

---

## Sektion 10

### Molekulare Phytomedizin / Virologie / Bakteriologie / Mykologie II

---

#### **10-1 - Bestimmung der ersten vollständigen Sequenz eines *Turnip yellows virus* Isolates aus Raps deutscher Herkunft und Herstellung eines infektiösen cDNA-Vollängenklons mittels Gibson-Assembly zur Agrobacterium vermittelten Infektion**

*Determination of the first complete sequence of a Turnip yellows virus isolate from oilseed rape of German origin and construction of an infectious cDNA full-length clone via Gibson assembly for agrobacterium mediated infection*

**Roxana Hossain, Veronika Wetzel, Muhammad Ahmad, Dennis Knierim, Wulf Menzel, Mark Varrelmann**

Institut für Zuckerrübenforschung, Abteilung Phytomedizin, Holtenser Landstraße 77, 37079 Göttingen

*Turnip yellows virus* (TuYV), ein Polerovirus aus der Familie der *Luteoviridae*, das über Blattläuse übertragen wird, verursacht ernstzunehmende Ertragsverluste im Rapsanbau in Deutschland, seit die insektizide Saatgutbeizung zur Vektorkontrolle fehlt. Neben Raps infiziert das Virus auch weitere Kulturarten wie verschiedene Kohlartern, Salat, Spinat, Erbse, Bohne und Senfarten, allerdings ist der Wirtspflanzenkreis bisher nur unvollständig bestimmt. Das Virus wird am effektivsten über die Blattlausart *Myzus persicae* mithilfe eines persistenten, zirkulativen, nicht-progativen Mechanismus übertragen. Rapspflanzen deutscher Herkunft, in denen mittels ELISA eine Polerovirusinfektion nachgewiesen werden konnte, wurden für eine Tiefsequenzierung aus Gesamt-RNA Extrakten eingesetzt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass in dem getesteten Rapsmaterial eine Mischinfektion aus mindestens zwei verschiedenen TuYV-Isolaten vorkommt. Des Weiteren konnten über die Tiefsequenzierung zwei Satelliten-RNAs identifiziert werden, die man bisher nur im Zusammenhang mit einer *Beet western yellows virus* (BWYV) Infektion kannte. Mithilfe von „Rapid amplification of cDNA ends“ (RACE) konnte die Gesamtsequenz eines der TuYV Isolate bestimmt werden. Damit ist diese die erste vollständige Sequenz eines europäischen Raps-Isolates. Ein Vergleich mit bekannten TuYV Isolaten divergenter Wirte und Herkunft ergab eine zu 96%ige Sequenz-Übereinstimmung mit einem südafrikanischen Isolat aus *Brassica oleracea*. Um die Pflanze-Virus Interaktion besser zu erforschen, wurde ein infektiöser cDNA-Vollängenklon hergestellt, indem mittels RT-PCR das vollständige TuYV Genom in einem cDNA Fragment (5681 bp) amplifiziert und mittels Gibson-Assembly in einen binären Vektor unter Kontrolle des 35S-Promotor und des HDV-Ribozyms für eine Agrobakterien vermittelte Infektion kloniert wurde. Die Infektiosität des Klons wurde in der experimentellen Wirtspflanze *Nicotiana benthamiana* nachgewiesen. Die Blattinfiltration führte zu lokalen Nekrosen und einer systemischen Ausbreitung des Virus, die mittels ELISA und Western Blot mit Polerovirus spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden konnte. Damit eröffnet dieser TuYV cDNA Klon die Möglichkeit einen Resistenztest für Rapsorten ohne den Einsatz des Virusvektors zu etablieren, nicht nur um neue Resistenzquellen zu identifizieren sondern diese auch detailliert zu charakterisieren. Des Weiteren soll aufgeklärt werden, welche Bedeutung die Satelliten-RNAs für die Infektion sowie die Symptomausprägung in Raps haben, indem auch hier

cDNA Klone hergestellt werden sollen, die mithilfe von Agrobakterien zusammen mit dem TuYV Klon in die Pflanzen injiziert werden sollen.

### **10-3 - Untersuchungen zur Verbreitung von Vergilbungsviren der Zuckerrübe**

*Studies on the occurrence of yellowing viruses in sugar beet*

**Wulf Menzel<sup>1</sup>, Mark Varrelmann<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Leibniz Institut DSMZ, Inhoffenstraße 7b, 38124 Braunschweig

<sup>2</sup>Institut für Zuckerrübenforschung, Abteilung Phytomedizin, Holtenser Landstraße 77, 37079 Göttingen

Seit Mitte der 1990er Jahre werden die durch Blattläuse übertragenen Vergilbungsviren der Zuckerrübe erfolgreich durch Saatgutbeizungen mit Insektiziden aus der Gruppe der Neonikotinoide kontrolliert. Dies hat dazu geführt, dass in den letzten Jahrzehnten in Zentraleuropa keine Daten über die Verbreitung der Viren und mögliche Ertragsverluste aktueller Zuckerrübensorten erhoben wurden. Veranlasst durch die aktuelle Diskussion über ein mögliches Verbot der Neonikotinoide, auch in der Saatgutbeizung bei Zuckerrüben, werden in einem durch das BMEL geförderten Projekt in Zusammenarbeit mit Zuckerrübenzüchtungsunternehmen diese Daten erhoben, um alternative Kontrollstrategien zu entwickeln und bei Bedarf gezielte Entscheidungen in der Resistenzzüchtung treffen zu können. In einem ersten Survey im Jahr 2017 wurden über 2200 Blattproben aus 10 europäischen Ländern mittels ELISA spezifisch auf das *Beet yellowing virus* (BYV, Gattung Closterovirus) und das *Beet mosaic virus* (BtMV, Gattung Potyvirus) getestet. In einem weiteren ELISA Test wurden die Proben auf eine Infektion mit den Zuckerrüben infizierenden Pöleroviren untersucht. Zusammenfassend wurde das BYV mit 308 positiven Proben am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von 99 Pölerovirus-positiven Proben. Das BtMV wurde in lediglich 18 Proben identifiziert. Ein großer Teil der Proben wurde zufällig genommen, da keine eindeutigen Symptome im Feld erkennbar waren. Des Weiteren war in einigen symptomatischen Proben keines der oben genannten Viren im ELISA nachweisbar, die mittels NGS untersucht werden.

### **10-4 - Neuartige Emaraviren in Laubgehölzen Europas – Beispiele aus Eschen und Felsenbirnen**

*Novel emaraviruses in woody host species in Europe – Examples from European Ash and Amelanchier sp.*

**Susanne von Barga<sup>1</sup>, Max Tischendorf<sup>1</sup>, Jean-Sébastien-Reynard<sup>2</sup>, Hans-Peter Mühlbach<sup>3</sup>, Thomas Brand<sup>4</sup>, Jenny Roßbach<sup>1</sup>, Carmen Büttner<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin. [phytomedizin@agr.ar.hu-berlin.de](mailto:phytomedizin@agr.ar.hu-berlin.de)

<sup>2</sup>Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil, Route de Duillier 50, Case Postale 1012, CH-1260 Nyon 1

<sup>3</sup>Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek, Ohnhorststr. 18, D-22609 Hamburg.

<sup>4</sup>Landwirtschaftskammer Niedersachsen, Pflanzenschutzamt, Sedanstr. 4, D-26121 Oldenburg

Mittels Hochdurchsatzsequenzieretechniken werden zunehmend neue Pflanzenviren in bedeutenden Kulturpflanzen identifiziert (Massart et al. 2017). In vielen Gehölzarten sind offenbar solche neuartigen Viren weit verbreitet, die vermutlich der Gattung *Emaravirus* (Fam. *Fimoviridae*, Ord. *Bunyavirales*) zuzuordnen sind. Diese Viren bilden

membranumhüllte Partikel mit einem segmentierten ss(-)RNA-Genom und werden durch Gallmilben übertragen (Mielke-Ehret und Mühlbach 2012). Die Typspezies dieser Virusgruppe ist das Eberescheringfleckenvirus (*European mountain ash ringspot-associated emaravirus*, EMARaV), von dem bisher vier Genomsegmente beschrieben wurden (Mielke und Mühlbach 2007). Die Applikation der neuen molekularen Techniken ermöglichte die Identifikation zusätzlicher Genomsegmente in diesem europaweit in Ebereschbeständen verbreiteten Virus sowie die Identifikation neuer Wirte in Deutschland (von Barga et al. 2018). Neben den auffälligen Blattsymptomen wie chlorotischen Ringflecken, Linienmustern sowie Scheckung teilweise in Verbindung mit Nekrosen, zeigen EMARaV-infizierte Ebereschen oft über die Jahre Degenerationen und sterben mitunter ab. Die genetische Organisation sowie Daten zur Verbreitung von Vertretern der Emaraviren in Ebereschen (*Sorbus aucuparia*), Felsenbirnen (*Amelanchier* sp.) und Eschen (*Fraxinus* spp.) des städtischen Grüns und im Forst in Deutschland und an weiteren europäischen Standorten werden vorgestellt und bewertet.

#### Literatur

- Massart, S., T. Candresse, J. Gil, C. Lacomme, L. Predajna, M. Ravnikar, J.-S. Reynard, A. Rumbou, P. Saldarelli, D. Škoric, E. J. Vainio, J. P. T. Valkonen, H. Vanderschuren, C. Varveri, T. Wetzel 2017: A Framework for the Evaluation of Biosecurity, Commercial, Regulatory, and Scientific Impacts of Plant Viruses and Viroids Identified by NGS Technologies. *Front. Microbiol.* **8**, 45.
- MIELKE-EHRET, N., H.-P. MÜHLBACH 2012: Emaravirus: A Novel Genus of Multipartite, Negative Strand RNA Plant Viruses. *Viruses* **4**, 1515-1536.
- MIELKE, N., H.-P. MÜHLBACH 2007: A novel, multipartite, negative-strand RNA virus is associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *J Gen. Virol.* **88**, 1337-1346.
- von Barga S., M. Tischendorf, C. Büttner 2018: First report of European mountain ash ringspot-associated virus in serviceberry (*Amelanchier* spp.) in Germany, *New Disease Reports* **37**, 19.

## 10-5 - Allexiviren in Knoblauch: Virusvielfalt und Vektoren

### *Allexiviruses of garlic: virus diversity and vectors*

**Katja R. Richert-Pöggeler<sup>1</sup>, Dirk Schmalowski<sup>1</sup>, Sabine Schuhmann<sup>1</sup>, Christina Maaß<sup>1</sup>, Nadine Liebig<sup>2</sup>, Sonja Lange<sup>3</sup>, Christine Nagel<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Braunschweig

<sup>2</sup>Bioland e.V., Visselhövede

<sup>3</sup>Kultursaat e.V., Echzell-Bingenheim

Knoblauch (*Allium sativum* L. fam. Alliaceae) enthält mehr als 2000 biologisch aktive Substanzen, die seit Jahrtausenden vom Menschen in der Ernährung und zur Krankheitsabwehr genutzt werden. Trotz der Eigenschaften als Heilmittel kann die Knoblauchpflanze selbst von diversen Schaderregern (Pilzen, Nematoden, Arthropoden) sowie Viren befallen werden. Das für den Anbau erforderliche und im weltweiten Handel zu erhaltende Pflanzgut wird vegetativ vermehrt. Im September 2016 wurde das BLE-Projekt 2818209017 mit dem Titel „Entwicklung von Verfahren zur Reduzierung virusbedingter Qualitätsmängel bei Züchtung und Vermehrung von Knoblauchpflanzgut“ begonnen. Das Knoblauchpflanzgut verschiedener europäischer Sorten bzw. Herkünfte wurde an zwei Standorten im Norden und in der Mitte Deutschlands (Dörverden-Westen und Lindewerra) auf zwei Betrieben mit ökologischer Landwirtschaft gepflanzt. Vor der Pflanzung im Feld wurden die Zehen auf das Vorhandensein von Allexiviren sowie Poty- und Carlaviren mit Hilfe serologischer Methoden (IEM) im Elektronenmikroskop getestet. Die untersuchten Viren können sowohl mechanisch als auch durch Gallmilben (Allexiviren) sowie durch Blattläuse (Poty- und Carlaviren) übertragen werden. Allexi- und Potyviren waren in 94% der analysierten Proben und Carlaviren in 78% der untersuchten Proben

vertreten. Am häufigsten konnten die Allexiviren Garlic virus B (94 %) sowie Garlic virus D (83 %) nachgewiesen werden.

Garlic virus X (11 %) wurde mittels RT-PCR nachgewiesen, da derzeit kein Antiserum zur Verfügung steht (Veröffentlichung in Vorbereitung). Bisher sind keine Angaben zum Vorkommen von Garlic virus X in Deutschland in der Literatur vorhanden.

Vektorbefallene Zehen zeigten unter der Außenhaut an den Enden meist rot-bräunliche Flecken. Im Rasterelektronenmikroskop wurden die auf den Zehen vorkommenden Entwicklungsstadien und Vermehrungsorgane der Gallmilben (*Aceria tulipae*) bonitiert. Die Gallmilben wurden mittels IEM auf Garlic virus B und -D positiv getestet.

Die Vegetationsperioden in den Jahren 2017 und 2018 zeigten jeweils extreme Witterungsverhältnisse. Im Anbaujahr 2017 herrschten überdurchschnittliche Niederschläge. Das laufende Jahr zeichnet sich durch extreme Trockenheit und überdurchschnittlich hohe Temperaturen aus. Während 2017 keine Gallmilben im Bestand bonitiert wurden, zeigten in diesem Jahr einige Pflanzen Gallmilbenbefall auf den Blättern sowie deutliche Symptome wie Blattverkrümmungen und Wuchsdeformationen, die wahrscheinlich durch die Saugtätigkeit der Gallmilben hervorgerufen wurden. Es bleibt zu bestimmen inwiefern ein Zusammenhang zwischen Witterung und Auftreten des Vektors besteht. Der Monat Juni erwies sich in beiden Jahren generell zur Bonitur von Virussympptomen am geeignetsten, da zu diesem Zeitpunkt die Symptome an den Blättern deutlich zu erkennen waren.

## 10-7 - Neue Erkenntnisse zum Nanovirus PNYDV in Ackerbohne und Erbse

*New knowledge about the Nanovirus PNYDV in faba bean and field pea*

**Judith N. Seeger<sup>1</sup>, Heiko Ziebell<sup>2</sup>, Khalid Amari<sup>2</sup>, Christiane Then<sup>2</sup>, Thomas Möckel<sup>3</sup>, Esther Grüner<sup>3</sup>, Barbara Sturm<sup>4</sup>, Abozar Nasirahmadi<sup>4</sup>, Luna Shrestha<sup>4</sup>, Herwart Böhm<sup>5</sup>, Helmut Saucke<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universität Kassel, Fachgebiet Ökologischer Pflanzenschutz, Nordbahnhofstr. 1a, 37213 Witzenhausen, judith.seeger@uni-kassel.de

<sup>2</sup>Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Braunschweig

<sup>3</sup>Universität Kassel, Fachgebiet Grünlandwissenschaft und Nachwachsende Rohstoffe, Witzenhausen

<sup>4</sup>Universität Kassel, Fachgebiet Agrartechnik, Witzenhausen

<sup>5</sup>Thünen-Institut, Institut für Ökologischen Landbau, Trenthorst

*Pea necrotic yellow dwarf virus* (PNYDV), der Familie Nanoviridae, wurde 2009 als ein mitteleuropäisches und neuartiges *Nanovirus* bestätigt (GRIGORAS et al. 2010) und trat 2016 zum ersten Mal flächendeckend in Deutschland und Österreich auf. Das Virus befällt verschiedene Leguminosen und wird durch Blattläuse, insbesondere die Grüne Erbsenblattlaus (*Acyrtosiphon pisum*), übertragen. Es verursacht sich ausbreitende Infektionsnester im Bestand mit vergilbten, zwergwüchsigen Pflanzen (ZIEBELL 2017). Im Epidemie-Jahr 2016 wurden in über 50% der 460 getesteten virussympptomatischen Pflanzen aus ganz Deutschland Nanoviren nachgewiesen und traten somit gehäuft an Leguminosen auf. Die größte Abundanz hatte das *Pea enation mosaic virus* (PEMV), welches oft in Mischinfektion mit *Nanovirus* vorkam (GAAFAR et al. 2016).

Um die PNYDV-Symptomatik von jener des PEMV abgrenzen zu können, wurden in einem Gewächshausversuch 2017 zunächst beide Viren an rein-, sowie an mischinfizierten Erbsen (*Pisum sativum*) und Ackerbohnen (*Vicia faba*) untersucht. Als Vektor dienten entsprechend infizierte Erbsenblattläuse. Ziele waren, Erkenntnisse über das neuartige Virus bezüglich Ertragswirksamkeit, Symptomatik, spektrale Reflektion und mögliche Einflüsse auf die Nodulation zu erhalten. In einem 2017 analog angelegten, randomisierten

Punktinfektions-Versuch in einem Ackbohnenbestand wurden fernoptische Methoden zur Diagnostik, Ertragsabschätzung und dem Fernziel der Früherkennung unter Feldbedingungen erprobt. Die mehrortigen Feldversuche wurden von einem Gelbschalenmonitoring hinsichtlich Vektorphänologie und Virusfracht der jeweiligen Leguminosen-Blattläuse begleitet. Zusätzlich wurde der Besiedlungsgrad an Blattläusen im Bestand erhoben.

Die Punktinfektions-Versuche bestätigten die qualitativen Ergebnisse der Gewächshausinfektionen und ergaben einen signifikanten Ertragsrückgang um 78% bei PNYDV-infizierten Pflanzen. Mit destruktiven Zeiternten der Gewächshauspflanzen konnte zudem eine signifikante Minderung fixierungsaktiver Knöllchen bei PNYDV-infizierten Pflanzen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Erste hyperspektrale Aufnahmen einzelner Blätter von latent infizierten Gewächshauspflanzen wiesen deutliche Reflektionsunterschiede im NIR-Bereich auf. 2018 wurden weitere Feldversuche mit Punktinfektionen an zwei Erbsen- und zwei Ackerbohnenorten mit zwei Infektionszeitpunkten durchgeführt. Hier werden die bisherigen Ergebnisse zu Einflüssen auf die Nodulation, sowie zu hyperspektralen Aufnahmen von Einzelblättern und multispektralen Drohnen-Aufnahmen als Zeitreihe unter Feldbedingungen abgesichert und erweitern.

Das Projekt wird von BMEL (Eiweißpflanzenstrategie) und der Universität Kassel unterstützt.

#### Literatur

GAAFAR, Y., S. GRAUSGRUBER-GRÖGER, H. ZIEBELL, 2016: *Vicia faba*, *V. sativa*, and *Lens culinaris* as new hosts for Pea necrotic yellow dwarf virus in Germany and Austria. *New Disease Reports* **34**, 28.

GRIGORAS, I., B. GRONENBORN, H. J. VETTEN, 2010: First report of a nanovirus disease of pea in Germany. *Plant Disease* **94**, 642.

ZIEBELL, H., 2017: Die Virusepidemie an Leguminosen 2016 – eine Folge des Klimawandels? *Journal für Kulturpflanzen* **69**, 64-68.

## 10-8 - Mycoviren in Apple Replant Disease (ARD) assoziierten pilzlichen Endophyten

*Mycoviruses in Apple Replant Disease (ARD) associated fungal endophytes*

**Carolin Popp, Gisela Grunewaldt-Stöcker, Edgar Maiss**

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abt. Phytomedizin Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover

Die Apple Replant Disease (ARD) ist ein großes Problem in der Unterlagen-Produktion und in den hoch spezialisierten Apfelanbau-Regionen weltweit. Bei wiederholtem Nachbau auf derselben Fläche zeigen die Pflanzen ein gestauchtes Wachstum sowie kleine und verfaulte Wurzelsysteme. Die resultierenden Ertragseinbußen führen zu erheblichen ökonomischen Verlusten. Die Krankheit ist über mehrere Jahrzehnte im Boden persistent, und das Fehlen von ökonomisch vertretbaren sowie nachhaltigen Bekämpfungsmaßnahmen verschärft das Problem. Bis heute ist die Ursache von ARD unbekannt, doch scheinen Pilze als Erreger an einem Komplex aus biotischen Faktoren beteiligt zu sein (Mazzola & Manici, 2012).

In dem BonaRes Projekt ORDIAmur untersuchen verschiedene Forschergruppen die Ursache von der Nachbaukrankheit sowie geeignete Bekämpfungsstrategien. Unser Schwerpunkt ist die Charakterisierung pilzlicher Endophyten in ARD-kranken Wurzeln verschiedener Standorte. Nach Oberflächen-Sterilisation der Feinwurzeln wurden Pilze aus dem Wurzelgewebe isoliert und durch ITS-PCR und Sanger Sequenzierung bestimmt. Auffallend häufig traten Isolate der *Nectriaceae* auf. Ferner zeigte sich nach Extraktion

doppelsträngiger RNA, dass einige dieser Pilzisolat Mycoviren enthielten. Die Klonierung und Sequenzierung ergab, dass diese Viren den Familien *Alternaviridae* und *Cryoviridae* zuzuordnen sind. Mycoviren können ihre Wirtspilze auf verschiedene Weisen beeinflussen, zum Beispiel durch eine virus-vermittelte Hyper- oder Hypovirulenz. Es gilt noch zu klären, wie die analysierten Mycoviren auf die pilzlichen Endophyten im Nachbaukrankheits-Komplex wirken.

Literatur

MAZZOLA, M., L. M. MANICI, 2012: Apple replant disease: Role of microbial ecology in cause and control. *Ann. Rev. Phytopath.* **50**, 45-65.