser f.sp. sind in der gemäßigten Zone zu finden (f.sp. *temperata* und *tepida*). Sie übertragen ökonomisch bedeutsame Viren wie die im Projekt untersuchten SBCMV, SBWMV und WSSMV, sowie auch die Gerstengelbmosaikviren *Barley mild mosaic virus* (BaMMV) und *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV).

Smith et al. (2013) zeigten, dass die Sequenzvariationen zwischen den bekannten Untergruppen (Ribotypen, f.sp.) größer sind als bisher beschrieben und dass auch mehr Untergruppen existieren als bisher bekannt. Verschiedene Ribotypen existieren gemeinsam im Boden oder in derselben Pflanze.

Vektor *P. graminis*

Ribotypen I-V Ward et al. (1998) *formae speciales* Legreve et al. (2002)
(differenziert durch Wirtspflanzenspektrum)

Ribotyp I	f. sp. <i>temperata</i>	
Ribotyp II	f. sp. <i>tepida</i>	
Ribotyp III	f. sp. <i>tropicalis</i>	auch USA
Ribotyp IV	f. sp. <i>subtropicalis</i>	
Ribotyp V	f. sp. <i>colombiana</i>	auch W. Afrika, Japan

Abbildung 10: Beschriebene Ribotypen bzw. formae speciales von *Polymyxa graminis*

Wir haben Getreide- und Bodenproben aus verschiedenen Regionen Deutschlands und Europas mittels PCR und qPCR auf das Vorkommen von *P. graminis* untersucht und eine Zuordnung zu den f.sp. vorgenommen. Das ist ein Beitrag zur Erfassung der Diversität der Vektorpopulationen in den von uns analysierten Regionen.

Gesamt-DNS für den Nachweis und die Differenzierung von *P. graminis* wurde aus Erde und Wurzeln isoliert. Spezifische PCR-Produkte wurden kloniert und die klonierten Amplikons sequenziert. Die Sequenzen wurden mit Datenbankeinträgen verglichen und der jeweiligen f.sp. zugeordnet. Ein Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen vom 18S/ITS1-Abschnitt der *P. graminis*-Sequenz zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen f.sp. *tepida* und *temperata* (Abb. 11).

Ein Set bestehend aus 15 *P. graminis*-Sequenzen wurde im European Nucleotide Archive hinterlegt (Accession Numbers LN651065 bis LN651079).

Primerpaare für die *P. graminis* f.sp.-Nachweise wurden durch Vergleiche der in der Datenbank vorhandenen Sequenzen festgelegt. Klonierte Sequenzen, die eindeutig der f.sp. *temperata* oder *tepida* zugeordnet werden konnten, wurden als Standard-DNS für die Real Time PCR eingesetzt. (Y12824 *temperata*, Y12826 *tepida*; FN393968=, LN651079=, LN651065=, LN651072=, LN651066=, LN651069=, LN651070=, SchI-31BI15=, KF535917=, AM075823=, LN651073=, LN651068=, LN651075=, LN651076=, LN6511077=, LN651078=, LN651074=, LN651071=, LN651067=.

<u>Y12824</u>	<u>ATTAGCGTTGAATTGGTCTTGGTGCCATGCGAAAAACATGTGGATTGTGG</u>	150
FN393968	ATTAGCGTTGAATTGGTCTTGGTGCCATGCGAAAAACATGTGGATTGTGG	63
LN651079	ATTAGCGTTGAATTGGTCTTGGTGCCATGCGAAAAACATGTGGATTGTGG	149
LN651065	ATTAGCGTT-AATTGGTCTTGGTGCCATGCGAAAAACATGTGGATTGTGG	148
LN651072	ATTAGCGTT-AATTGGTCTTGGTGCCATGCGAAAAACATGTGGATTGTGG	149
LN651066	ATTAGCGTT-AATTGGTCTTGGTGCCATGCGAAAAACATGTGGATTGTGG	149
LN651069	ATTAGCGTT-AATTGGTCTTGGTGCCATGCGAAAAACATGTGGATTGTGG	149
LN651070	ATTAGCGTT-AATTGGTCTTGGTGCCATGCGAAAAACATGTGGATTGTGG	149
Schl-31BI15	ATTAGCGTT-AATTGGTCTTGGTGCCATGCGAAAAACATGTGGATTGTGG	148
<u>Y12826</u>	<u>ATTAGCGTTGAATGG---TTGTTGCCATTTTCGTAAAAATGTGGATCGTCT</u>	147
KF535917	ATTAGCGTTGAATGG---TTGTTGCCATTTTCGTAAAAATGTGGATCGTGT	147
AM075823	ATTAGCGTTGAATGG---TTGTTGCCATTTTCGTAAAAATGTGGATCGTGT	51
LN651073	ATTAGCGTTGAATGG---TTGTTGCCATTTTCGTAAAAATGTGGATCGTCT	147
LN651068	ATTAGCGTTGAATGG---TTGTTGCCATTTTCGTAAAAATGTGGATCGTCT	146
LN651075	ATTAGCGTTGAATGG---TTGTTGCCATTTTCGTAAAAATGTGGATCGTCT	146
LN651076	ATTAGCGTTGAATGG---TTGTTGCCATTTTCGTAAAAATGTGGATCGTCT	146
LN651077	ATTAGCGTTGAATGG---TTGTTGCCATTTTCGTAAAAATGTGGATCGTCT	146
LN651078	ATTAGCGTTGAATGG---TTGTTGCCATTTTCGTAAAAATGTGGATCGTCT	146
LN651074	ATTAGCGTTGAATGG---TTGTTGCCATTTTCGTAAAAATGTGGATCGTCT	147
LN651071	ATTAGCGTTGAATGG---TTGTTGCCATTTTCGTAAAAATGTGGATCGTCT	147
LN651067	ATTAGCGTTGAATGG---TTGTTGCCATTTTCGTAAAAATGTGGATCGTCT	147

Abbildung 11: Vergleich der nachgewiesenen partiellen Sequenz vom 18S/ITS1 Abschnitt der *P. graminis*-Sequenzen.

1.2.2. Verbreitung der *P. graminis* formae speciales in Verbindung mit dem Virusauftreten

P. graminis ist ubiquitär in vielen Böden vorhanden. Eine effiziente Verbreitung erfolgt durch Wasser, Wind sowie durch landwirtschaftliche Maschinen, aber auch durch mit Erde behaftetes Pflanzgut, wie z.B. Kartoffelknollen. Allerdings ist die Verteilung von *P. graminis* im Boden nicht homogen, und nicht alle *P. graminis* Populationen sind auch virustragend. Außerdem sorgt der zweiphasige Lebenszyklus von *P. graminis* (Abb. 12) bei passenden Bedingungen für eine sehr schnelle Vermehrung des Protisten durch die Bildung sekundärer Zoosporen. Das führt dazu, dass das Ausmaß einer durch *P. graminis* übertragenen Virusinfektion nicht unbedingt im Verhältnis zur anfänglichen Inokulumkonzentration im Boden steht, sondern eher durch die sekundären Zoosporen bedingt ist.

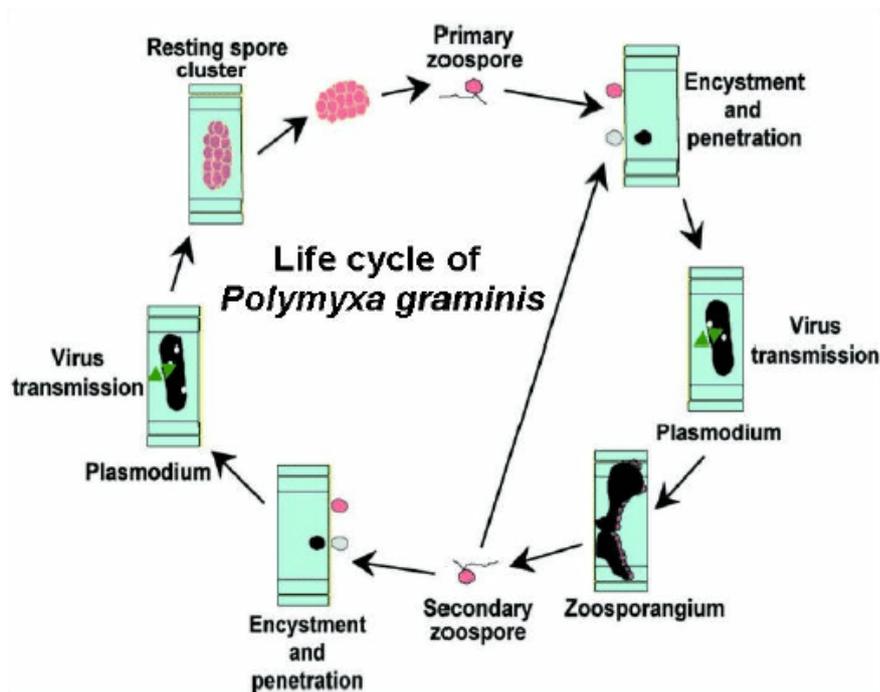


Abbildung 12: *Polymyxa graminis*-Lebenszyklus nach Kanyuka et al., 2003

Die Schwere der wirtschaftlichen Schäden durch bodenbürtige Virose unterscheidet sich in Abhängigkeit von den Pathogen-Populationen und den Getreidekulturen. Wintertriticale, -roggen und -hartweizen werden in Deutschland in allen Befallsregionen durch SBWMV, SBCMV und WSSMV sowohl auf leichten sandigen als auch auf schweren lehmigen Böden stark geschädigt. Winterweizen wird auf den deutschen SBCMV kontaminierten Flächen, wo der C-Typ dieses Virus vorkommt (siehe Abb. 8) kaum infiziert. In den SBCMV-Flächen in Dänemark, Großbritannien, Niederlanden, Belgien, Frankreich und Italien, wo der O-Typ vorkommt, sind erhebliche Ertragsausfälle auch in Winterweizen zu verzeichnen. Dahingegen scheint die Aggressivität der Viren nicht vom Standort (Bodentyp) abhängig zu sein.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, etablierten sich die Pathogenpopulationen aus pilzlichem Vektor (*P. graminis*) und dem SBWMV-NY sowohl in den nährstoffreichen Mineralböden mit hoher organischer Humusmasse (Mutterboden, anmooriger Boden) als auch in den leichteren Mineralböden (Schwemmboden, sandiger Lehm).

Tabelle 2: Nachweis der SBWMV-NY-Infektion von Winterweizen mittels DAS-ELISA in unterschiedlichen Böden der südöstlichen Befalls-Standorte Schleswig-Holsteins

SBWMV-NY - Flächen in Schleswig-Holstein			Virustiter (E _{405nm})		RT-PCR
Schlag	Sorte	Bodentyp	SBCMV	SBWMV	SBWMV
Bormkoppel	<i>Primus</i>	Sandiger Lehm	0,0	1,2	++
Langkoppel	<i>Kredo</i>	Mutterboden	0,0	1,1	++
		Schwemmboden	0,0	1,0	++
Hundekamp	<i>Diskus</i>	Anmooriger Boden	0,0	1,1	++
Heidkoppel	<i>Kredo</i>	Sandiger Lehm	0,0	1,2	++
Westerrade	<i>Elixer</i>	Lehmiger schwerer Boden	0,0	2,5	++

Es gibt mehrere Studien mit einander widersprechenden Aussagen hinsichtlich des Verhältnisses zwischen Inokulumkonzentration und Krankheitsinzidenz (Brierley et al., 2013) für den Plasmodiophoriden *Spongospora subterranea* (ein naher Verwandter von *P. graminis*).

Unabhängig von der Fruchtfolge bleibt *Polymyxa*, der Virusvektor, Jahrzehnte im Boden lebensfähig und wenn er virusbeladen ist, werden die Viruskomponenten stabil eingelagert geschützt. *P. graminis* vermehrt sich an Getreidearten und Gräsern (*Poaceen*). Nicht immer ist jede Dauerspore von *Polymyxa* virusbeladen.

Wenn Kulturen angebaut werden, die kein Wirt für *Polymyxa* sind, überdauern die Sporen in den organischen Resten oder im Boden, bis wieder ein Wirt die Reize zum Auskeimen gibt und der Vektor aktiv in die Wurzelzellen eindringen kann.

Werden Kulturen angebaut, die resistent gegen die Viren sind, kann *Polymyxa* die Pflanzen befallen und sich in den Wurzeln vermehren. Da aber die Pflanzen nicht virustragend sein werden, kann kein Virus vom Vektor aufgenommen werden und der neu vermehrte Vektor bleibt virusfrei. Somit kann es zu einer so genannten Verdünnung des virustragenden Vektors kommen und man sollte annehmen, dass die Infektionsgefahr bei langjährigem Anbau von Nichtwirten oder virusresistenten Wirten abnimmt.

Wie jedoch Beobachtungen zum Einfluss der Fruchtfolge auf die Senkung des Virusbefall zeigten, stellt offensichtlich das virustragende Inokulum immer noch eine ausreichende Gefahr für die Infektion der Wirtspflanzen dar. Das zeigte z.B. der Anbau von anfälligem Getreide in ehemaligen Virusflächen, die einige Jahre als Stilllegungsflächen lagerten und dann neu genutzt wurden. Ein anderes Beispiel ist eine Fläche, auf der seit 20 Jahren keine Zuckerrübe angebaut wurde und in der diesjährigen Rübenkultur eindeutig die *P. betae* übertragbare Rizomania nachgewiesen wurde.

Ein weiterer Aspekt in der Virusübertragung ist der zweigeteilte Lebenszyklus von *Polymyxa*.

1.Zyklus: Aus den Dauersporen, die sich als Infektionsquelle/-potential im Boden befinden, keimen primäre Zoosporen aus, deren Zytoplasma in die Wurzelzellen übertragen wird, dort die Viruskomponente abgeben und aufnehmen kann und sich zu Zoosporangien differenziert.

2. Zyklus: In den Zoosporangien entstehen sekundäre Zoosporen, die virustragend sind oder in infizierten Pflanzen virusbeladen werden und unabhängig vom Vektorpotential im Boden in großer Menge neue Infektionen unmittelbar in den benachbarten Wurzelzellen setzen, das Virus weiter übertragen und diesen Zyklus mehrfach wiederholen.

Damit ist erklärbar, dass die Virusübertragung nicht allein vom Inokulumpotential im Boden abhängig ist. Es reicht eine kleine Menge virustragender primärer Zoosporen aus, um den Infektionsprozess zu starten, der sich dann mit Hilfe der sekundären Zoosporen kontinuierlich fortsetzt und neues virustragendes Infektionspotential schafft.

Somit sind quantitative Erhebungen des *P. graminis*-Vorkommens im Boden nur bedingt geeignet, das Krankheitsrisiko vorherzusagen. Auch der *P. graminis*-Nachweis allein bedeutet nicht, dass mit Furo- und Bymoviren beladene Sporen vorhanden sind. Wir haben uns deshalb auf den qualitativen Nachweis der beiden f.sp. *temperata* und *tepida* konzentriert, sowohl mit konventioneller als auch qPCR.

Beide Ribotypen sind an der Übertragung der von uns untersuchten Viren beteiligt, alle theoretisch möglichen Pathogenkombinationen wurden von uns nachgewiesen (Tab.3).

Tabelle 3: Nachweis von Pathogenkombinationen in einzelnen **Feldpflanzen**.
DNS-Isolation für den *Polymyxa*-Nachweis aus Wurzeln, RNS-Isolation für den Virusnachweis aus Blättern.

Region	Triticale-Sorten	Virus	<i>P. graminis</i> - Ribotypen
Gödnitz	<i>SW Valentino</i>	SBCMV	I, II
Gödnitz	PZO10401	WSSMV, SBCMV	II
Westerrade	<i>SW Valentino</i>	SBWMV	I
Eickeloh	<i>SW Valentino</i>	SBCMV	II
Schleesen	<i>Trinidad</i>	WSSMV	I
Heddesheim	<i>Trinidad</i>	SBWMV	II
Lindau	unbekannt	WSSMV, SBCMV	II

Unsere Resultate belegen, dass beide Ribotypen, I und II, in Deutschland verbreitet sind, und dass sie gemeinsam auftreten können (Tab. 4). Wie Tabelle 5 zeigt, liegt keine Wirtsspezifität für die *formae speciales* vor.

Tabelle 4: Vorkommen von *P. graminis* - Ribotypen in **Bodenproben** verschiedener Befallsregionen. f.sp. *temperata* = Ribotyp I, f.sp. *tepida* = Ribotyp II. Die Ergebnisse von Smith et al. (2013) für Eickeloh und Schladen wurden einbezogen.

Region	Ort	Virus	<i>Polymyxa</i> - Ribotypen vorhanden	Sequenz-nachweis
Deutschland				
Bundesland				
Niedersachsen	Altenhagen, im Moor Im trockenen Kamp Bornum	-	II	II
		-	II (2012)	II
	Eickeloh	BaYMV, BaMMV	I	
	Schladen	SBCMV, WSSMV	II (2010) I, II (Smith et al., 2013)	II
	Wietze	BaYMV, BaMMV	I, II (Smith et al., 2013)	
		SBCMV, WSSMV	I (2007)	I
Schleswig-Holstein	Bormkoppel	SBWMV-NY	I, II (2013)	I
	Westerrade	SBWMV-NY	I, II (2013)	I, II
Sachsen-Anhalt	Gödnitz	SBCMV, WSSMV	I, II (2010, 2014)	I, II
	Lindau	SBCMV, WSSMV	II	II
	Schleesen	WSSMV	I	I
	Walternienburg	SBCMV, WSSMV	II (2013, 2015)	II
Baden-Württemberg	Heddesheim	SBWMV-N	II (2010), I (2015)	I, II
Dänemark	Stubbum	SBCMV	II (2011)	II
Polen	Pulawy	-	I, II (2013)	I, II

Tabelle 5: Vorkommen von *P. graminis* - f.sp. und der bodenbürtigen Viren in verschiedenen Regionen Deutschlands und Europas. WW-Weichweizen, DW-Hartweizen, WT-Triticale, WR-Roggen, WG-Gerste, Di-Dinkel

Standort	Getreide-		<i>Polymyxa graminis</i>		Virus	
	Art	Sorte	forma specialis	Furovirus	Bymovirus	
Deutschland						
Lindau	WT	Fredo	<i>tepida</i>	SBCMV	WSSMV	
Eickeloh	WT	SW Valentino	<i>tepida</i>	SBCMV	-	
Heddesheim	WT	Trinidad	<i>tepida</i>	SBWMV-N	-	
Heddesheim	DW	Ciccio	<i>temperata</i>	SBWMV-N	-	
	WW	Ephoros	<i>temperata</i>	SBWMV-N	-	
	WG	BAZ 4006	<i>temperata</i>	-	-	
	WG	Chirukin ibaraki 1	<i>temperata</i>	SBWMV-N	-	
Gödnitz	WT	PZO10401	<i>tepida</i>	SBCMV	WSSMV	
Gödnitz	WT	PZO10401	<i>tepida</i>	<i>temperata</i>	SBCMV	WSSMV
Wietze	WT	PZO10401	<i>temperata</i>	SBCMV	WSSMV	
Schleesen	WT	Trinidad	<i>temperata</i>	-	WSSMV	
	WT	Bellac	<i>temperata</i>	-	-	
Westerrade	WT	SW Valentino	<i>temperata</i>	SBWMV-NY	-	
	WG	BAZ 4006	<i>temperata</i>	-	-	
	WW	Ritmo	<i>temperata</i>	SBWMV-NY	-	
Dänemark						
Stubbum	WW	Hereford	<i>tepida</i>	SBCMV	-	
Polen						
Pulawy	Di	unbekannt	<i>tepida</i>	<i>temperata</i>	-	-

1.3. AP3: Quantitative Bewertung der Infektion von Triticale durch Pathogenpopulationen an unterschiedlichen Befallsstandorten mittels Real-Time qPCR

1.3.1. Optimierung der Real-Time qPCR für die Quantifizierung bodenbürtiger Getreideviren und deren Vektor-Spezies

Die Methodik für Nachweis und Quantifizierung von SBCMV, WSSMV und SBWMV mittels qRT-PCR wurde erarbeitet. Da es sich bei allen drei Viren um RNS-Viren handelt, muss die RNS erst in cDNS umgeschrieben werden, bevor die qPCR erfolgen kann. Nach Sequenzanalysen der genannten Viren wurden geeignete Primer und Sonden ausgewählt sowie die Parameter und Reaktionsansätze für die cDNS-Synthese und die qPCR optimiert. Die Synthese der cDNS und die anschließende qPCR wurden in einem „two step“ Verfahren durchgeführt. Das hat sich als besser erwiesen als ein one-step Verfahren, da auf die cDNS wieder zurückgegriffen werden kann, wenn die PCR nicht zu nutzbaren Ergebnissen geführt hat.

Standards für die Virus-qRT-PCR sowie für die *P. graminis*-qPCR wurden durch Klonierung von Genomabschnitten hergestellt, sodass die Standards als Plasmid-DNS in gleichbleibender Qualität zur Verfügung standen. Die Klone können als *E. coli*-Glycerol-Stocks über längere Zeiträume bei -80°C aufbewahrt werden, und Plasmid-DNS kann jederzeit aus *E. coli*-Kulturen gewonnen werden.

Die klonierten Sequenzen, die eindeutig *temperata* oder *tepida* zugeordnet werden konnten, wurden als Standard-DNS für die Real Time PCR eingesetzt (Abb. 13).

Primerpaare für die *P. graminis*- f. sp.- Nachweise wurden durch Vergleiche der in der Datenbank vorhandenen Sequenzen festgelegt.

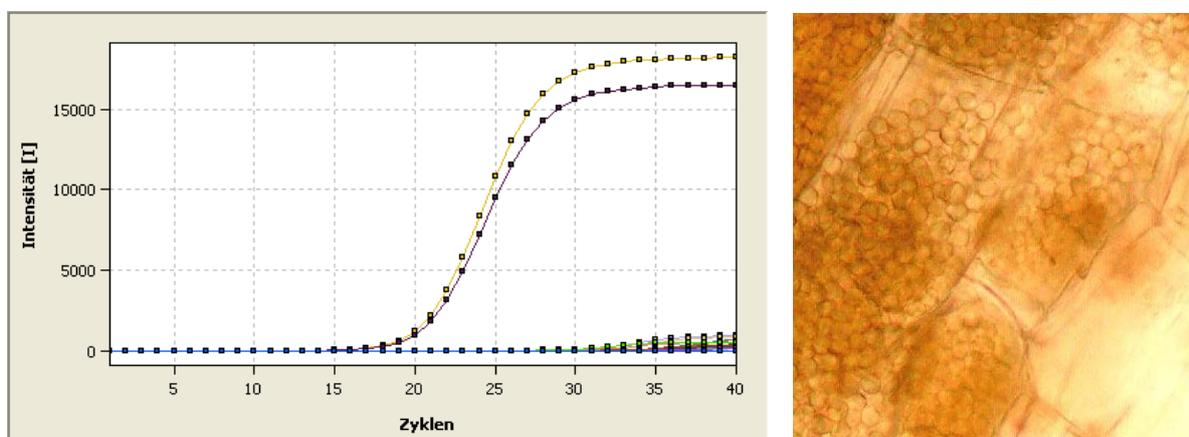
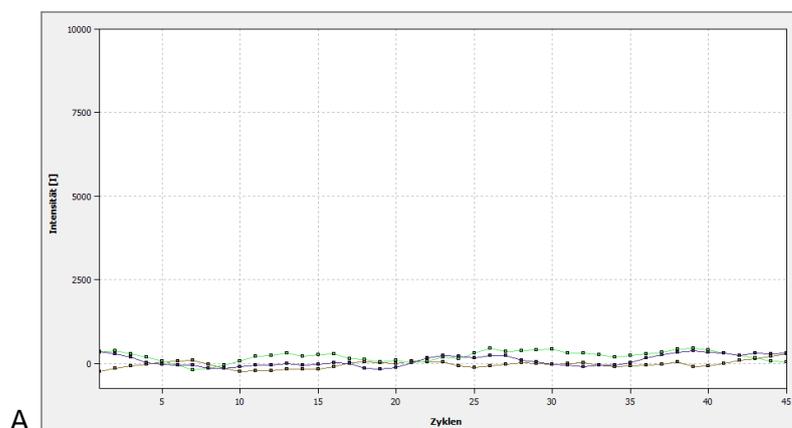


Abbildung 13: qPCR-Nachweis von *P. graminis* f.sp. *temperata* in Weizenwurzeln
rechts: Dauersporen von *P. graminis*

Geeignete Primer-Kombinationen für den Nachweis von SBCMV, SBWMV und WSSMV wurden anhand von Sequenzanalysen ausgewählt und getestet. Wir haben uns für die cDNS-Synthese für den Einsatz Target-spezifischer Primer entschieden, da z.B. das SBCMV keine poly(A)-Region enthält, an die oligo(dT) Primer binden könnten. Beim Einsatz von „random“ Primern würde hauptsächlich nicht-Virus RNS in cDNS umgeschrieben. Ein Protokoll für die cDNS-Synthese wurde erarbeitet und optimiert. Verschiedene Verbrauchsmaterialien (z.B. Testplatten für die cDNS Synthese und die qRT-PCR, Klebefolien, Probengefäße für die PCR, Farbstoffe) wurden getestet und ausgewählt. Für den Nachweis des WSSMV wurde statt SYBR eine FAM-Sonde eingesetzt (Abb. 14 A, B), um die Nachweis-Spezifität zu erhöhen.



Gesundkontrollen (cDNA von Triticale-Sorten). Nachweis mit FAM-Sonde. Die Fluoreszenz der Gesundkontrollen steigt über 40 Zyklen nicht über Background-Werte an.

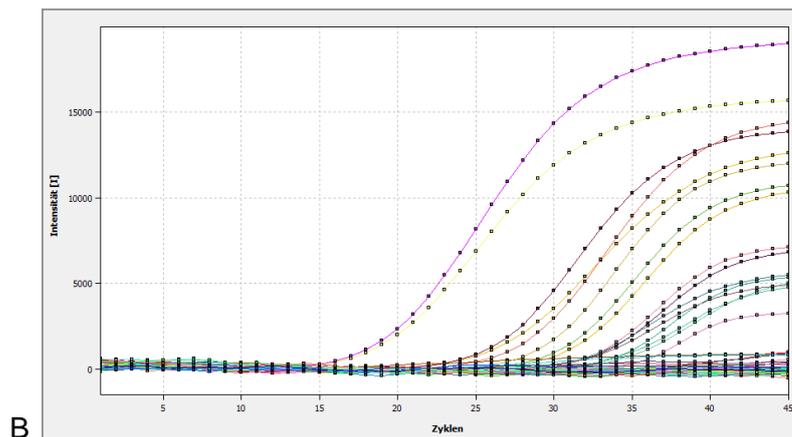


Abbildung 14: Einsatz der FAM-Sonde für den Nachweis WSSMV-infizierter Proben. A- Gesundkontrollen, B- WSSMV-infizierte Proben

Genom-Abschnitte des SBCMV, SBWMV und WSSMV wurden in den Plasmid-Vektor pGEM-T Easy (Promega) kloniert, um definierte Mengen virusspezifischer DNS für die Verwendung als Standards in Verdünnungsreihen bereitzustellen (Abb. 15).

Standardkurven für die Quantifizierung von SBCMV, SBWMV und WSSMV in Proben von infiziertem Getreide wurden erstellt (Abb. 16).

1.3.2. Quantifizierung der Virusinfektion in Triticale-Sorten und -Zuchtlinien

Mit Hilfe der Saftpresse gewonnener Blattextrakt wurde sowohl für den ELISA als auch für die Gewinnung von Gesamt-RNS eingesetzt, so dass der zusätzliche Arbeitsaufwand für die RNS-Extraktion limitiert werden konnte und das gleiche Ausgangsmaterial für ELISA und RT-qPCR (Abb. 17) eingesetzt wurde. Eine DNase-Behandlung der Gesamt-DNS war nicht notwendig, da SBCMV, SBWMV und WSSMV RNS-Viren sind, deren genetische Information nicht im Pflanzengenom präsent ist und da die Gesamt-RNS in ausreichender Menge zur Verfügung stand.

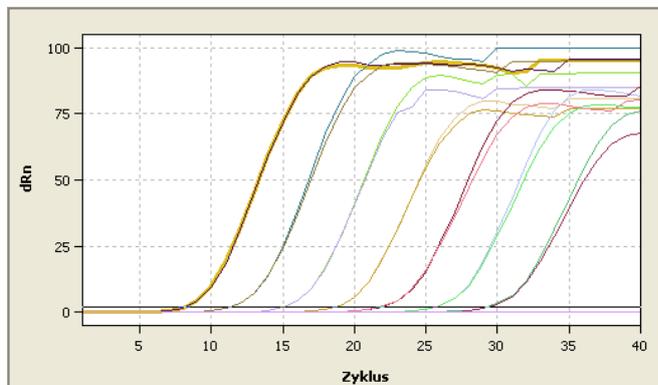


Abbildung 15: Verdünnungsreihe (8800 pg/µl bis 0,0088 pg/µl) der Standard-DNS für WSSMV

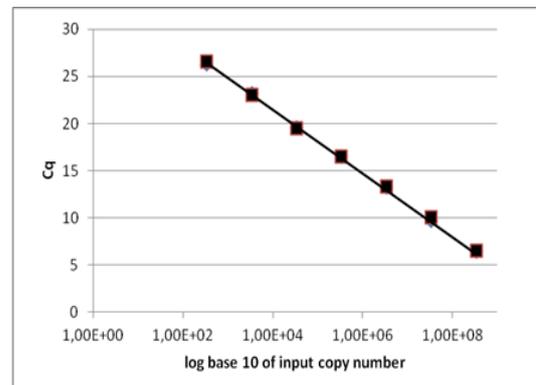


Abbildung 16: Standardkurve zur Quantifizierung von viraler RNS

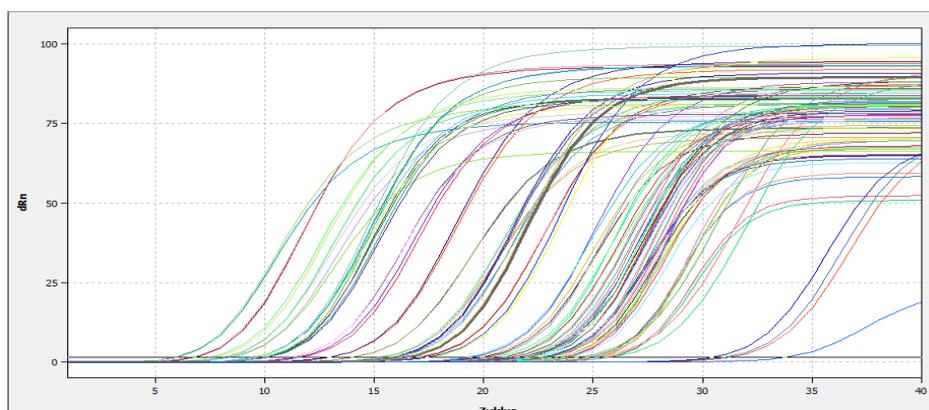


Abbildung 17: WSSMV-Nachweis in Feldproben mittels qRT-PCR

Die qRT-PCR hat einen großen dynamischen Bereich für den Nachweis der Zielsequenz (zum Beispiel $3,2 \times 10^2$ bis $3,2 \times 10^8$ Kopien für SBCMV). Das erlaubt die Quantifizierung viraler Kopien in Proben mit sehr unterschiedlichem Virusgehalt. Somit können quantitative Aspekte

der Resistenz besser analysiert werden. Das ist besonders wichtig für die Entwicklung von Markern und die Testung spaltender Populationen.

Die Methoden wurden im Journal of Plant Diseases and Protection veröffentlicht (Ziegler et al., 2014).

Im Gegensatz zum ELISA, der das virale Hüllprotein detektiert, wird bei der qPCR eine Messung der Menge der viralen RNA vorgenommen. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung beider Methoden beim Virus-Nachweis, wobei aber nur der RNS Nachweis mittels qPCR quantitativ war (Abb. 18).

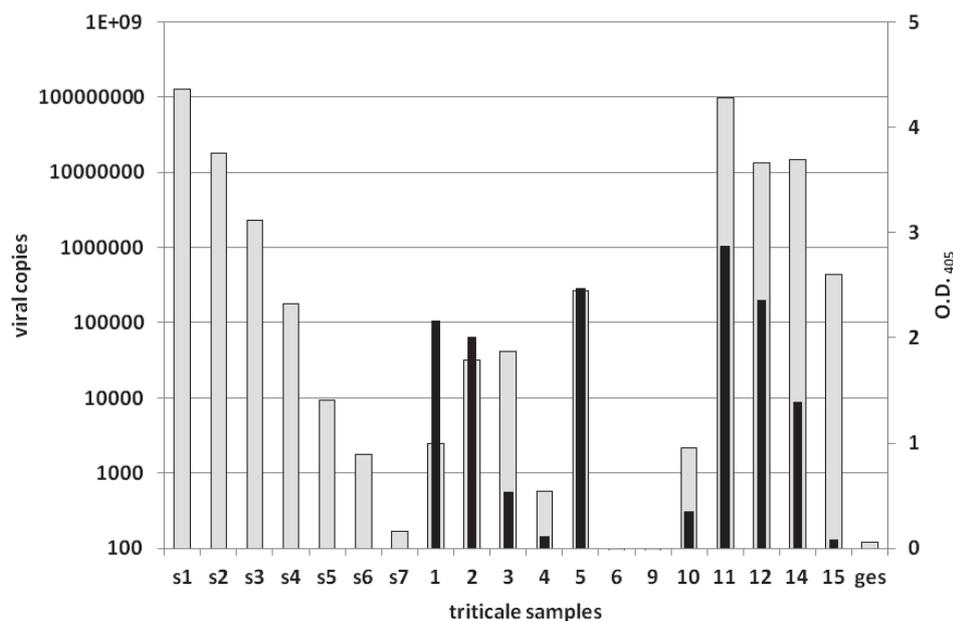


Abbildung 18: WSSMV Kopien in RNS-Extrakten aus Feldproben von Triticale (graue Balken). Schwarze Balken zeigen die korrespondierenden ELISA-Werte (der ELISA ist nicht quantitativ). S1-S8: Verdünnungsreihe des WSSMV Standard-Plasmids

Es ist sehr wichtig, neben der visuellen Bonitur von Versuchspflanzen auch einen direkten Virusnachweis (z.B. ELISA) durchzuführen, um realistische Ergebnisse zu erhalten. Rotenberg et al. (2016) berichten, dass 19% der Bestockungstriebe, in denen mittels ELISA WSSMV nachgewiesen wurde, keine Symptome zeigten. Diese symptomlos infizierten Pflanzen produzierten aber signifikant weniger Ertrag als nicht infizierte Pflanzen. Das zeigt, dass auch die symptomlos infizierten Pflanzen physiologisch beeinträchtigt sind. Auch diese Autoren planen für die Zukunft die Anwendung PCR-basierter Verfahren für den Virusnachweis.

Die von uns etablierten qRT-PCR Methoden wurden eingesetzt, um den Virusbefall für SBCMV (Abb. 19) und WSSMV zum Beispiel im Feldversuch Gödnitz zu quantifizieren. Weiterhin wurde der Befall mit SBWMV in Westerrade mittels qRT-PCR untersucht.

Abbildung 20 zeigt die Bewertung der Infektion von Triticale-Material mit SBCMV und WSSMV in 4 Wiederholungen (Feldversuch Gödnitz 2013/2014) basierend auf den qRT-PCR-Resultaten. Die Methoden zur RNS-Extraktion aus Pflanzensaft, cDNS-Synthese und qRT-PCR sind ausführlich dargestellt in Ziegler et al. 2014 (siehe Anhang).

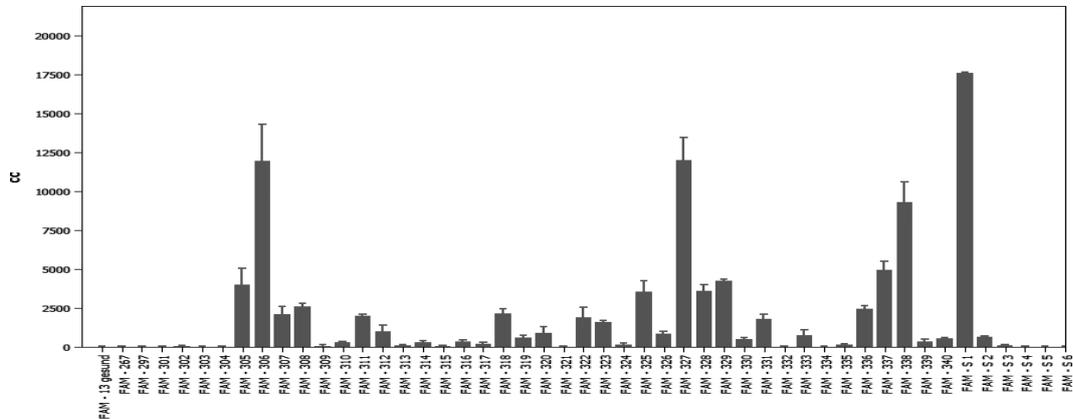


Abbildung 19: SBCMV RNS-Konzentration (pg/ 90ng Gesamt-RNA) in Feldproben

	SBCMV	WSSMV
Agrino	1	1
Asiatico	1	1
Estac	2	2
Estac	2	2
Estac	2	2
Dubiet	2	2
Elorado	2	2
Elorop	2	2
EP Fr 420/11	1	1,2
Fr 186/10	2	1
Fr 230/12	3	1
Fr 420/11	2	1,1
Fr 848/12	2	1,2
Fr 870/13	2	1
Fr 878/13	4	1
Fr 819/14	4	1
Fr 423/14	1	1
Fr 482/13	3	1
Fr 483/13	2	1
Fr 816/14	2	1
Fr 818/14	2	1
Fr 817/10	4	3
Freiro	3	3
Grenado	3	1
Hariduk	3	1,1
Inpetto	4	3
IG Berak	4	3,3
Kolor	4	1,1
Korpus	4	3,3
Leontino	2	1
Medlio x Nord 837	1	1
Massimo	3	4
Massimo 754	1	3
Fr 420/11 x Massimo x Grenado	1	1,1
Melenac	1	3
Modus	4	1
Mundo x (Charger...	2	1
Mungid	2	1,1
Piky	3	0,1 Jan
Pop Fr 420/11	2	1,2
Prader	3	3
Saglic	2	2
Sequent	3	1
Tatra	1	1,1
TW 280 Hage	1	1
TW 887 Thripp 4	1	2
Trimester	3	4
Trinimer	1	2
Trinidad	3	3
Tripart	1	1,1
Tulus	1	3

Triticale

Bestimmung der SBCMV-Konzentration

Bestimmung der WSSMV-Konzentration

Abbildung 20: Quantitative Bewertung der Infektion von Triticale-Material mit SBCMV und WSSMV (Feldversuch Gödnitz 2013/14) basierend auf den qRT-PCR-Resultaten.

Gruppierung der Virus-RNA-Konzentration:

1- < 10 pg, 2- < 100 pg, 3- < 1000 pg, 4- > 1000 pg

Um gesicherte Ergebnisse zur Virusresistenz zu erhalten, erfolgte die Bewertung der Genotypen in 4-facher Wiederholung. Bei der Probenahme wurden je Einzelreihe eine Blattmischproben (8Blätter) im vergleichbaren Entwicklungsstadium entnommen. Aus den Blätter wurden in der Walzenpresse Presssaft gewonnen, 4 Tropfen (100µl) aufgefangen und mit 900µl Extraktionspuffer verdünnt (Verdünnung 1:10). Davon werden 2 x 100µl für den Virusnachweis mittels DAS-ELISA als Doppelprobe auf Mikrotiterplatten aufgetragen.

Aus der gleichen Blattsaftprobe werden 2 Tropfen für die Isolation der Gesamt-RNS für die qRT-PCR zur Quantifizierung des Virusbefalls verwendet. Mit dieser Versuchsanlage können gesicherte und vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.

1.4. AP4: Untersuchung der Befallsintensität von Triticale-Genotypen mittels ELISA an unterschiedlichen Standorten

Ziel des Forschungsvorhaben war es Triticale-Sorten und/oder -Zuchtmaterial zu finden, die auf den virusverseuchten sandigen Böden der Triticale-Anbaugebiete leistungsstarke und stabile Erträge für die Bioethanol- und Biogas-Gewinnung liefern.

Zu Beginn des Forschungsvorhabens waren in Triticale keine Sorten mit Resistenz gegen bodenbürtige Viren bekannt. Aus diesem Grund wurde es notwendig, vorhandene Sortimente und Zuchtmaterial auf Resistenz gegen diese Virose zu charakterisieren.



Abbildung 21: Versuchsfelder in Regionen mit unterschiedlicher Viruskontamination

In die Phänotypisierung der Virusresistenz in Wintertriticale wurden das Europäische Sortiment mit 130 Triticale-Sorten, ein Sortiment (75 Sorten) und Zuchtmaterial des Wirtschaftspartners der PZO sowie 25 ausgewählte Sorten und Stämme für die

Ertragsprüfung einbezogen. Die Bewertung der Virusinfektionen erfolgte nach Kultivierung der Genotypen teilweise unter Gewächshausbedingungen in kontaminierter Erde und im randomisierten Anbau in virusverseuchten Feldern unterschiedlicher Befallsregionen (Abb. 21). Die Virusinfektion wurde in den Blättern im frühen Entwicklungsstadium (BBCH 21-23) mittels DAS-ELISA bestimmt.

1.4.1. Resistenzreaktionen von Triticale gegen das SBWMV-NY unter kontrollierten Gewächshausbedingungen

Unter definierten Gewächshausbedingungen wurde die Resistenzreaktion von 42 vorselektierten Triticale-Sorten und –Zuchtlinien in infektiöser Erde eines Befallsstandortes bei Westerrade geprüft. Die Kultivierung erfolgte in 96-er Multitopfplatten. Die Triticale-Herkünfte wurden 4, 8 und 12 Wochen nach der Einsaat in die Erde (wpi) auf Virusbefall in den Wurzeln, Stängeln und Blättern mittels DAS-ELISA getestet. Bereits 4 wpi waren alle geprüften Pflanzenorgane anfälliger Sorten infiziert und zeigten hohe Virustiter (Abb. 22). Andere Sorten reagierten mit einer etwas verzögerten Virusausbreitung. Während 4 wpi die Wurzeln der Herkünfte infiziert waren, erfolgte zu diesem Zeitpunkt noch keine Ausbreitung in Stängel und Blatt. Jedoch 8 wpi war die Virusausbreitung in der ganzen Pflanze zu verzeichnen. Nur in den Sorten HORTENSO und CARNAC wurde die Virusausbreitung in die oberirdischen Pflanzenteile über den Prüfzeitraum von 12 wpi gehemmt. Eventuell liegt hier eine Ausbreitungsresistenz vor.

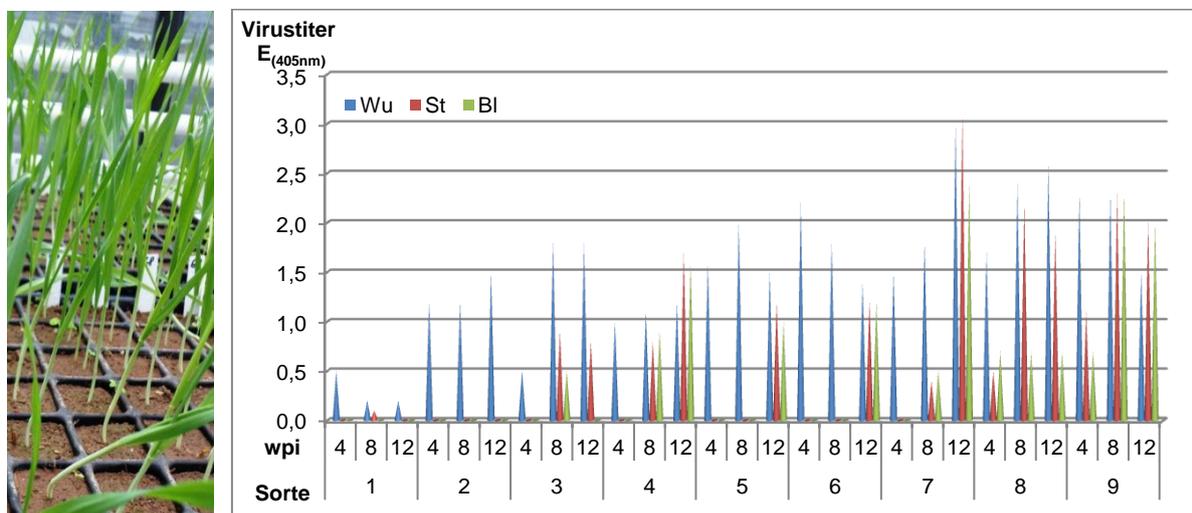


Abbildung 22: Nachweis von Resistenzreaktionen ausgewählter Triticale-Sorten/-Zuchtlinien in Wurzel (Wu), Stängel (St) und Blatt (Bl) 4, 8, und 12 Wochen nach Aussaat (wpi) gegen das Furovirus SBWMV-NY unter Gewächshausbedingungen
1-HORTENSO, 2-CARNAC, 3-BELLAC, 4-187/08 L505,
5-Loch469/GRENADO, 6-COLLEGIAL, 7-Fr6117/10, 8-AGRANO, 9-MODUS

Die Methode der Resistenzprüfung unter Gewächshausbedingungen ist sehr gut für die Bewertung der Resistenz gegen Furoviren geeignet. Sie ermöglicht, unter kontrollierten

Bedingungen einer Umwelt unterschiedliches Triticale-Material zu vergleichen und in frühen Entwicklungsstadien die Virusausbreitung in der Pflanze zu charakterisieren. Die Pflanzenentwicklung unter Befallsbedingungen kann im Gewächshaus nicht eingeschätzt werden.

Dahingegen sind unter Gewächshaus- und Klimakammerbedingungen keine gesicherten Bymovirus-Infektionen zu erreichen. Die Bewertung der WSSMV-Resistenz kann nur im Feld erfolgen.

1.4.2. Bewertung der Resistenz von Triticale gegen bodenbürtige Viren in verschiedenen Umwelten

Die Aussaat der Getreidesorten erfolgte von Ende September bis Mitte Oktober. Zur Bewertung der Virusresistenz wurden im Frühjahr (März bis April) Blattproben der jüngsten Entwicklungsstadien mittels DAS-ELISA mit polyklonalen Antiseren (Tab. 6) auf Virusbefall untersucht.

Tabelle 6: Polyklonale Antiseren zum Nachweis bodenbürtiger Viren

Virus	IgG	Verdünnung	Konjugat	Verdünnung
SBWMV	69 SB	1:100	69/2	1:1000
SBCMV	92/2	1:100	92 SB	1:2000
WSSMV	2 SB	1:100	2/1	1:1000

Für die vergleichende Bewertung der Resistenz von Triticale gegen bodenbürtige Viren in verschiedenen Umwelten wurde ein Differentialsortiment aus unterschiedlichen Getreidearten mit bekannten Resistenzreaktionen erstellt (Tab. 7) und in den Befallsstandorten gemeinsam mit den Prüfgliedern angebaut.

Die Reaktionen der Differentialsorten zeigen, dass die resistenten Winterweizensorten CADENZA und PLUTOS in 6 Umwelten gegen alle bodenbürtigen Viren Resistenz besitzen. Die anfällige Weizensorte CEZANNE ist hoch anfällig für alle Furovirusisolate und die beiden WSSMV-Isolate. Der anfällige JB ASANO hingegen zeigt Resistenz gegen das Bymovirus und Anfälligkeitsunterschiede gegen SBCMV-Isolate verschiedener Umwelten, was auf das Vorkommen von Pathotypen dieses Virus hindeuten kann. Für die SBWMV-Stämme ist auch JB ASANO hoch anfällig. Die beiden Durumweizen sind hoch anfällig für die Furoviren und unterscheiden sich in ihrer Bymovirus-Anfälligkeit. CICCIO ist gegen das WSSMV resistent und PESCADOU auch für dieses Virus anfällig.

Tabelle 7: Resistenzreaktionen von Getreidearten eines Differentialsortiments in verschiedenen Umwelten

Kultur	Resistenz	Sorten	Furoviren					Bymovirus	
			SBWMV-NY	SBWMV-N	SBCMV			WSSMV	
			Westerrade	Heddesheim	Gödnitz	Eickeloh	Negenborn	Gödnitz	Schleesen
WW	res	CADENZA	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
		PLUTOS	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	anf	CEZANNE	1,9	1,7	3,2	3,6	1,8	1,7	1,1
		JB ASANO	1,6	1,7	0,2	0,0	3,1	0,0	0,0
WD	anf	CICCIO	1,4	1,6	2,5	0,7	3,0	0,0	0,1
		PESCADOU	2,0	1,7	3,5	1,8	2,3	1,7	0,0
WT	anf	BELLAC	0,6	1,6	1,8	0,9	3,2	0,0	0,0
		SECONZAC	1,3	1,5	3,8	2,0	3,3	0,0	0,0
		SW VALENTINO	1,1	1,7	3,8	1,8	3,5	0,0	0,0
WR	pres	R.2501	1,5	0,4	3,7	0,1	0,9	0,0	0,2
	anf	OREGON	1,6	1,8	1,5	2,8	2,6	2,3	2,3

Die ausgewählten Triticale-Sorten haben Resistenz gegen das WSSMV und sind für alle Furoviren anfällig. Auch die als widerstandsfähig auffallende Sorte BELLAC zeigt zum Zeitpunkt der Probenahme mittlere bis hohe Virustiter. Ähnliche Befunde sind im Winterroggen zu beobachten. OREGON ist der anfällige Roggenstandard für alle Viren und die Akzession R2501, die häufig die Virusausbreitung nicht zulässt, war zum Zeitpunkt der Beprobung in fast allen Umwelten mit den Furoviren infiziert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein gut charakterisiertes Differentialsortiment hilfreich bei der Charakterisierung der Viruskontamination in Infektionsregionen ist. Die Erhebungen zur Virusinfektion beweisen in den ausgewählten Standorten eine homogene Virusverseuchung.

1.4.3. Bewertung des Europäischen Triticale-Sortiments auf Resistenz gegen bodenbürtige Viren

Von 30 Zuchtfirmen aus 12 Ländern wurden 130 europäischen Triticale-Sorten für die Bewertung auf Resistenz gegen bodenbürtige Viren bereitgestellt. Von diesen Sorten waren 62 nicht mit dem WSSMV infiziert und weitere 12 Sorten reagierten mit nur sehr geringen WSSMV-Virustitern. Den Bezug dieser Resistenz zum genetischen Hintergrund nachträglich herzustellen, ist sehr schwierig. Nach der ursprünglichen Roggen-Weizen-Kreuzung sind viele Sorten ein Produkt aus Multikreuzungen unterschiedlicher Triticale-Stämme, denen die Quelle der WSSMV-Resistenz nicht mehr zuzuordnen ist.

Diese 76 Sorten sind jedoch hoch anfällig für die Furoviren SBCMV und SBWMV. Nur 13 Sorten blieben gegen das SBCMV befallsfrei oder zeigten sehr niedrige Virustiter. Abwehrreaktionen gegen Furoviren wurden in nur 10 der 130 Sorten beobachtet (Tab. 8).

Tabelle 8: Resistenzreaktionen von Triticale-Sorten des Europäischen Sortiments gegen SBWMV-N, SBCMV und WSSMV in 2012

Genotyp	Furoviren				Bymovirus		Sorte	Furoviren				Bymovirus	
	Heddesheim SBWMV		Gödnitz SBCMV		Gödnitz WSSMV			Heddesheim SBWMV		Gödnitz SBCMV		Gödnitz WSSMV	
ABACO	3,2	3,1	1,2	1,1	0,0	0,6	MODERATO	2,3	2,3	1,1	0,3	0,0	0,2
ACCORD	2,7	2,7	0,5	1,6	1,0	0,0	MODUS	3,4	2,5	0,6	2,6	0,0	0,1
ACTIVO	2,2	3,1	1,3	2,5	0,0	0,0	MONTIJANO	3,6	0,3	0,5	0,0	1,2	0,5
AGOSTINO	2,7	0,3	1,9	0,0	1,9	1,7	MUNGIS	3,2	2,6	0,1	2,7	0,0	0,0
AGRANO	3,6	2,2	0,0	0,1	0,0	0,0	NAGANO	3,6	1,1	0,0	2,3	0,4	0,0
AGRILAC	2,7	0,0	1,6	3,0	1,8	1,7	NAZARET	0,2	1,3	0,4	1,0	0,0	0,0
ALTER	2,7	2,2	1,3	0,0	1,2	0,7	NILEX	3,5	0,9	0,5	0,3	1,4	0,5
AMARILLO 105	0,0	2,3	0,3	0,5	0,0	0,1	NOE	2,9	2,9	1,2	2,9	0,0	0,0
ATTILA	3,7	2,5	2,3	2,4	0,0	0,0	ORIGO	0,4	1,2	0,5	0,8	0,0	0,0
BEDRETTO	2,5	0,0	0,4	0,7	0,2	0,0	ORVAL	3,7	2,8	0,9	2,4	0,0	0,0
BELLAC	0,3	0,7	0,0	0,0	0,4	0,0	PARRENO	3,6	2,9	0,3	0,5	0,0	0,0
BENEFICIO	1,6	1,9	0,0	0,4	0,0	0,0	PERFEKT	0,6	2,2	0,6	0,6	0,0	0,2
BLANZAC	2,9	2,5	3,7	3,6	0,0	0,0	PIKY	3,0	2,3	1,2	2,5	1,9	1,5
BLENIO	3,7	0,2	0,3	1,9	1,7	0,3	PIZARRO	3,5	2,0	0,1	0,6	0,0	0,0
BRIO	2,3	1,0	0,2	0,1	0,0	0,1	PLAI	3,8	2,5	0,5	2,9	0,0	0,0
BRIZAC	0,2	0,8	0,0	0,5	1,6	0,2	POLEGO	0,4	2,0	0,4	0,8	1,0	0,3
BUMARANG	0,7	2,5	0,7	1,2	0,4	1,0	PRADER	3,6	2,0	0,5	2,3	0,0	0,0
CANDO	2,7	2,1	0,7	0,3	0,0	0,0	PRESTO	3,6	2,3	0,2	2,4	0,0	0,0
CARNAC	2,3	0,0	0,0	0,0	1,8	1,0	PROTINAC	0,1	2,5	2,6	0,0	1,7	1,1
CASCADOR F	3,5	2,3	1,8	2,3	0,0	0,1	PURDY	2,7	2,0	0,9	0,8	0,0	0,0
COLLEGIAL	0,1	2,4	1,2	0,1	0,7	0,6	RADKO	3,3	2,2	0,1	0,3	0,3	0,2
COLORIT	1,2	2,4	0,4	2,2	0,0	0,1	RAGTAC	2,8	2,5	1,0	3,6	0,3	0,0
COSINUS	3,5	2,3	0,0	1,5	0,2	0,1	RAKITA	3,7	2,5	1,0	2,1	1,0	0,0
CULTIVO	2,8	2,1	0,1	0,8	1,9	0,4	RESPEKT	2,4	2,1	2,6	2,2	0,0	0,6
DISCO	2,4	2,3	1,3	2,8	0,0	0,0	ROTEGO	1,4	0,4	0,7	1,3	1,4	2,0
DORENA	2,3	3,0	1,6	2,4	0,0	0,0	SANDRO	2,4	3,2	0,1	0,8	1,0	0,0
DUBLET	3,6	1,9	0,2	0,7	0,0	0,0	SAPIAC	0,9	2,3	1,7	1,7	0,0	1,3
DUSI	3,3	2,0	2,6	3,1	0,0	0,0	SECONZAC	0,6	0,2	0,7	3,5	0,0	0,0
ELDORADO	3,4	0,1	1,4	0,2	0,0	0,0	SENATRIT	2,7	2,8	0,6	2,0	1,6	0,9
ELPASO	1,9	2,0	0,3	2,8	0,0	0,0	SEQUENZ	3,0	1,8	0,4	0,9	0,0	0,0
FANGIO	2,4	2,2	0,4	2,3	0,0	0,0	SIERRA DE ALMARAZ	-	3,2	0,3	1,3	0,0	0,0
FIDELIO	1,8	2,2	0,1	0,2	0,0	0,0	SIRIUS	0,1	2,9	0,5	2,9	0,0	0,0
FREDRO	0,6	2,1	0,1	1,4	0,0	0,0	SOMTRI	2,8	0,2	1,2	1,2	1,8	2,1
FRONTEIRA	2,6	2,3	0,6	2,4	1,1	1,0	STIL	3,2	2,5	0,5	3,2	0,6	0,0
GALTJO	0,0	2,3	0,0	0,5	0,0	0,1	SW FALMORO	0,6	2,2	0,2	0,3	0,1	0,0
GNIEWKO	0,7	1,0	0,0	1,9	0,7	0,0	SW TALENTRIO	0,5	0,5	0,6	0,3	0,0	0,0
GORUN 1	0,3	2,0	2,4	2,4	0,0	0,0	SW VALENTINO	2,2	2,3	1,1	0,9	0,0	0,0
GRANADOR	2,6	2,0	1,6	2,8	0,6	0,8	TARZAN	3,3	2,6	0,8	3,1	0,0	0,0
GRANDVAL	2,3	2,3	2,3	0,8	0,0	0,0	TATRA	3,4	2,7	1,1	2,8	0,0	0,0
GRENADO	2,6	0,3	0,8	0,8	0,0	0,0	TAURUS	2,7	2,4	0,6	0,6	0,0	0,0
GRINGO	2,9	0,1	0,4	2,8	0,0	0,0	TENTUDIA	0,7	3,2	1,4	2,1	0,1	0,0
HAIKUK	3,7	2,2	2,2	0,5	0,0	0,0	TICINO	3,9	2,5	0,5	0,6	0,0	0,0
HORTENSO	3,9	0,6	0,1	1,0	0,3	0,0	TIMBO	2,5	2,2	1,7	0,6	0,0	0,0
INPETTO	1,1	0,6	1,5	1,6	2,0	1,9	TITAN	1,5	2,2	1,1	0,9	0,0	0,0
INTEGRAL	0,1	2,1	0,7	1,5	0,2	0,1	TIW 567 Trizeps 4(TIW L	3,2	2,3	0,9	0,0	0,4	0,0
KANDAR	3,3	2,2	1,1	0,9	0,0	0,6	TRADO	2,9	3,0	0,3	2,6	0,0	0,0
KENDO	2,9	2,2	1,5	2,6	0,1	0,0	TRIAMANT	1,9	0,9	1,3	0,4	0,0	0,6
KG BEREK	2,7	2,4	2,5	1,1	0,0	0,8	TRIDEL	2,7	3,1	1,5	0,9	0,1	0,0
KITARO	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	TRIGOLD	3,4	2,5	0,4	0,7	0,0	0,0
KOLOR	1,2	2,4	1,7	0,6	0,0	1,1	TRILSTAR	2,4	2,8	1,0	1,1	0,0	0,0
KORAL	3,6	2,2	0,4	2,8	0,0	0,0	TRIMESTER	3,1	0,3	0,0	0,0	0,7	0,0
KORPUS	0,3	2,5	1,8	0,7	0,0	0,8	TRIMMER	2,7	0,0	0,5	1,4	0,4	0,5
KORTEGO	2,3	2,2	2,0	1,6	2,2	1,8	TRINIDAD	0,0		0,0		1,1	
LAMBERTO	3,8	2,4	0,3	1,5	0,0	0,0	TRIOLE	3,2	3,3	0,1	1,0	1,3	0,7
LEGALO	1,5	2,3	1,2	1,9	1,2	0,8	TRISMART	3,1	2,4	0,8	1,9	0,0	0,0
LEONTINO	3,6	2,1	0,2	0,5	0,5	0,0	TRITIKON	3,3	2,9	0,5	3,1	0,1	0,0
LOGO	2,4	1,5	0,5	0,1	1,7	1,9	TULUS	2,7	3,1	0,0	0,1	0,4	1,4
MADILLO	2,9	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0	VERATO	2,4	3,1	0,2	0,5	0,0	0,0
MAGNAT	3,6	2,0	1,1	2,2	0,0	0,0	VERSUS	3,8	2,7	0,1	2,0	0,5	0,3
MASSIMO	2,2	0,4	0,3	0,1	1,9	1,9	VIHREN	3,0	2,5	1,8	2,7	0,9	0,4
MATINAL	2,6	2,3	0,5	0,7	0,0	0,8	VITALIS	3,5	3,1	0,6	2,5	0,0	0,0
MAXIMAL	2,4	1,9	0,1	2,0	0,0	0,0	VIVERO	2,7	2,4	2,2	1,0	1,5	1,5
MELENAC	1,9	2,2	0,8	2,8	1,8	1,3	VUKA	2,6	0,7	0,0	0,7	0,3	0,7
MERIDAL	3,7	3,3	1,0	1,6	0,1	1,2	WOLTARIO	3,9	0,0	0,8	0,5	0,0	0,0
MISIONERO	2,6	2,4	1,1	1,9	1,5	0,0	ZOLDER	0,2	3,0	1,3	1,0	0,0	0,0

Einige Sorten reagierten unterschiedlich auf die Inokulation mit Furoviren. So zeigten z.B. die Sorten BELLAC, BRIZAC, CARNAC und COLLEGIAL (Frankreich), AGRANO, TRIMESTER, TRINIDAD und TULUS (Deutschland) und HORTENSO (Polen) wiederholt Widerstandsfähigkeit gegen das SBCMV; sie waren jedoch hoch anfällig für das SBWMV-N. Ob die Ursache hierfür in Aggressivitätsunterschieden zwischen den Viren oder in unterschiedlichen Resistenzreaktionen gegen beide Viren besteht, muss in Modellversuchen geklärt werden. Die Sorten AMARILLO 105 (Deutschland) und BRIZAC mit mittlerer Anfälligkeit gegen Furoviren und HORTENSO zeigten zusätzlich Resistenz gegen das WSSMV. Eine gleichzeitige Resistenz gegen die beiden Furoviren SBCMV und SBWMV konnte in den geprüften Sorten nicht nachgewiesen werden.

Triticale-Sorten mit geringer Anfälligkeit für das SBCMV wurden bis 2015 in den Befallsflächen hinsichtlich des Virusbefalls in 5 Regionen mit unterschiedlicher Virusbelastung weiter beobachtet (Tab. 9). Am Standort Schleesen in Sachsen-Anhalt tritt das Bymovirus WSSMV einzeln auf, in Gödnitz in Sachsen-Anhalt ist das Versuchsfeld sowohl mit dem Bymovirus WSSMV als auch mit dem Furovirus SBCMV kontaminiert, in Eickeloh in Niedersachsen ist nur das Furovirus SBCMV vorhanden, in Heddesheim in Baden Württemberg kommt das Furovirus SBWMV-N und in Westerrade (Wester) in Schleswig-Holstein das SBWMV-NY vor.

Tabelle 9: Bewertung der Resistenz von Triticale-Sorten gegen bodenbürtige Viren mittels DAS-ELISA (Extinktions-Werte für den Virustiter von 0 bis 3, ng- nicht getestet) an Feldpflanzen im Zeitraum von 2012 bis 2015

Bewertung der Feldresistenz von Triticale-Sorten gegen bodenbürtige Viren in den Jahren 2012 bis 2015 [Virustiter (E_{405nm})]																	
Sorte	Virus Ort Jahr	Furoviren												Bymovirus WSSMV			
		SBWMV				SBCMV											
		Heddesheim		Wester		Gödnitz		Eickeloh		Gödnitz			Schleesen				
	12	13	15	14	15	12	13	14	15	12	13	14	15	12	13	15	
Frankreich																	
BELLAC	0	1	0	1	1	0	1	0	2	1	0	0	1	0	1	0	0
BRIZAC	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
CARNAC	1	0	0	1	2	0	1	0	2	0	0	0	1	0	3	1	0
COLLEGIAL	2	0	2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	2	2
Deutschland																	
AGRANO	1	2	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	ng
TRIMESTER	3	3	ng	2	ng	0	0	1	ng	0	0	0	ng	1	3	ng	ng
TRINIDAD	ng	2	ng	1	ng	ng	0	2	ng	ng	0	0	ng	ng	3	2	ng
TULUS	ng	3	2	2	2	ng	0	0	2	ng	0	0	0	ng	3	2	2
res. Standard																	
JKI-ZL	ng	0	1	0	0	ng	0	0	0	ng	0	0	-	ng	0	0	0
Polen																	
HORTENSO	ng	0	1	1	1	ng	0	0	0	ng	0	0	0	ng	0	0	0
anf. Standard																	
INPETTO	2	1	2	ng	ng	1	1	1	3	2	1	3	2	2	1	3	2

Die Virusinfektion wurde im zeitigen Frühjahr (März bis April) in Blattmischproben aus 4 Wiederholungen je Feld mittels DAS-ELISA ermittelt und der Virustiter (Extinktions-Werte) bei einer Wellenlänge von 405 nm ($E_{405\text{ nm}}$) gemessen.

Eine eindeutige Resistenz gegen die Furoviren konnte nicht beobachtet werden. Nur 9 von den 130 europäischen Triticale-Sorten zeigten ein geringes Befallsniveau durch Furoviren. Wie in den Feldversuchen beobachtet wurde, gibt es Abstufungen in den Virustitern infizierter Genotypen. Die Resistenzreaktionen der ausgewählten Sorten an unterschiedlichen Befallsstandorten bestätigten sich im Zeitraum der Versuchsjahre 2012 bis 2015.

1.4.4. Bewertung der Resistenzsituation gegen bodenbürtige Viren in Triticale

Während des Forschungsvorhabens wurden insgesamt 322 Triticale-Herkünfte in die Resistenzbewertung einbezogen, davon 193 Sorten und 129 Zuchtlinien. Die Bewertung erfolgte in Abhängigkeit von den klimatischen Bedingungen in den Versuchsfeldern in 3 bis 5 verschiedenen Umwelten. Während ca. 48% der untersuchten Sorten Resistenz gegen das WSSMV zeigten, war keine der Sorten immun gegen die Furoviren.

Anhand der Extinktions-Werte kann eine 4-stufige Boniturskala festgelegt werden, die eine subjektive Gruppierung der Stärke der Virusinfektion (Abb. 23) basierend auf Extinktions-Werten für den Virustiter, jedoch keine exakte Quantifizierung des Virusbefalls ermöglicht:

- 1 - resistent (immun) - $E_{405\text{ nm}} \leq 0,1$;
- 2 - geringe Anfälligkeit - $E_{405\text{ nm}} = 0,1$ bis $0,3$;
- 3 - mittlere Anfälligkeit - $E_{405\text{ nm}} = 0,3$ bis $1,0$;
- 4 - hohe Anfälligkeit - $E_{405\text{ nm}} \geq 1,0$.

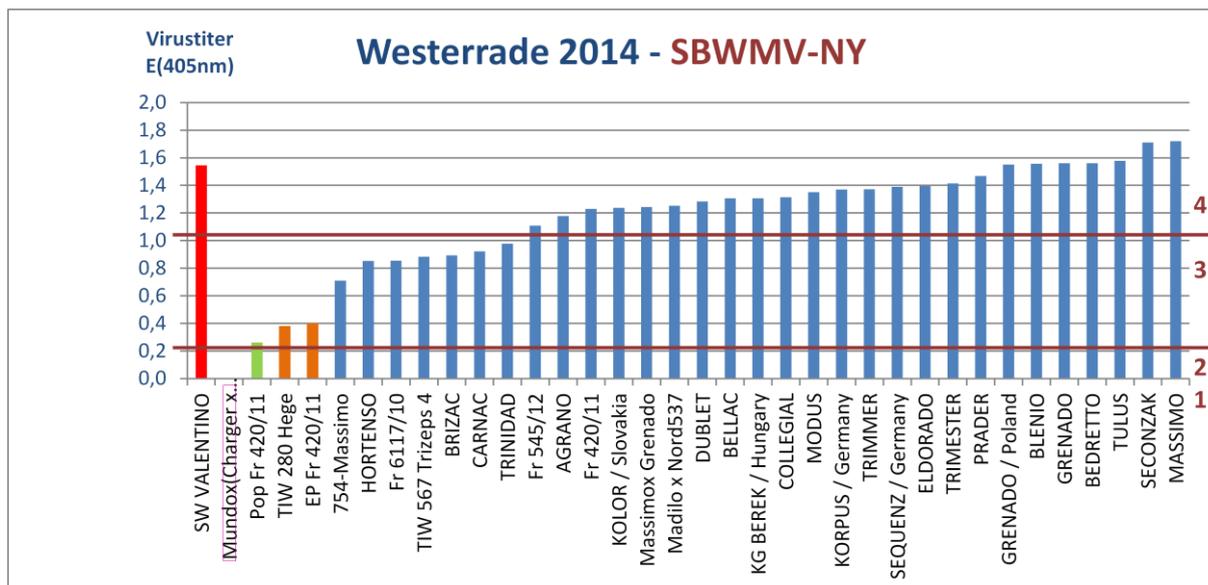


Abbildung 23: Gruppierung der Stärke der Virusinfektion in Triticale-Sorten und -Zuchtlinien anhand der Virustiter. 1- resistent, 2- geringe, 3- mittlere, 4- hohe Anfälligkeit, anfälliger Standard: SW Valentino (roter Balken)

Wie die Abbildung 23 verdeutlicht, zeigten die meisten Sorten im Frühjahr mittlere und hohe Virustiter. Ob diese Triticale im Verlaufe der Wachstumsphase den Virusfall verdrängen oder tolerieren können, wird in den Ergebnissen der Bonituren agronomischer Merkmale und den Ertragerhebungen in speziellen Parzellenversuchen im Bericht des Wirtschaftspartners demonstriert. Aus den Erhebungen des Wirtschaftspartners geht hervor, dass zwischen Virustitern und Virusbonituren eine hochsignifikante Korrelation besteht und die SBCMV-Titer negativ mit dem Kornertrag korrelieren. Bei für SBCMV hoch anfälligen Prüfgliedern wurde der Ertrag um ca. 25% und bei WSSMV infizierten Triticale um ca. 10% reduziert (Quelle:PZO).

Im Ergebnis unseres Resistenzscreenings wurden Unterschiede zwischen den Sorten im Virustiter (Signifikanz durch PZO bestätigt) und in der Aggressivität verschiedener Furoviren festgestellt.

Wie aus der Tabelle 7 ersichtlich wird, reagieren die Sorten BELLAC, BRIZAC, CRNAC, COLLEGIAL und HORTENSO mit sehr geringen Virustitern. Mit Ausnahme der Versuchsjahre 2013 und 2015 waren sie nicht mit dem SBCMV infiziert. Dahingegen wurden sie durch die Stämme des SBWMV fast regelmäßig infiziert und zeigten jedoch nur mittlere Virustiter. Auch die Bestimmung der RNS-Konzentration in den Blättern dieser Sorten bestätigt eine geringere Anfälligkeit gegen das SBCMV. Die RNS-Menge in BELLAC und BRIZAC liegt in den meisten Wiederholungen unter 10pg oder vereinzelt zwischen 10 und 100pg (siehe Abb. 20).

Auch innerhalb des Zuchtmaterials wurden Linien selektiert, die mit Resistenz gegen SBCMV und gegen WSSMV reagieren und anfällig für SBWMV sind. Zwei Zuchtlinien der PZO (EP Fr 420/11, Fr 670/13) sowie eine JKI-Linie (MH_MxC 316/5 - Dr. M. Herrmann, Groß Lüsewitz) zeichnen sich durch sehr geringe Virustiter bzw. Virusresistenz aus.

Da die gegenwärtig zugelassenen Triticale-Sorten keine Resistenzquellen gegen beide Furoviren enthalten, sind die neu selektierten Zuchtlinien von großer Bedeutung für die Entwicklung von virusresistenten und leistungsstarken Triticale-Sorten.

2. Verwertung

Wissenschaftlicher/technischer Nutzen

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde eine Reihe von neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen zum Pathogenspektrum bodenbürtiger Viren in Getreide und speziell in Triticale sowie zu deren Quantifizierung für die Resistenzbewertung in Triticale gewonnen.

Für den Nachweis der bodenbürtigen Viren und deren Vektor, *P. graminis*, wurden Methoden zur Detektion im Boden und in der Pflanze etabliert und optimiert. Der Nachweis im Boden ermöglicht unabhängig von der Getreidekultur Aussagen zum potentiellen Virus- und Vektor-Spektrum in den Anbauflächen.

Bei der Charakterisierung des Pathogenspektrums wurden Virusisolate durch Sequenzvergleich differenziert und phylogenetische Abstammung analysiert. In diesem Zusammenhang wurde in Schleswig-Holstein ein für Deutschland neuer Virusstamm des SBWMV, der New York-Stamm, nachgewiesen und seine Aggressivität für Getreidearten kommentiert.

Durch partielle Sequenzierung von SBCMV-Isolaten in Bereichen der RNS 1 und RNS 2 wurden deutsche und europäische Isolate differenziert. Deutsche Isolate wurden dem C-Typ und europäische Isolate dem O-Typ zugeordnet. Beim Vergleich ihrer Aggressivität für Getreidearten wurde beobachtet, dass die in Deutschland vorkommenden C-Typen des SBCMV Triticale und Roggen stark schädigen aber weniger aggressiv für Weizen sind. Die O-Typ-Isolate hingegen sind auch für Weizen sehr infektiös. Diese Befunde belegen das Vorkommen von Pathotypen des SBCMV.

Der Sequenzvergleich von WSSMV-Isolaten ist nur eingeschränkt möglich, weil nur 4646 Nukleotide im 3'-Bereich der RNS 1 bekannt sind. Während des Forschungsvorhabens wurden weiter 253 Nukleotide im 5'-Bereich der RNS 1 sequenziert. Weiterhin wurden die Isolate aus den Befallsregionen analysiert. Es wurde festgestellt, dass bei den meisten deutschen Isolaten eine Insertation von 3 Aminosäuren vorlag, die in amerikanischen und französischen Isolaten fehlte. Auch für dieses Virus ist aufgrund der Aminosäure-Diversität anzunehmen, dass Pathotypen existieren.

Boden- und Getreidewurzel-Proben wurden hinsichtlich des Vorkommens des Virusvektors *P. graminis* untersucht, die Diversität der formae speciales analysiert und mit eingetragenen Datenbanksequenzen verglichen und um ein Set von 15 *P. graminis*-Sequenzen aus den deutschen Befallsgebieten ergänzt. Im Ergebnis der Analyse zum Vorkommen der Vektor-Species in verschiedenen Getreidearten und der übertragenen Viren stellte sich heraus, dass die unterschiedlichen Isolate der bodenbürtigen Viren unserer Befallsregionen unabhängig von der *P. graminis* formae speciales und unabhängig von der Getreidekultur ihre Wirtspflanzen infizieren.

Da in Triticale keine Resistenzen gegen bodenbürtige Viren bekannt waren, bestand die Notwendigkeit den Pathogen-Befall in unterschiedlichem Zuchtmaterial und in Sorten zu quantifizieren, um quantitative Abstufungen für die Entwicklung widerstandsfähiger Sorten nachzuweisen. Die Real-Time qPCR für die Quantifizierung des SBWMV, SBCMV, WSSMV und *P. graminis* f.sp. *temperata* und *tepida* wurde etabliert und optimiert. Die Quantifizierung des Pathogenbefalls in Triticale erfolgte an Feldpflanzen unterschiedlicher Anbauggebiete in Parallelproben zum DAS-ELISA. Auf Basis von RNA- und DNA- Konzentrationsstufen wurden Resistenzgruppen für Triticale erstellt.

Die Bewertung der Virusresistenz in Triticale erfolgte erstmals in dem Europäischen Sortiment, in Sortimenten und Zuchtmaterial des Wirtschaftspartners in Feldversuchen in bis zu 5 Umwelten. Es wurde die Resistenzsituation in Triticale beschrieben und festgestellt, dass ca. 60% der EU-Sorten Resistenz gegen das Bymovirus besitzen und alle anfällig sind für die Furoviren. Nur wenige Sorten und Zuchtlinien zeichnen sich mit geringer Anfälligkeit für Furoviren aus. In diesem Material konnte gezeigt werden, dass eventuell eine Translokationsresistenz vorhanden ist, die sich durch verzögerte Ausbreitung der Viren in die oberirdischen Pflanzenteile und niedrige Virustiter auszeichnet. Im Rahmen der Selektion auf Virusresistenz konnten Zuchtlinien evaluiert werden, die in Zuchtprogramme aufgenommen wurden und die Basis für die Züchtung virusresistenter und leistungsstarker Triticalesorten bilden.

Wissenschaftlich/technische Erfolgsaussichten

Die wissenschaftlichen Erfolgsaussichten bestehen in der Erweiterung von Kenntnissen zum Vorkommen, zur molekularbiologischen und biologischen Charakterisierung der Pathogene. Es wurden Anhaltspunkte für die weitere Aufklärung der Rolle von Pathotypen im Infektionsgeschehen erarbeitet. Mit der Entwicklung der pathogenspezifischen quantitativen Real-Time PCR kann die Resistenzbewertung wesentlich sicherer durchgeführt werden.

Mit den neuen Erkenntnissen über das Pathogen-Spektrum und die Resistenzsituation in Triticale wurden Grundlagen für eine gezielte und pathogenspezifische Resistenzprüfung geschaffen. Weiterhin wurden die Voraussetzungen für die Quantifizierung von Virus- und Vektor-Infektionen in Triticale entwickelt und in der praktischen Selektion auf Resistenz angewendet. Somit konnten putative Resistenzquellen selektiert und in Zuchtprogramme aufgenommen werden.

3. Erkenntnisse von Dritten

Während der Laufzeit des Forschungsvorhabens wurden dem Zuwendungsempfänger keine neuen Forschungsergebnisse zur Epidemiologie bodenbürtiger Viren in Triticale und keine Fortschritte in der Entwicklung von virusresistenten Triticale-Sorten mit hohen Biomasseerträgen für die Biogas- und Ethanolgewinnung bekannt.

4. Veröffentlichungen

Publikationen zum Forschungsvorhaben

- Kastirr, U., Ziegler, A., Perovic, D., Golecki, B. (2012) Vorkommen des *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV-NY) in Schleswig-Holstein und dessen Bedeutung für den Weizenanbau. Journal für Kulturpflanzen 64, 469-477.

- Ziegler, A., Golecki, B., Kastirr, U. (2013) Occurrence of the New York strain of *Soil-borne wheat mosaic virus* in Northern Germany. *Journal of Phytopathology* 161, 290-292.
- Ziegler, A., Klingebiel, K., Papke, V., Kastirr, U. (2014) Quantification of *Wheat spindle streak mosaic virus* and *Soil-borne cereal mosaic virus* in resistance testing of field samples of triticale using real-time RT-PCR. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 121, 149-155.
- Ziegler, A., Fomitcheva, V., Zakri, A.M., Kastirr, U. (2016) Occurrence of *Polymyxa graminis* ribotypes in Germany and their association with different host plants and viruses. *Cereal Research Communications*, DOI; 10.1556/0806.43.2015.051.
- Kastirr, U., Ziegler, A. (2015) Getreideviren machen sich breit. *Land & Forst*, 168, 16, 23-25.
- Kastirr, U. (2013) Vorkommen bodenbürtiger Viren, Auswirkungen und Resistenzverhalten der Sorten. *RAGT – Saaten Information*, 2, 4-5.
- Perovic, D., Kastirr, U., Deavaux, P., Koch, M., Ordon, F. (2015) Marker saturation of the Sbm1 locus in hexaploid wheat conferring resistance to SBCMV and SBWMV using the 90K iSelect array and KASP technology. XVIII. International Plant Protection Congress – Mission possible: food for all through appropriate plant protection. 24.-27.8.15, Berlin, Germany
- Kastirr, U., Ziegler, A. (2016) Erfassung des Vorkommens bodenbürtiger Viren in Weizen, Triticale und Roggen. *Informationsblatt des JKI für den Pflanzenschutz*

Sequenzdaten, die an Datenbanken eingereicht wurden

- GenBank Accession KT275169.1: *Wheat spindle streak mosaic virus* strain New York state polyprotein gene, partial cds; 826 bp linear RNA
- GenBank Accession KJ609243.1: *Wheat spindle streak mosaic virus* isolate Aschersleben polyprotein gene, partial cds; 253 bp linear RNA
- GenBank Accession JX468082.1: *Soil-borne wheat mosaic virus* isolate SBW-SH1-4 read-through protein gene, partial cds; 668 bp linear RNA
- GenBank Accession JX468081.1: *Soil-borne wheat mosaic virus* isolate SBW-SH1-3 read-through protein gene, partial cds; 668 bp linear RNA
- GenBank Accession KU554714: *Wheat spindle streak mosaic virus* isolate Schleesen, polyprotein partial cds; 815 bp linear RNA
- GenBank Accession KU554715: *Wheat spindle streak mosaic virus* isolate Stubbum (Denmark), polyprotein partial cds; 820 bp linear RNA
- GenBank Accession KU554716: *Wheat spindle streak mosaic virus* isolate Pray (France), polyprotein partial cds; 816 bp linear RNA
- European Nucleotide Archive: Environmental set of 15 *P. graminis* sequences. <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LN651065-LN651079>

III. Literaturverzeichnis

- Bauer, E. (2008): Bodenbürtige Viren bei Roggen und Triticale – Entwicklung eines künstlichen Infektionstests und Untersuchungen zur Genetik der Resistenz. Abschlussbericht des BMELV-Projektes 01HS067, Universität Hohenheim, Landessaatzuchtanstalt.
- Brierley, J.L., Sullivan L., Wale, S.J., Hilton A.J., Kiezebrink, D.T., Lees, A. (2013): Relationship between *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranean* soil inoculum level, host resistance and powdery scab on potato tubers in the field. *Plant Pathology* 62, 413-420.

- Carroll, J. E.; Gray, S. M.; Bergstrom, G. C. (1995): Use of Antiserum to A New-York Isolate of *Wheat Spindle Streak Mosaic-Virus* to Detect Related Bymoviruses from North-America, Europe, and Asia. *Plant Disease*, 79, 346 - 353.
- Deb, M.; Anderson, J. M. (2008): Development of a multiplexed PCR detection method for Barley and Cereal yellow dwarf viruses, *Wheat spindle streak virus*, *Wheat streak mosaic virus* and *Soil-borne wheat mosaic virus*. *Journal of Virological Methods*, 148, 17 – 24.
- Delfosse, P.; Reddy, A. S.; Legerve, A.; Devi, K. T.; Abdurahman, M. D.; Maraite, H.; Reddy, D. V. (2000): Serological methods for the detection of *Polymyxa graminis*, an obligate root parasite and vector of plant viruses. *Phytopathology*, 90, 537 - 545.
- Driskel, B.A., Doss, P., Littlefield, L.J., Walker, N.R., Verchot-Lubicz, J. (2004) *Soilborne wheat mosaic virus* movement protein and RNA, and WSSMV coat protein accumulate inside resting spores of their vector, *P. graminis*. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 17, 739-748.
- Fomitcheva, V.; Kastirr, U.; Habekuß, A.; Kühne T (2008): Diagnostic multiplex RT-PCR analysis for the detection of soil-borne mosaic viruses and their natural vector *Polymyxa graminis*. Book of abstracts of 7th IWGPV Symposium, 1.-4. September 2008, Quedlinburg, Germany, 41.
- Goetz, R., Huth, W. (2005) Molecular comparison of soil-borne cereal mosaic virus isolates originating from Germany and France. Proc. of the 6th Symposium of the Intern. Working Group on plant viruses with fungal vectors. Univ. di Bologna, Bologna, Italy, 7-7Sept., 2005, 63-66.
- Huth, W., Götz, R., Lesemann, D.-E. (2007): Unterschiedliche Formen der Resistenz gegen bodenbürtige Viren des Weizens. *Gesunde Pflanzen* 59, 29-39.
- Kanyuka, K., Ward, E., Adams, M.J. (2003) *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. *Mol Plant Pathol* 4, 393-406.
- 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 (Occurrence of the vectors of *barley yellow mosaic virus* and *beet necrotic yellow vein virus* in the German Democratic Republic and multiplication on their host plants – first results). *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 24, 93-101.
- Kastirr, U.; Rabenstein, F.; Kühne, T. (2005a): Epidemiological aspects of soil-borne viruses of wheat, triticale and rye in Germany. Book of abstracts of 6th IWGPV Symposium, 5.-7. September 2005, Bologna, Italy, 40.
- Kastirr, U.; Schachschneider, R.; Hammann, T.; Wortmann, H. (2005b): Investigation of resistance to soil-borne viruses in wheat, triticale and rye. Book of abstracts of Xth Conference on Viral Diseases of Gramineae in Europe, 12.-14. September 2005, Louvain-la-Neuve, Belgium, 56.
- Koenig, R., Huth, W. (2003) Natural infection of wheat by the type strain of *Soil-borne wheat mosaic virus* in a field in Southern Germany. *European Journal of Plant Pathology* 109, 191-193.
- Koenig, R., Pleij, C.W., Huth, W. (1999) Molecular characterization of a new furovirus mainly infecting rye. *Arch. Virology* 144, 2125-2140.
- Legreve, A., Delfosse, P., Maraite, H. (2002) Phylogenetic analysis of *Polymyxa* species based on nuclear 5.8S and internal transcribed spacers ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* 106, 138-147.
- Merz, U. (1995) PMTV-like particles inside resting spores of *S. subterranea*. *J. Phytopathology* 143, 731-733.
- Mutasa-Gottgens, E. S., Chwarzczynska, D.M., Hasley, K., Asher, M. J. C. (2000): Specific polyclonal antibodies for the obligate plant parasite *Polymyxa* – a targeted recombinant DNA approach. *Plant Pathology* 49, 276 - 287.
- Obermeier, C.; Pfeilstetter, E.; Kastirr, U.; Lesemann, D.-E.; Burgermeister, W. (1995): Detection of *Polymyxa betae* in sugar beet roots by molecular techniques. Book of abstracts of International Symposium, 75 Years of Phytopathological and Resistance Research at Aschersleben, Aschersleben, 12.-16. Juni, 1995, 366 - 369.
- Ohki, T., Netsu, O., Kojima, H., Sakai, J., Onuki, M., Maoka, T., Shirako, Y., Sasaya, T. (2014): Biological and genetic diversity of *wheat yellow mosaic virus* (genus Bymovirus). *Phytopathology* 104, 313-319.
- Proeseler, G., Stanarius, A. (1983) Detection of *wheat spindle streak mosaic virus* in the GDR. *Archives f. Phytopathologie und Pflanzenschutz* 19, 345-349.
- Rabenstein, F.; Muhlheim, H.; Kastirr, U.; Kuhne, T. (2005): Monoclonal antibodies for differentiation between *Soil-borne cereal mosaic virus* and *Soil-borne wheat mosaic virus*. Proceedings of the Sixth Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Alma Mater Studiorum Universita di Bologna, Bologna, Italy, 5-7 September, 2005, 55 – 58.
- Ratti, C.; Budge, G.; Ward, L.; Clover, G.; Rubies-Autonell, C.; Henry, C. (2004): Detection and relative quantitation of *Soil-borne cereal mosaic virus* (SBCMV) and *Polymyxa graminis* in winter wheat using real-time PCR (TaqMan (R)). *Journal of Virological Methods*, 122, 95 – 103.
- Reif, J.C. (2009): Optimierung von Getreide für die Biogasnutzung. Teilvorhaben 2: Triticale - Eine Energiepflanze

- für die Biogasnutzung. Abschlussbericht zum BMELV-Projekt FKZ 22021205, Universität Hohenheim, Landessaatzuchtanstalt.
- Rotenberg, D., Bockus, W.W., Whitfield, A.E., Hervey, K., Baker, K.D., Ou, Z., Laney, A.G., De Wolf, E.D., Appel, J.A. (2016) Occurrence of viruses and associated grain yields of paired symptomatic and nonsymptomatic tillers in Kansas winter wheat fields. *Phytopathology* 106, 202-210.
- Smith, M.J., Adams, M.J., Ward, E. (2013) Ribosomal DNA analyses reveal greater sequence variation in *Polymyxa* species than previously thought and indicate the possibility of new ribotype-host-virus associations. *Envir Microbiol Reports* 5, Special Issue SI, 143-150.
- Senn, T. (2010): Untersuchungen zur Verwendung von Triticale als Rohstoff für die Ethanolproduktion. Zwischenbericht zum BMELV-Projekt FKZ 22006405, Universität Hohenheim, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie.
- Sohn, A., Schenk, P., Signoret, P.A., Schmitz, G., Schell, J., Steinbiß, H.H. (1994) Sequence analysis of the 3'-terminal half of RNA1 of *wheat spindle streak mosaic virus*. *Archives of Virology* 135, 279-292.
- Trzmiel, K., Jezewska, M., Zarzynska, A. (2012) First report of *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) infecting triticale in Poland. *Journal of Phytopathology* 160, 614-616.
- Vaianopoulos, C.; Legreve, A.; Moreau, V.; Bragard, C. (2009): Broad-spectrum detection and quantitation methods of *Soil-borne cereal mosaic virus* isolates. *Journal of Virological Methods*, 159, 227 – 232.
- Ward, E., Adams, M.J., Mutasa, E.S., Collier, C.R., Asher, M.J.C. (1994) Characterization of *Polymyxa* species by restriction analysis of PCR-amplified ribosomal DNA. *Plant Pathol.* 43, 872-877.
- Ward, E., Adams, M. (1998) Analysis of ribosomal DNA sequences of *Polymyxa* species and related fungi and the development of genus- and species-specific PCR primers. *Mycol. Res.* 102, 965-974.
- Ward, E., Kanyuka, K., Motteram, J., Korniyukhin, D., Adams, M.J. (2005) The use of conventional and quantitative real-time PCR assays for *Polymyxa graminis* to examine host plant resistance, inoculum levels and intraspecific variation. *New Phytologist* 165, 875-885.

Dr. Ute Kastirr (WD)

Quedlinburg, den 25. August 2016

„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 164, 2012: Fachgespräch: „Kupfer als Pflanzenschutzmittel“ Berlin-Dahlem, 1. Dezember 2011. Bearbeitet von Stefan Kühne, Britta Friedrich, Peter Röhrig, 102 S.
- Heft 165, 2012: Nationaler Aktionsplan zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln – Bericht 2008 bis 2011. Bernd Hommel, 162 S.
- Heft 166, 2012: Netz Vergleichsbetriebe Pflanzenschutz - Jahresbericht 2011 - Analyse der Ergebnisse der Jahre 2007 bis 2011. Bearbeitet von Bernd Freier, Jörg Sellmann, Jürgen Schwarz, Bettina Klocke, Eckard Moll, Volkmar Gutsche, Wolfgang Zornbach, 104 S.
- Heft 167, 2012: Fünftes Nachwuchswissenschaftlerforum 2012, 4. - 6. Dezember in Quedlinburg, 50 S.
- Heft 168, 2013: Untersuchungen zur Bildung von Furocumarinen in Knollensellerie in Abhängigkeit von Pathogenbefall und Pflanzenschutz. Andy Hintenaus, 92 S.
- Heft 169, 2013: Pine Wilt Disease, Conference 2013, 15th to 18th Oct. 2013, Braunschweig / Germany, Scientific Conference, IUFRO unit 7.02.10 and FP7 EU-Research Project REPHRAME – Abstracts –. Thomas Schröder, 141 S.
- Heft 170, 2013: Fachgespräch: „Kupfer als Pflanzenschutzmittel“, Berlin-Dahlem, 7. Dezember 2012. Bearbeitet von Stefan Kühne, Britta Friedrich, Peter Röhrig, 89 S.
- Heft 171, 2013: Sechstes Nachwuchswissenschaftlerforum 2013, 27. - 29. November in Quedlinburg - Abstracts - , 52 S.
- Heft 172, 2013: Netz Vergleichsbetriebe Pflanzenschutz, Jahresbericht 2012, Analyse der Ergebnisse der Jahre 2007 bis 2012. Bearbeitet von Bernd Freier, Jörg Sellmann, Jörn Strassemeyer, Jürgen Schwarz, Bettina Klocke, Hella Kehlenbeck, Wolfgang Zornbach, 111 S.
- Heft 173, 2014: Statusbericht Biologischer Pflanzenschutz 2013. Johannes A. Jehle, Annette Herz, Brigitte Keller, Regina G. Kleespies, Eckhard Koch, Andreas Larem, Annegret Schmitt, Dietrich Stephan, 117 S.
- Heft 174, 2014: 47th ANNUAL MEETING of the SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY and INTERNATIONAL CONGRESS ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 176 S.
- 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.

