

Charakterisierung von resistenzüberwindenden Isolaten  
des *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in Zuckerrüben  
und Stabilität der Resistenz in Abhängigkeit von Umweltbedingungen



**Charakterisierung von resistenzüberwindenden Isolaten  
des *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in Zuckerrüben  
und Stabilität der Resistenz in Abhängigkeit von Umweltbedingungen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Agrarwissenschaften  
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

**Kathrin Bornemann**

geboren in Göttingen

Göttingen, im Juli 2012

### **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2013

Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2012

978-3-95404-357-6

D 7

1. Referent: Prof. Dr. M. Varrelmann

2. Korreferent: Prof. Dr. H. Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2012

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2013

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2013

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-95404-357-6

*„Wenn du den Feind und dich selbst kennst, brauchst du den Ausgang von hundert Schlachten nicht zu fürchten. Wenn du dich selbst kennst, doch nicht den Feind, wirst du für jeden Sieg, den du erringst, eine Niederlage erleiden. Wenn du weder den Feind noch dich selbst kennst, wirst du in jeder Schlacht unterliegen.“*

Sunzi (544 – 496 v. Chr.)



*Für meine Familie*





## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis .....	V III
Abbildungsverzeichnis.....	XV
1. Einleitung.....	1
1.1 Zuckerrübenanbau in Deutschland.....	1
1.2 Landwirtschaft unter sich ändernden Klimabedingungen .....	2
1.2.1 Klimawandel .....	2
1.2.2 Anstieg der Temperatur nach dem Emissionsszenario A1B.....	3
1.2.3 Auswirkungen auf die Landwirtschaft.....	5
1.3 Rizomania .....	6
1.3.1 Virustaxonomie und Genomexpressionsstrategie.....	7
1.3.2 Der Pathogenitätsfaktor P25 und dessen Variabilität .....	11
1.3.3 Übertragung durch <i>Polymyxa betae</i> .....	12
1.3.4 Geografische Verbreitung .....	14
1.3.5 Resistenzzüchtung.....	16
1.4 Dauerhaftigkeit der Virus-Resistenz.....	18
1.4.1 Dauerhaftigkeit der Rizomania-Resistenz .....	19
1.4.2 Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten .....	19
1.4.3 Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Resistenz.....	20
1.4.4 Einfluss des Vektors auf das Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten .....	21
1.4.5 Einfluss des pflanzlichen Genotyps und des Virus-Isolates auf die Dauerhaftigkeit der Resistenz .....	21
1.4.6 Einfluss weiterer Faktoren auf die Dauerhaftigkeit der Resistenz.....	22
1.5 Virale Evolution.....	23
1.5.1 Variabilität pflanzlicher Viren .....	23
1.5.2 Viruspopulationsdynamik und Genetischer Flaschenhals („bottleneck“) .....	25
2. Ziele der Arbeit .....	26
3. Manuskript 1 .....	28
4. Manuskript 2 .....	48
5. Manuskript 3 .....	76

## Inhaltsverzeichnis

---

6. Manuskript 4 .....	99
7. Diskussion.....	125
7.1 Die Beladung von <i>Polymyxa betae</i> als Methode zur Identifizierung von resistenzüberwindenden Isolaten.....	125
7.1.1 Nutzung der Beladung von <i>P. betae</i> für weitere Fragestellungen .....	127
7.2 Standardisierung des Rizomania-Resistenztests im Gewächshaus.....	130
7.3. Einfluss der Temperatur auf die BNYVV-Gehalte in Blatt und Wurzeln von Zuckerrüben.....	131
7.4 Auftreten, Ausbreitung und Charakterisierung von resistenzüberwindenden BNYVV-Isolaten	134
7.5 Zukünftige Bedeutung von Rizomania und mögliche Kontrollstrategien .....	137
8. Zusammenfassung.....	141
9. Literaturverzeichnis .....	144
Publikationen und Vorträge .....	165
Danksagung.....	168
Curriculum Vitae.....	169

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
Abb.	Abbildung
ANOVA	„analysis of variance“
ATS	„ANOVA-type statistical analysis“
A-Typ den	BNYVV-Isolatgruppe, die überwiegend in Südeuropa und USA auftritt
B-Typ	BNYVV-Isolatgruppe, die überwiegend in Mitteleuropa auftritt
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
CaCO <sub>3</sub>	Calciumcarbonat
CH <sub>4</sub>	Methan
cM	Zentimorgan
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CP	„coat protein“
C37	Zückerrübenlinie
C48	Nachkommen einer Kreuzung aus WB41+WB42 und C37
DNA	Desoxyribokukleinsäure
dpi	„days post inoculation“
dsRNA	doppelsträngige RNA
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
et al.	<i>et alii</i>
EU	Europäische Union
GAP	Gemeinsame Agrarpolitik
ha	Hektar
HR	Hypersensitive Reaktion
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change

## Abkürzungsverzeichnis

---

IRS	„Instituut voor Rationele Suikerproductie”
IV	BNYVV-Isolat, das im Imperial Valley (Kalifornien) auftritt
J-Typ	BNYVV-Isolatgruppe, die in Japan und Deutschland auftritt
kDA	Kilodalton
MPN	„most probable number”
NL	BNYVV-Isolat, das in den Niederlanden auftritt
nt	„nucleotide”, Nukleotide
N <sub>2</sub> O	Distickstoffmonoxid (Lachgas)
ORF	„open reading frame”
PCR	„polymerase chain reaction”
pH	pondus hydrogenii (Säuregrad einer Lösung)
PTGS	„post transcriptional gene silencing”
P-Typ	BNYVV-Isolatgruppe, die in Frankreich, Groß Britannien und Kasachstan auftritt und eine zusätzliche fünfte RNA besitzt
P25	Pathogenitätsfaktor von BNYVV
QTL	„quantitative trait loci”
RISC	„RNA-induced silencing complex”
RNA	Ribonukleinsäure
RT	„read-through”
<i>Rz1</i>	Resistenzgen gegenüber BNYVV (aus der “Holly” Resistenz)
<i>Rz2</i>	Resistenzgen gegenüber BNYVV (aus der WB42-Resistenz)
<i>Rz3</i>	Resistenzgen gegenüber BNYVV (aus der WB41-Resistenz)
SSCP	„single strand confirmation polymorphism”
siRNA	„short interfering RNA”
SRES	Special Report on Emission Scenarios
TGB	„triple gene block”
u.a.	unter anderem
UNFCCC	United Nations Framework Convention on Climate Change
WB41	<i>Beta maritima</i> Akzession „wild beet 41”
WB42	<i>Beta maritima</i> Akzession „wild beet 42”
WHO	Welthandelsorganisation

## Abkürzungsverzeichnis

---

z.B.	zum Beispiel
ZMO	Zuckermarktordnung

### Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

### Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
L	Leucin
P	Prolin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
Y	Tyrosin

### Viren

BaYMV	<i>Barley yellow mosaic virus</i>
BBSV	<i>Beet black scorch virus</i>
BCMV	<i>Bean common mosaic virus</i>
BdMV	<i>Burdock mottle virus</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

BNYVV	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
BOLV	<i>Beet oak-leaf virus</i>
BSBMV	<i>Beet soilborne mosaic virus</i>
BSBV	<i>Beet soilborne virus</i>
BVQ	<i>Beet virus Q</i>
CPsV	<i>Citrus psorosis virus</i>
CymRSV	<i>Cymbidium ringspot virus</i>
MNSV	<i>Melon necrotic spot virus</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
RGSV	<i>Rice grassy stunt virus</i>
RNMV	<i>Rice necrosis mosaic virus</i>
RSNV	<i>Rice stripe necrosis virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TuMV	<i>Tulip mosaic virus</i>

## Tabellenverzeichnis

### Tabellen in Manuskripten

#### Manuskript 1

**Table 1:** Number of infected plants after vortex inoculation, *P. betae* loading, and the resistance test ..... 46

**Table 2:** Mean BNYVV ELISA absorption values measured in the small rootlets of sugar beet genotypes grown in the resistance test, and measured total virus content for all replications per treatment..... 46

**Table 3:** ATS for BNYVV content in small rootlets of sugar beet plants grown in the resistance test (test of effect slices)..... 47

#### Manuskript 2

**Tabelle 1:** Sequenzvariationen der Aminosäuretetrade AS67-70 des Pathogenitätsfaktors P25 und seine verschiedenen Typen. Grau hinterlegte Aminosäuren kennzeichnen Tetraden-zusammensetzungen von resistenzüberwindenden Isolaten..... 69

**Tabelle 2:** Mittlere Virusgehalte (n = 32) in Seitenwurzeln anfälliger und resistenter Zuckerrübengenotypen in Abhängigkeit von der Bodentemperatur nach sechs Wochen Kulturdauer ..... 70

#### Manuskript 3

**Table 1:** Mean BNYVV ELISA absorption values measured in small rootlets of sugar beet genotypes grown in the greenhouse resistance test at two different locations. The results of the different test locations (IfZ and IRS) are displayed separately..... 94

**Table 2:** Number of infected plants after vortex inoculation, *P. betae* loading, and the resistance test ..... 95

**Table 3:** Mean BNYVV ELISA absorption values measured in the small rootlets of sugar beet genotypes grown in the resistance test, and measured total virus titer for all replications per treatment..... 96

**Table 4:** ATS for BNYVV content in small rootlets of sugar beet plants grown in the resistance test (test of effect slices)..... 97

**Manuskript 4**

**Table 1:** BNYVV-infested field soils applied for bait plant test in the greenhouse to produce virus infected roots of a BNYVV susceptible sugar beet genotype for use as inoculums..... 120

**Table 2:** Frequencies of P25 tetrad compositions in the BNYVV inoculum used in competition experiments, obtained from lateral roots of a susceptible (*rz1rz1*) sugar beet genotype following deep sequencing analysis. Tetrad variants with frequencies below the calculated sequencing error of 0.229% are not displayed ..... 121

**Table 3:** BNYVV inoculum combinations used for infection and in competition experiments in the greenhouse in susceptible and *Rz1* resistant sugar beet plants: Mean BNYVV ELISA absorption values measured in small rootlets of sugar beet genotypes after six weeks of cultivation and infection rate ..... 122

**Table 4:** BNYVV P25 tetrad compositions following competition of different BNYVV populations in susceptible (*rz1rz1*) and resistant (*Rz1rz1*) sugar beet genotypes obtained by means of deep sequencing ..... 123

**Table S1:** Deep sequencing analysis read numbers obtained in competition experiments with different BNYVV strains and sugar beet genotypes..... 124



## Abbildungsverzeichnis

### Abbildungen in der Einleitung und Diskussion

**Abbildung 1:** Die Jahresmitteltemperatur in Deutschland (gleitendes zehnjähriges Mittel) nach den verschiedenen IPCC-Emissionsszenarien (A-Szenarien = wachstumsorientiert; B-Szenarien = nachhaltig) ..... 4

**Abbildung 2:** BNYVV-infizierte Zuckerrüben zeigen einen weinglasförmigen Rübenkörper (A, linke Rüben) sowie einen stark ausgeprägten Wurzelbart (A, rechte Rübe). Typische Blattsymptome nach einer mechanischen Inokulation mit BNYVV sind Aufhellungen entlang der Blattadern (B). Im Feld können nach einer Infektion mit BNYVV nesterweise Blattaufhellungen auftreten wie hier zu einem späteren Zeitpunkt in der Vegetationsperiode (C) ..... 8

**Abbildung 3:** Genomexpressionsstrategie von BNYVV ..... 10

**Abbildung 4:** Lebenszyklus von *P. betae* ..... 13

**Abbildung 5:** Lichtmikroskopischer Nachweis (400x Vergrößerung) von *P. betae* in Seitenwurzeln eines anfälligen Zuckerrüben-Genotyps ..... 14

**Abbildung 6:** Läsionsausbreitung zehn Tage nach mechanischer Blatt-Inokulation einer anfälligen Zuckerrüben-Sorte; Kultivierung bei unterschiedlichen Temperaturen (A = 18°C, B = 24°C, C = 30°C) unter standardisierten Gewächshausbedingungen ..... 133

### Abbildungen in Manuskripten

#### Manuskript 1

**Figure 1:** Total virus contents induced by three BNYVV isolates in different sugar beet genotypes shown as the range of relative effects; greenhouse resistance test with 10-week-old plants ..... 47

#### Manuskript 2

**Abbildung 1:** Geografische Verbreitung von unterschiedlichen BNYVV-Typen in Europa ..... 71

**Abbildung 2:** Genomorganisation des *Beet necrotic yellow vein virus*, Expressions- und Translationsschema ..... 72

**Abbildung 3:** P25 und seine funktionellen Domänen: Darstellung des P25 Proteins mit Lokalisationssignalen – Kernlokalisierungssignal (57-62) und Kernexportsignal (AS169-178) sowie Aminosäuretetrade (AS67-70) ..... 73

**Abbildung 4:** Verbreitung resistenzüberwindender BNYVV-Isolate weltweit..... 73

**Abbildung 5:** Darstellung der Versuchsdurchführung einer künstlichen Beladung von *Polymyxa betae* ..... 74

**Abbildung 6:** Absolute Virusgehalte in Seitenwurzeln anfälliger (KWS3), *Rz1*-resistenter (Beta4430) und *Rz1+Rz2*-resistenter (Angelina) Zuckerrüben-Genotypen nach zehn Wochen Kulturdauer in einem BNYVV-Boden, der beladene *Polymyxa betae*-Zoosporen enthält..... 74

**Abbildung 7:** Gefäßversuch mit anfälligen und resistenten Zuckerrüben-Genotypen zur Untersuchung der Resistenzstabilität bei unterschiedlichen Bodentemperaturen. Die linken zwei Gefäße werden über eine Bodenheizung beheizt, dabei entsteht eine Temperaturdifferenz zur unbeheizten Variante, die variabel eingestellt werden kann ..... 75

**Manuskript 3**

**Figure 1:** Total virus titer induced by four BNYVV strains in different sugar beet genotypes shown as the range of relative effects; greenhouse resistance test with ten-week-old plants..... 98

### 1. Einleitung

#### 1.1 Zuckerrübenanbau in Deutschland

Im Jahr 2011 wurden in Deutschland auf rund 400.000 ha Zuckerrüben angebaut (EUROSTAT, 2012). Dies entspricht einer landwirtschaftlichen Nutzfläche von ca. 2,5%. In den letzten Jahren wurden rund 10t Zucker pro ha bei einem durchschnittlichen Zuckergehalt von 17,7% erzeugt (WIRTSCHAFTLICHE VEREINIGUNG ZUCKER, 2012). Mit der Reform der Zuckermarktordnung (ZMO) im Jahr 2006 als Teil der gemeinsamen Agrarpolitik (GAP) der Europäischen Union (EU) wurde die Zuckerproduktion in Europa um 30% gesenkt. Grund für die Reform war der Protest einzelner Mitgliedsstaaten der Welthandelsorganisation (WTO) im Hinblick auf eine Liberalisierung des europäischen Marktes. Durch die Reform sollte ein Marktgleichgewicht eingestellt werden, welches u.a. durch die Einstellung der Produktion auf weniger effizienten Standorten, die Erhöhung der Effizienz der heimischen Erzeugung sowie die Möglichkeit für am wenigsten entwickelte Länder, zusätzlich Zucker zu importieren, vorsah. Für die europäischen Zuckerrübenanbauer, deren Anzahl von 290.000 vor der Reform auf 164.000 nach der Reform zurückging (WIRTSCHAFTLICHE VEREINIGUNG ZUCKER, 2012), bedeutete die Reform einen festgelegten Mindestpreis für Quotenzuckerrüben, dessen Niveau um 40% niedriger gegenüber dem Preis vor der Reform liegt. Durch die Reform wurden 44% aller europäischen Zuckerfabriken geschlossen und der Selbstversorgungsgrad innerhalb der EU sank von 115% auf 85%. Die EU wurde damit vom zweitgrößten Nettoexporteur zu einem der größten Nettoimporteure (WIRTSCHAFTLICHE VEREINIGUNG ZUCKER, 2012). Trotz der Reform hat die Zuckerrübe noch immer eine große Bedeutung nicht nur im Hinblick auf die monetäre Wertschöpfung, sondern auch innerhalb der Fruchtfolge. Weiterhin ergeben sich neue Nutzungspotentiale bei der Erzeugung von Biogas oder Bioethanol.

OERKE und DEHNE (2004) untersuchten die Auswirkungen des Auftretens von Krankheitserregern auf Ertragsverluste verschiedener landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Für den Anbau von Zuckerrüben kann von einem Verlust von 26-30% durch einen Befall mit Schaderregern und trotz eines Einsatzes von Pflanzenschutzmitteln ausgegangen

werden. Durch das Auftreten von Viruskrankheiten, wie beispielsweise Rizomania oder Blattlaus-übertragbaren Viren, an Zuckerrüben treten weltweit Verluste von 6-7% trotz Einsatz von Pflanzenschutzmitteln auf. Dies macht Forschung notwendig, um Ertragsverluste zu reduzieren und die Anbauwürdigkeit der Zuckerrübe sowie die Zuckerproduktion zu sichern.

### **1.2 Landwirtschaft unter sich ändernden Klimabedingungen**

#### **1.2.1 Klimawandel**

Der Begriff des Klimawandels wird häufig gleichbedeutend zum Begriff der globalen Erwärmung verwendet. Der Klimawandel sollte allerdings als Folge der globalen Erwärmung verstanden werden und hat vor allem in der Politik als feststehender Begriff in den letzten Jahren große Bedeutung erlangt. Globale Erwärmung wird durch einen Anstieg der Treibhausgasemissionen und der damit verbundenen Verstärkung des natürlichen Treibhauseffektes verursacht. Zu den klimarelevanten Treibhausgasen zählen neben dem Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) u.a. Methan (CH<sub>4</sub>) und Lachgas (N<sub>2</sub>O) (RAHMSTORF und SCHELLNHUBER, 2006). PITESKY et al. (2009) zeigen, dass es in den letzten Jahren zu einem Anstieg von CH<sub>4</sub> und N<sub>2</sub>O in der Atmosphäre kam, der durch eine Intensivierung der Landwirtschaft und veränderte Landnutzungsbedingungen verursacht worden ist, wodurch der bedeutende anthropogene Einfluss deutlich wird. ALLEN et al. (2006) und LEAN und RIND (2008) belegen in ihren umfangreichen Untersuchungen ebenfalls den anthropogenen Einfluss auf die globale Erwärmung.

Der Zwischenstaatliche Ausschuss für Klimaänderungen (IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change) wurde als ein der Klimarahmenkonvention (UNFCCC, United Nations Framework Convention on Climate Change) beigeordneter Ausschuss 1988 gegründet und soll Risiken der globalen Erwärmung zusammentragen, sowie Anpassungs- und Vermeidungsstrategien aufzeigen. Im Jahr 2007 wurde der vierte Sachstandsbericht des IPCC veröffentlicht. Darin wurde unter anderem auf die sehr hohe Wahrscheinlichkeit hingewiesen, dass die globale Erwärmung zum Großteil auf den anthropogenen Treibhauseffekt zurückzuführen ist. Im Bericht „The Copenhagen Diagnosis“ (ALLISON et al., 2009) wird der neueste Wissensstand zum Klimawandel zusammengefasst und ergänzt

den IPCC-Bericht aus 2007 im Hinblick auf die Klimakonferenz der Vereinten Nationen in Kopenhagen 2009. Folgende Aussagen können getroffen werden:

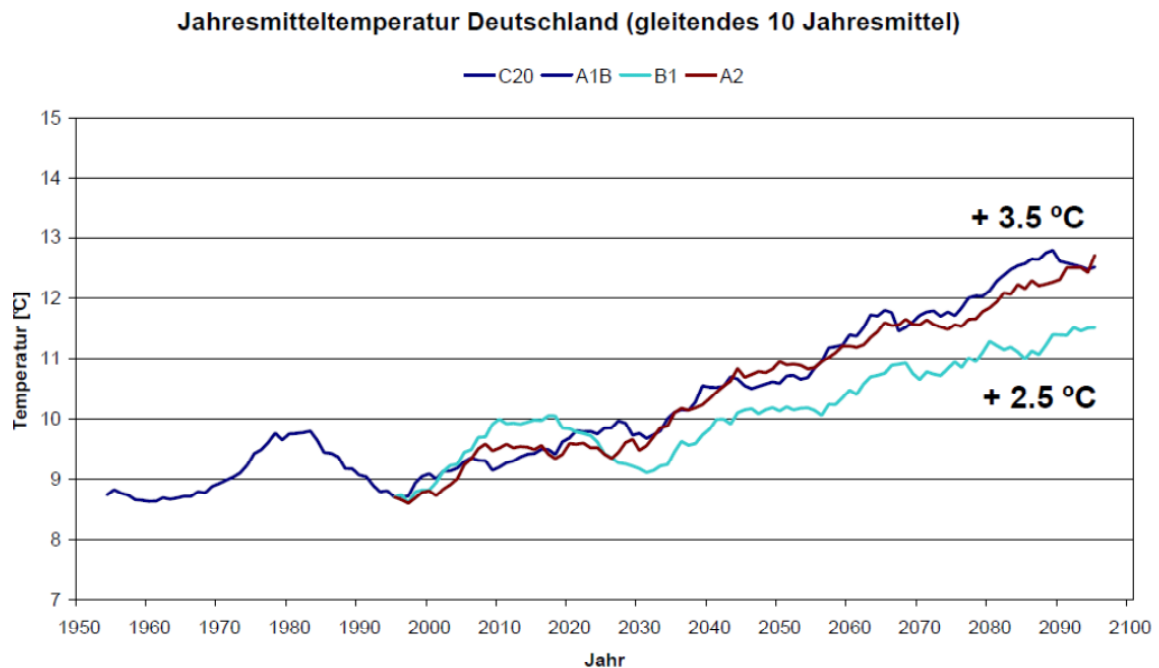
- **Die Treibhausgas-Emissionen nehmen zu.**
- **Anhand der globalen Temperaturen kann gezeigt werden, dass der Klimawandel vom Menschen verursacht wird.**
- **Zunahme von Extremereignissen wie Starkregen oder Dürren.**
- **Durch eine veränderte Landnutzung kommt es zu einer Einflussnahme auf das Klima.**
- **Schnelleres Abschmelzen der Gletscher und Eisschilde.**
- **Es muss mit einem Anstieg des Meeresspiegels gerechnet werden.**
- **Es können irreversible Schäden bei fehlenden (politischen) Eingriffen auftreten.**

Im Kyoto-Protokoll (UNFCCC, 1998) wird als verbindliches Ziel eine Reduktion des Treibhausgasausstoßes um 5,2% im Zeitraum 2008-2012 im Vergleich zum Referenzjahr 1990 angestrebt. An dieser politischen Absichtserklärung, zukünftig die globale Erwärmung um 2°C zu begrenzen, nehmen inzwischen 193 Staaten teil. MEINSHAUSEN et al. (2009) zeigen, dass der Ausstoß von Treibhausgasen jedoch in den letzten Jahren weiter angestiegen ist und fordern schnellere politische Entscheidungen, um das 2°C-Ziel einhalten zu können. Über eine Fortsetzung des Kyoto-Protokolls über 2012 hinaus wird im Dezember 2012 bei der UN-Klimakonferenz in Katar abgestimmt werden.

### **1.2.2 Anstieg der Temperatur nach dem Emissionsszenario A1B**

Es werden vom IPCC verschiedene Emissionsszenarien in Betracht gezogen, um Klimaszenarien berechnen zu können. Diese Emissionsszenarien, auch SRES-Szenarien (Special Report on Emission Szenarios) genannt, berücksichtigen künftige Entwicklungen, die einen Einfluss auf die globale Erwärmung nehmen können wie beispielsweise der Anstieg der Weltbevölkerung oder der technische Fortschritt (RAHMSTORF und SCHELLNHUBER, 2006; IPCC, 2007).

## 1. Einleitung



**Abb. 1:** Die Jahresmitteltemperatur in Deutschland (gleitendes zehnjähriges Mittel) nach den verschiedenen IPCC-Emissionsszenarien (A-Szenarien = wachstumsorientiert; B-Szenarien = nachhaltig). Bei dem Szenario A1B, welches vom IPCC als das wahrscheinlichste Szenario angesehen wird, kommt es bis zum Jahr 2100 zu einer Temperaturerhöhung um 3,5°C im Vergleich zum Referenzzeitraum C20 (1970-2000). Quelle: Max-Planck-Institut für Meteorologie, Hamburg

Im IPCC-Bericht von 2007 wird das Szenario A1B (B-balanced) als das wahrscheinlichste Emissionsszenario für zukünftige Entwicklungen festgelegt. Das Szenario berücksichtigt eine schnelle wirtschaftliche Entwicklung mit einem Einsatz von effizienten Technologien sowie eine ausgewogene Nutzung zwischen fossilen und nicht-fossilen Energiequellen. Es findet eine Globalisierung in kultureller sowie sozialer Hinsicht statt und das Bevölkerungswachstum hält bis zur Mitte des Jahrhunderts an. Andere Szenarien gewichten diese Punkte unterschiedlich, wie beispielsweise das Szenario B2, welches von einem langsamen kontinuierlichen Bevölkerungswachstum ausgeht. Um die Informationen, die das Szenario A1B liefert, auf die Region Niedersachsen übertragen zu können, wurde das dynamische Regionalmodell REMO (Regionales Modell) verwendet (JACOB und PODZUN, 1997). Entwickelt wurde das Modell vom Max-Planck-Institut für Meteorologie (Hamburg) in Zusammenarbeit mit dem Climate Service Center (Hamburg). Das Modell

berücksichtigt alle relevanten physikalischen Prozesse bei einer räumlichen Auflösung von 10-50km. Grundlage für das Modell ist das Globalmodell ECHAM5, welches für Europa und Deutschland regionalisiert wurde. Das REMO-Modell wurde als Grundlage für experimentelle Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet (Abb. 1).

### **1.2.3 Auswirkungen auf die Landwirtschaft**

Durch sich ändernde klimatische Bedingungen gab es und wird es zukünftig eine Anpassung der Landwirtschaft geben. BOLAND et al. (2004) stellen ausführlich die Auswirkungen der globalen Erwärmung auf das Auftreten von Pflanzenkrankheiten in Ontario (Kanada) dar. Veränderte Bedingungen können einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen bzw. es kann zu einem veränderten Befallsbeginn kommen. Durch die schnelle Veränderung der klimatischen Bedingungen in den letzten Jahren muss sich die Landwirtschaft, schneller als bisher vermutet, auf das Auftreten neuer Krankheitserreger im Pflanzenbau einstellen. Das Auftreten von Viruskrankheiten wird nach BOLAND et al. (2004) in Ontario zunehmen. JUROSZEK und VON TIEDEMANN (2011) stellen in einem Übersichtsartikel die generellen Auswirkungen einer globalen Erwärmung auf das Auftreten von Pflanzenkrankheiten dar. Einer verlängerten Vegetationsperiode als eine positive Auswirkung auf das Ertragspotenzial steht ein unter Umständen erhöhter Krankheitsdruck gegenüber. Sobald die Bedingungen für ein Pathogen passend sind, kann es sich etablieren und es kommt zu veränderten Befallsbedingungen (COAKLEY et al., 1999). In ihrem Bericht zur Auswirkung von Klimaveränderungen auf die deutsche Landwirtschaft geben SCHALLER und WEIGEL (2007) eine Übersicht über mögliche Auswirkungen, die durch eine veränderte solare Einstrahlung, Temperatur oder Niederschlagsmenge die Pflanzenproduktion beeinflussen können. Durch die globale Erwärmung wurde eine Verlängerung der Vegetationsperiode in nördlichen Breiten sowie eine Verschiebung der Jahreszeiten beobachtet (MENZEL et al., 2001). Hohe Nachttemperaturen nehmen außerdem Einfluss auf die Blütenbildung und damit den späteren Ertrag (SCHALLER und WEIGEL, 2007).

Die globale Erwärmung bringt Vor- und Nachteile für die Pflanzenproduktion. In Nordeuropa ist demnach mit einem Mehrertrag bei den wichtigsten Kulturpflanzen zu rechnen, in Süd- und Südosteuropa dagegen mit einem Minderertrag (JONES et al., 2003;

MARACCHI et al., 2005). Die Sommerungen, wie z.B. die Zuckerrübe, werden einerseits durch eine schnellere Jugendentwicklung bedingt durch die höheren Temperaturen im Frühjahr und einer verlängerten Vegetationsperiode profitieren. Andererseits kann es auch zu Trockenstress der Pflanzen durch vermehrt auftretende Dürreperioden kommen. Eine Erhöhung des CO<sub>2</sub>-Gehaltes würde sich zunächst positiv auf das Pflanzenwachstum auswirken, da sich die Fotosyntheserate der Pflanzen erhöht und die Transpirationsrate sinkt (PARRY et al., 2004). Unter Berücksichtigung der vom IPCC erstellten SRES-Szenarien werden die Erträge wichtiger landwirtschaftlicher Kulturpflanzen weltweit in weniger entwickelten Ländern sinken und in entwickelten Ländern ansteigen (PARRY et al., 2004). Durch erhöhte Niederschläge, wie sie für einige europäische Länder durch das Peterson Institute for International Economics vorhergesagt werden (CLINE, 2007), sowie einem Anstieg der Temperatur, kommt es vermutlich zu vergünstigten Bedingungen für Pathogene, deren Temperaturoptimum für eine Infektion bei höheren Temperaturen liegt. Dazu zählt auch der bodenbürtige Plasmodiophoromycet *Polymyxa betae*, der über die Seitenwurzeln in Zuckerrüben eindringt und dabei *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) überträgt, welches die Viröse Wurzelbärtigkeit an Zuckerrüben (Rizomania) verursacht.

### 1.3 Rizomania

BNYVV dringt über die Seitenwurzeln in Chenopodiaceen ein und gilt an Zuckerrüben (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) als Verursacher der Virösen Wurzelbärtigkeit oder auch Rizomania (TAMADA und BABA, 1973). An Zuckerrüben kommt es zu einer verstärkten Ausprägung von Seitenwurzeln bis hin zur Bildung eines Wurzelbartes. Erkennbar ist eine Infektion an einem weinglasförmigen, verkleinerten Rübenkörper (Abb. 2A) sowie einer Leitbündelverbräunung. Die Blätter zeigen eine aufrechte Stellung, was auch mit den Symptomen eines Nematodenbefalls verwechselt werden kann, sowie nesterweise Aufhellungen (Abb. 2C) (TAMADA und BABA, 1973; JOHANSSON 1985; RICHARD-MOLARD, 1985). Eine Gelbfärbung entlang der Blattadern, wie sie in Abb. 2B zu sehen ist, kommt im Feld seltener vor. Das in der Abb. 2B gezeigte Blatt wurde mechanisch inokuliert. Durch eine Infektion mit BNYVV können Ertrags- und Zuckerverluste bis zu 70% entstehen, weshalb die Krankheit im Zuckerrübenanbau eine hohe Bedeutung hat (JOHANSSON, 1985;



RICHARD-MOLARD, 1985; RUSH und HEIDEL, 1995). Weiterhin kommt es zum Anstieg im Gehalt unerwünschter Inhaltsstoffe (Amino-Stickstoff, Kalium und Natrium) in den Wurzeln der Zuckerrüben (KRALOVIC und KRALOVIC, 1996). GIUNCHEDI und POGGI POLLINI (1988) sowie DUBOIS et al. (1994) beschrieben die Verteilung von BNYVV in den verschiedenen Geweben und in den Leitbündeln von Zuckerrüben, wobei Viruspartikel nur im Xylem und nicht im Phloem von Zuckerrüben-Jungpflanzen zu finden sind.

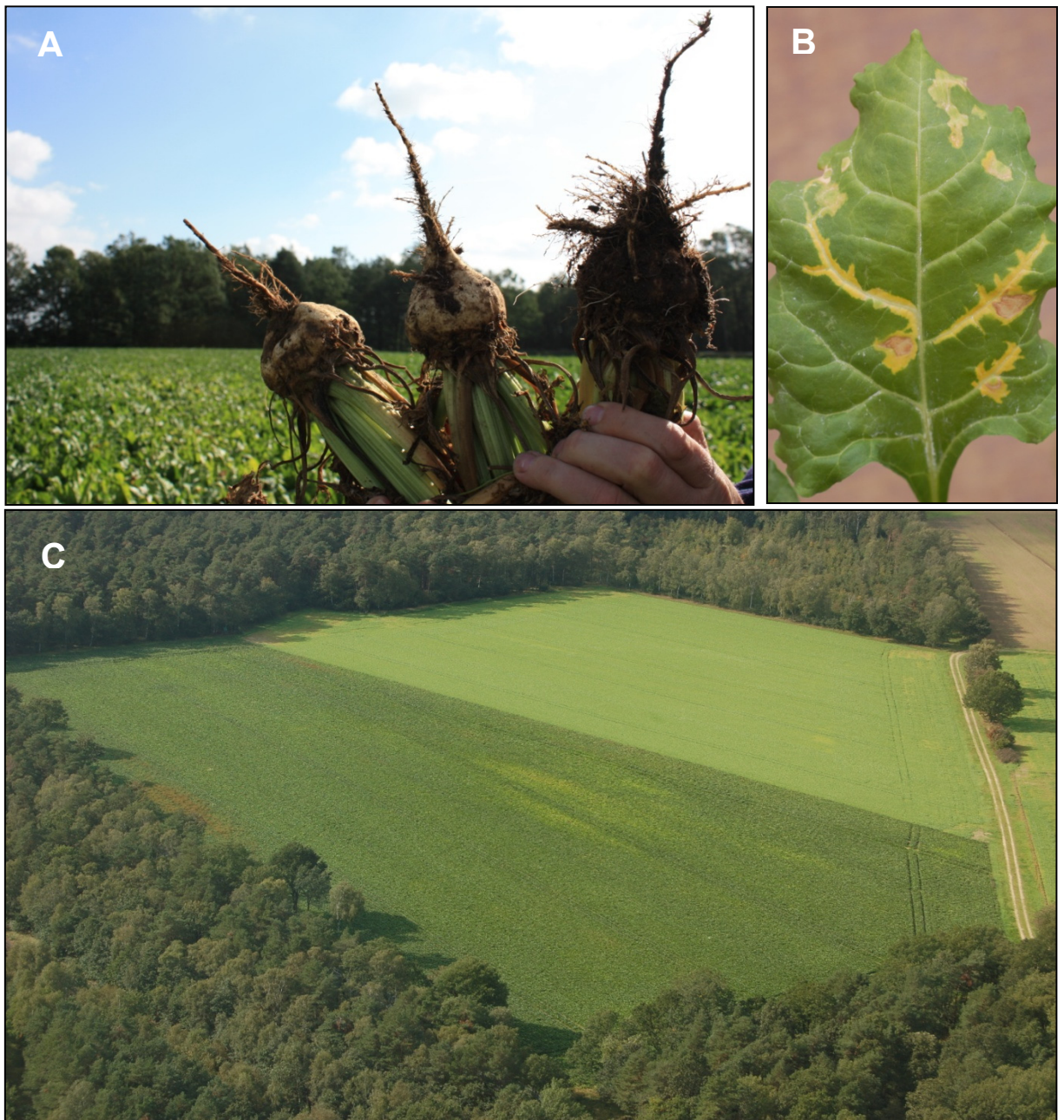
### 1.3.1 Virustaxonomie und Genomexpressionsstrategie

Nach HULL (2009) ist ein Virus „a set of one or more nucleic acid template molecules, normally encased in a protective coat or coats of protein or lipoprotein, that is able to organize its own replication only within suitable host cells.“ BNYVV wurde vom „International Committee on Taxonomy of Viruses“ (ICTV) dem Genus *Benyvirus* zugeordnet (HULL, 2002). Dazu gehören außerdem das *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV), sowie als vorläufige Einordnung die Spezies *Burdock mottle virus* (BdMV) und *Rice stripe necrosis virus* (RSNV).

Das einzelsträngige Plusstrang-orientierte RNA-Virus besteht aus vier bis fünf Genomkomponenten, die in stäbchenförmige Partikel, bestehend aus einer Hüllproteinuntereinheit, enkapsidiert sind. Die RNAs besitzen am 5'-Ende eine Kappenstruktur („cap-structure“). Am 3'-Ende befindet sich eine poly-(A)-Sequenz (PUTZ, 1977). RICHARDS und TAMADA (1992) und PELTIER et al. (2008) gehen ausführlich auf die Genomorganisation ein, die in Abb. 3 dargestellt ist. Die RNA1 und RNA2 sind verantwortlich für die Virusreplikation, Zell-zu-Zell-Ausbreitung, Enkapsidierung sowie die Suppression des pflanzlichen Resistenzmechanismus des „RNA silencing“ (PTGS) (TAMADA, 1999; DUNOYER et al., 2002). Die aus 6746nt bestehende RNA1 besitzt einen offenen Leserahmen (ORF), der für ein 237kDa Polypeptid codiert, welches funktionelle Domänen für Methyltransferase, Helikase, Protease und RNA-abhängige RNA-Polymerase beinhaltet (BOUZOUBAA et al., 1987). Die RNA2 ist 4612nt lang und codiert für sechs Proteine.

## 1. Einleitung

---



**Abb. 2:** BNYVV-infizierte Zuckerrüben zeigen einen weinglasförmigen Rübenkörper (A, linke Rüben) sowie einen stark ausgeprägten Wurzelbart (A, rechte Rübe). Typische Blattsymptome nach einer mechanischen Inokulation mit BNYVV sind Aufhellungen entlang der Blattadern (B). Im Feld können nach einer Infektion mit BNYVV nesterweise Blattaufhellungen auftreten wie hier zu einem späteren Zeitpunkt in der Vegetationsperiode (C). (Fotos: K. Bornemann und M. Varrelmann)

(2001) identifizierten einen offenen Leserahmen (75kDa) auf der RNA2, der an der Vektorübertragung beteiligt ist. Versuche zeigten, dass ein Aminosäureaustausch im

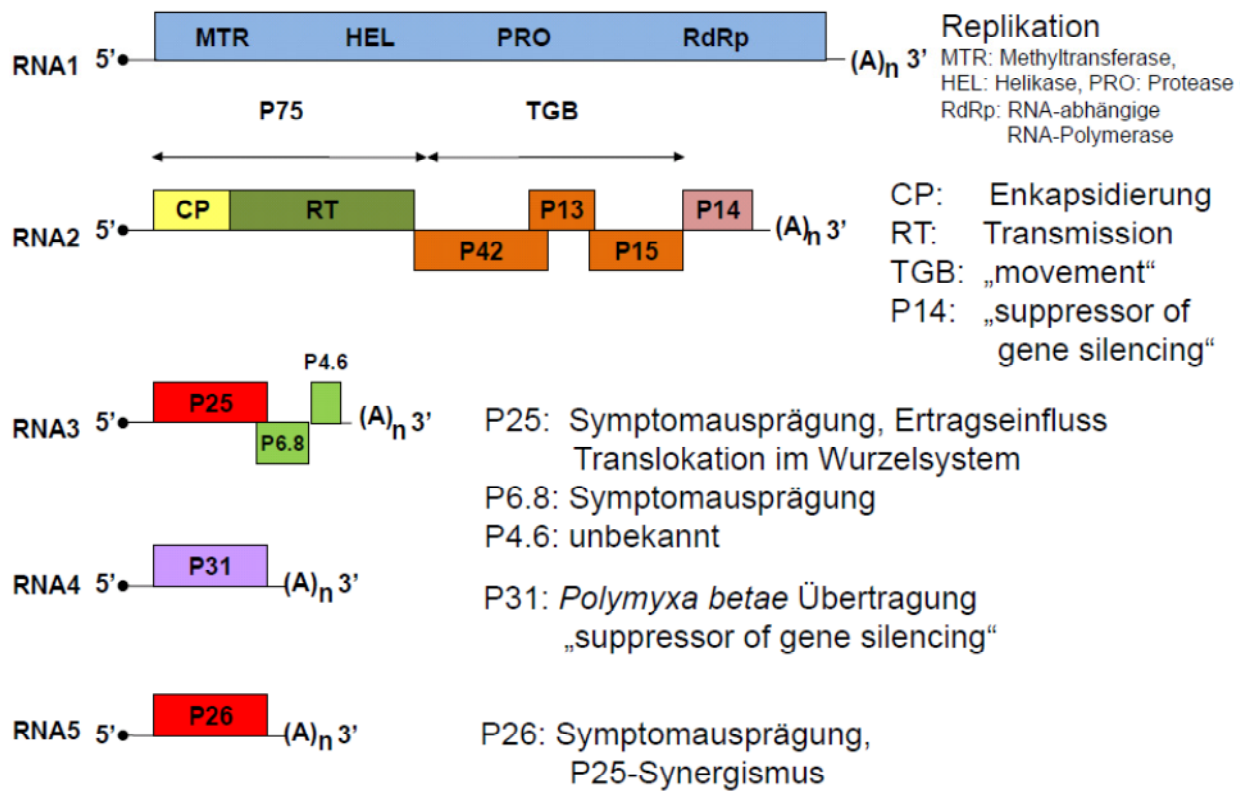
Bereich der KTER-Region zu einem Verlust der Vektorübertragbarkeit führt (TAMADA et al., 1996a; ADAMS et al., 2001). Das P75 wird nur dann translatiert, wenn das Stopp-Codon, welches sich am 3'-Ende des Hüllprotein-ORF befindet, überlesen wird („read-through“), um ein Hüllprotein+54kDa-Fusionsprotein (P75) zu translatieren (NIESBACH-KLÖSGEN et al., 1990; HAEBERLÉ et al. 1994). Der sich anschließende „triple gene block“ (TGB), der aus drei überlappenden Leserahmen besteht, ist für die Ausbreitung innerhalb und zwischen pflanzlichen Zellen verantwortlich (GILMER et al., 1992). Der am 3'-Ende liegende Leserahmen translatiert das Protein P14 (GILMER et al., 1992), welches den Resistenzmechanismus des „RNA silencing“ teilweise unterdrücken kann (DUNOYER et al., 2002). Zudem konnten ANDIKA et al. (2012) zeigen, dass BNYVV in der Lage ist, das „RNA silencing“ in Wurzeln, jedoch nicht in Blättern, zu unterdrücken, welches möglicherweise auf eine höhere Effektivität des P14 zurückzuführen ist.

Die RNA3 (1773nt) und insbesondere der Pathogenitätsfaktor P25, der von der RNA3 codiert wird, sind für die Pathogenität des Virus entscheidend (TAMADA et al., 1989; KOENIG et al., 1991). Neben dem P25 untersuchten JUPIN et al. (1992) ein weiteres Protein N, welches von der RNA3 codiert wird und in Zusammenhang mit der Symptomausprägung steht. Das Protein P4.6, welches vom ORF der subgenomischen RNA3 codiert wird, steht nicht in Zusammenhang mit der Symptomexpression. Dessen Bedeutung ist bislang unklar (JUPIN et al., 1992, BALMORI et al., 1993). PELTIER et al. (2012) konnten zeigen, dass die subgenomische RNA3 ein „cleavage“-Produkt ist, die wie die RNA3 (LAUBER et al., 1998) für den Langstrecken-Transport des Virus innerhalb der Pflanze verantwortlich ist.

Die RNA4, welche 1467nt lang ist und das P31 codiert, ist mitverantwortlich für die Vektorübertragung (TAMADA und ABE, 1989). P31 besitzt weiterhin die Funktion eines wurzelspezifischen „suppressor of gene silencing“. Dies konnten RAHIM et al. (2007) an BNYVV-infiziertem *Nicotiana benthamiana* zeigen.

Ein weiterer Pathogenitätsfaktor, das P26, wird von der RNA5 (1350nt) codiert, die nur bei bestimmten Isolaten zu finden ist (TAMADA et al., 1996b; KIGUCHI et al., 1996; MIYANISHI et al., 1999). KOENIG et al. (1997) konnten in einem Bereich eine Sequenzhomologie von sechs Aminosäuren zwischen den Pathogenitätsfaktoren P25 und P26 aufzeigen. Dies könnte im Hinblick auf die Pathogenität wichtig sein, da beide RNAs mit einander interagieren könnten.

# 1. Einleitung



**Abb. 3:** Genomexpressionsstrategie von BNYVV (nach VARRELMANN, 2007, modifiziert); Unterteilung in RNA1-5, wobei RNA5 nur im J- und P-Typ vorkommt. Farbige Boxen stellen einen offenen Leserahmen („open reading frame“, ORF) dar, wobei blau = Replikation, gelb = Hüllprotein („coat protein“, CP), orange = Verbreitung innerhalb der Zellen, rot = Pathogenität, hellgrün = genaue Funktion unbekannt (eventuell Verbindung mit Pathogenität), lila = Vektorübertragung, ein schwarzer Punkt am 5'-Ende = Kappenstruktur, (A)<sub>n</sub> = poly-(A)-Sequenz am 3'-Ende, RdRp = RNA abhängige RNA Polymerase, RT = „read-through“, TGB = „triple gene block“.

### 1.3.2 Der Pathogenitätsfaktor P25 und dessen Variabilität

KOENIG et al. (1991) konnten belegen, dass das 25kDa Protein P25 mit der Symptomentausprägung und einem Ertragsrückgang in anfälligen Zuckerrüben unmittelbar zusammenhängt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Protein, welches aus 219 Aminosäuren besteht, in einem bestimmten Bereich zwischen den Aminosäuren 67-70 (Tetrade) hohe Sequenzunterschiede zwischen den Isolaten zeigt (KOENIG et al., 1997; SCHIRMER et al., 2005; ACOSTA-LEAL et al., 2008; KOENIG et al., 2008). Der Austausch eines Nukleotids ist dabei ausreichend, um resistenzüberwindende Eigenschaften hervorzurufen (KOENIG et al., 2009). Eine Beteiligung des P25 an der Symptomentausprägung konnte durch phänotypische Beobachtungen gezeigt werden. Blätter von *Tetragonia expansa* zeigten nach mechanischer Inokulation mit BNYVV RNA1+2+3+4 gelbe Läsionen, während Blätter, die nur mit BNYVV RNA1+2+4 inokuliert worden waren, chlorotische Läsionen zeigten (TAMADA et al., 1989). PELTIER et al. (2011) zeigten, dass die Expression von P25 in transgenen Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* zur verstärkten Bildung von Wurzelverzweigungen führt, das als typisches Symptom für eine BNYVV-Infektion beschrieben ist (Abb. 2A). Nach mechanischer Inokulation von Zuckerrüben (*B. vulgaris* ssp. *vulgaris*), Wildrüben (*B. vulgaris* ssp. *maritima*) oder auch *Chenopodium quinoa* mit BNYVV kommt es zu einer HR als pflanzlichem Abwehrmechanismus durch die Bildung nekrotischer Lokal-Läsionen bzw. zur Infektionsresistenz, woran auch die Aminosäure an der Position 179 beteiligt ist (TAMADA et al., 1989; CHIBA et al., 2008). Durch die Interaktion von P25 mit Proteinen der Zuckerrübe gibt es Hinweise auf einen möglichen Einfluss auf die Pflanzenabwehr bzw. die Viruspathogenität (THIEL und VARRELMANN, 2009). In weiteren Untersuchungen konnten THIEL et al. (2012) zeigen, dass das P25 das 26S Proteasom der Zuckerrübe als „target“ hat, welches an der HR beteiligt ist. Identifiziert wurde ein F-Box Protein, das mit dem P25 interagiert. VETTER et al. (2004) konnten zeigen, dass das P25 sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert ist. Durch das Kernlokalisierungssignal sowie durch das Kernexportsignal kann sich P25 durch Bindung an die Proteinkomplexe Importin- $\alpha$  und Exportin 1 zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma bewegen (siehe auch Manuskript 2, Abb. 3).

Aus der Literatur (PELTIER et al., 2008) sind einige Zusammensetzungen der Tetrade bekannt, die in Tab. 1 in Manuskript 2 gezeigt werden. RUSH et al. (2006), CHIBA et al.

(2008) und KOENIG et al. (2009) nennen außerdem die Aminosäurepositionen 129, 135 und 179 als weitere variable Bereiche des P25. Durch den Anbau von resistenten Genotypen kommt es laut ACOSTA-LEAL et al. (2010b) zu einer erhöhten Variabilität innerhalb der Tetrade.

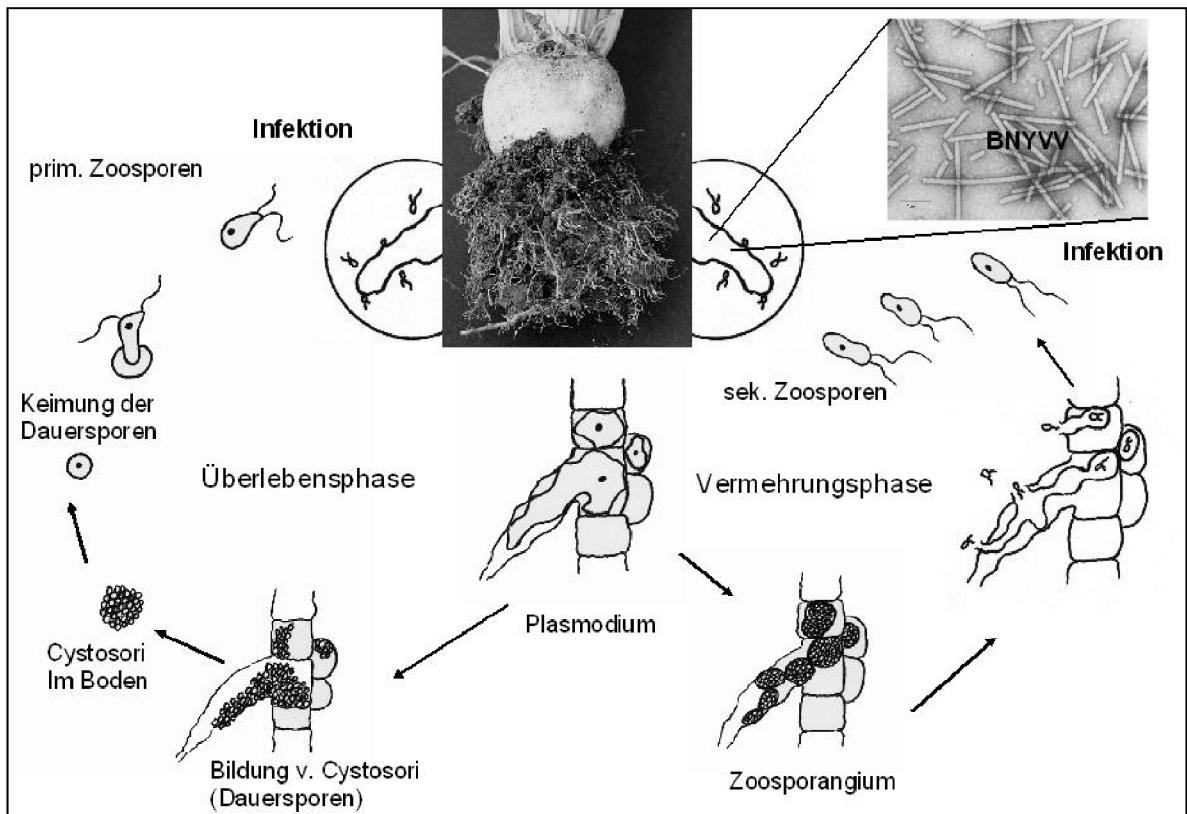
SCHIRMER et al. (2005) zeigten, dass das Auftreten unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzungen mit dem geografischen Ursprung des Virusisolates in Verbindung steht. CHIBA et al. (2011) haben ebenfalls weltweit auftretende BNYVV-Isolate untersucht und aufgrund der P25-Zusammensetzung in drei Gruppen eingeteilt. Es fällt auf, dass vor allem der A-Typ eine hohe Variabilität im Vergleich zum B-Typ im Bereich der Tetrade aufweist. Durch auftretende Punktmutationen wird eine Variabilität erzeugt, welche die Fitness des Pathogens erhält (DRAKE und HOLLAND, 1999; GARCÍA-ARENAL et al., 2003).

### 1.3.3 Übertragung durch *Polymyxa betae*

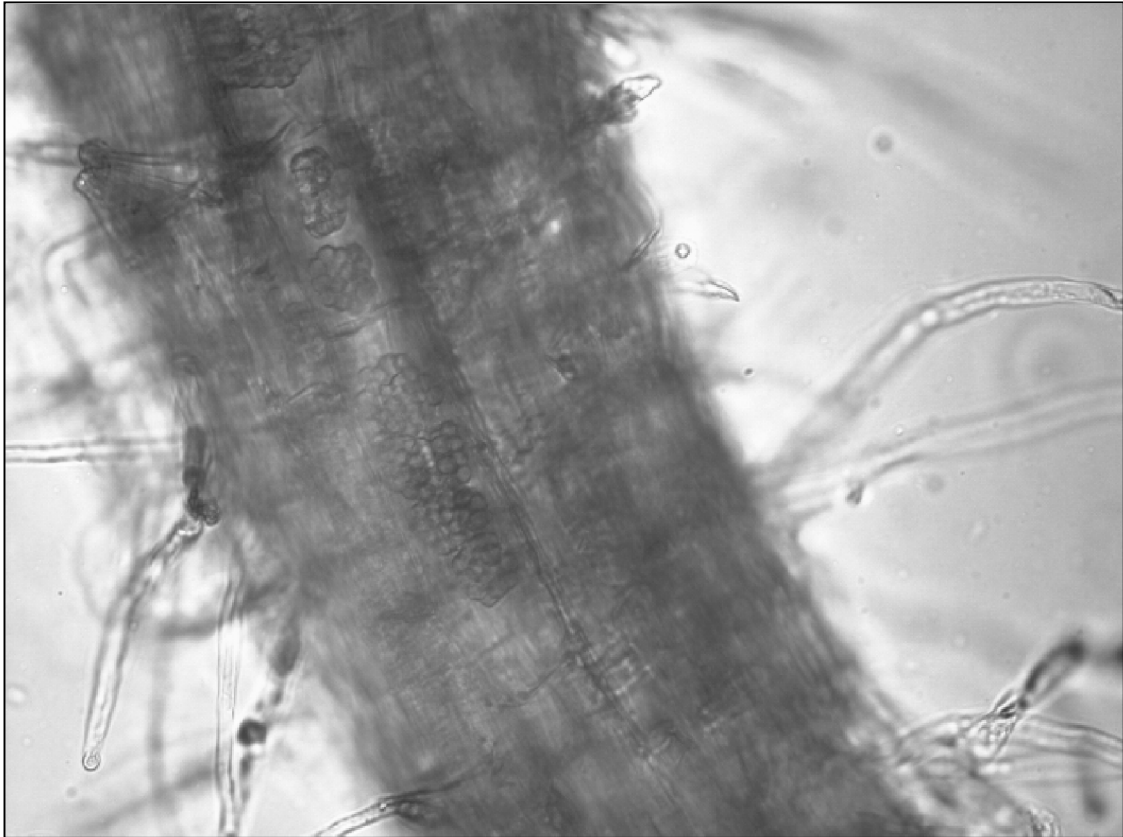
BNYVV und andere Viren wie beispielsweise das BSBMV, *Beet virus Q* (BVQ) oder das *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBV) werden durch den weltweit vorkommenden, bodenbürtigen Protisten *Polymyxa betae* Keskin übertragen (KESKIN, 1964; WISLER et al., 1994; MEUNIER et al., 2003). Bei Temperaturen um 24°C und einer ausreichenden Bodenfeuchtigkeit (BLUNT et al., 1991; WEBB et al., 2000) kommt es zu einer Infektion durch begeißelte Zoosporen an den Seitenwurzeln von Chenopodiaceen und weiterer Unkrautarten wie Amaranthaceen, Portulaceen usw. (RUSH, 2003, MOUHANNA et al., 2008). Primäre Zoosporen dringen dabei in das pflanzliche Gewebe über eine Stilett-Infektion ein. Innerhalb der Zellen kommt es zu einer Bildung von Plasmodien, welche in Zoosporangien umgebildet werden. Daraus können sekundäre Zoosporen schlüpfen und weitere Seitenwurzeln infizieren (Vermehrungsphase) (Abb. 4). Beginnt die Pflanze zu altern, kommt es zu einer Bildung von Dauersporen (Cystosori) (Abb.5), die bis zu 15 Jahre im Boden überdauern können (ABE und TAMADA, 1986) und erst bei optimalen Bedingungen zu keimen beginnen. VERCHOT-LUBICZ et al. (2007) zeigten, dass BNYVV sich in den Dauersporen und den Zoosporen von *P. betae* anreichert, bisher fehlt jedoch der experimentelle Nachweis einer Vermehrung von BNYVV innerhalb des Vektors.

## 1. Einleitung

BARR et al. (1995) untersuchten in ihrer Arbeit die Resistenz von Zuckerrüben-Wildtypen gegenüber *P. betae* und vermuteten einen Zusammenhang mit dem Auslösen einer Hypersensitiven Reaktion (HR) innerhalb der Pflanze kurze Zeit nach der Infektion.



**Abb. 4:** Lebenszyklus von *P. betae*, modifiziert nach E.G. Ruppel, elektronenmikroskopische Abbildung von J. Engelmann, aus VARRELMANN (2007).



**Abb. 5:** Lichtmikroskopischer Nachweis (400x Vergrößerung) von *P. betae* in Seitenwurzeln eines anfälligen Zuckerrüben-Genotyps (Foto: K. Bornemann).

### 1.3.4 Geografische Verbreitung

Durch den weltweiten Anbau von Zuckerrüben wurde BNYVV in alle Anbauggebiete verbreitet. Zum ersten Mal wurde die Krankheit in den 1950er Jahren in Norditalien beschrieben (CANOVA, 1959). Von dort aus verbreitete sie sich vermutlich in ganz Europa. Je nach Anbauggebiet können unterschiedliche Isolate nachgewiesen werden. Die Einteilung in verschiedene Virus-Typen wurde erstmals von KRUSE et al. (1994) durchgeführt. Anhand einer RFLP-Analyse („restriction fragment length polymorphism“) wurde das Virus zunächst in die Typen A und B eingeteilt. Der A- und B-Typ besitzen laut KOENIG und LENNEFORS (2000) ca. 99% Sequenzidentität der RNA2 und RNA4 und der partiell sequenzierten RNA1 zweier BNYVV-Isolate. MIYANISHI et al. (1999) zeigten für die Hüllproteine des A- und B-Typs einen Unterschied zwischen 3,5 und 4,8% voneinander,



was einen Aminosäureaustausch von drei bis fünf Aminosäuren bedeutet. Durch eine SSCP-Analyse („single strand confirmation polymorphism“) wurden die Unterschiede zwischen A- und B-Typ erneut bestätigt und ein weiterer Typ (P) identifiziert (KOENIG et al., 1995). Die Besonderheit des P-Typs liegt darin, dass dieser eine fünfte RNA besitzt im Gegensatz zu den anderen Typen, die nur vier RNAs aufweisen (KOENIG et al., 1997). Der P-Typ wurde nach seinem Erstauftreten in der Region um die französische Stadt Pithiviers südlich von Paris benannt. SCHIRMER et al. (2005) nahmen eine weitere Einteilung in P- und J-Typ vor und zeigten, dass aufgrund von Sequenzvariabilität der J-Typ nicht zum P-Typ zugeordnet werden kann, dieser jedoch auch eine fünfte RNA besitzt. Der J-Typ erhielt seine Bezeichnung nach dem Auftreten in Japan. MIYANISHI et al. (1999) erklärten die Unterschiede zwischen den Typen mit Aminosäureaustauschen an den Positionen 17 und 102 im Hüllprotein des P-Typs, weshalb die Sequenzhomologie zwischen dem P-Typ und dem A-Typ größer ist als zum B-Typ. Durch die zusätzliche fünfte RNA besitzen die genannten Virusisolate eine höhere Pathogenität im Vergleich zu Isolaten mit vier RNAs und können hohe Ertragsverluste verursachen (TAMADA et al., 1996b; HEIJBROEK et al., 1999; MIYANISHI et al., 1999). MIYANISHI et al. (1999) teilten diese Isolate nach Sequenzvergleichen in drei Gruppen ein. Zur ersten Gruppe gehören Isolate, die in Japan und China auftreten. Zwei einzelne Isolate aus Japan werden einer eigenen Gruppe zugeordnet. Die dritte Gruppe beschreibt die französischen Isolate. Der Nachweis über die Verbreitung des P-Typs beschränkt sich auf wenige Standorte in Frankreich (KOENIG et al., 1997), Kasachstan und China (KOENIG und LENNEFORS, 2000) und Großbritannien (HARJU et al., 2002). Der J-Typ tritt in Japan und auf einem Standort in Deutschland auf (MIYANISHI et al., 1999; KOENIG et al., 2008). Der A-Typ ist weltweit verbreitet und kommt in nahezu allen Anbaugebieten, in denen BNYVV auftritt, vor (KOENIG und LENNEFORS, 2000; RATTI et al., 2004; SCHIRMER et al., 2005; KUTLUK YILMAZ et al., 2007; LIU und LEWELLEN, 2007; KOENIG et al., 2008). Der B-Typ kommt überwiegend in Nordeuropa und China vor (SAITO et al., 1996; MIYANISHI et al., 1999; LENNEFORS et al., 2000). CHIBA et al. (2011) spekulierten, ob es einen Zusammenhang mit dem Auftreten asiatischer Isolate gibt, oder ob diese unabhängig von den europäischen Isolaten entstanden sind und sich verbreitet haben. Eine Übersicht zur Verbreitung von unterschiedlichen BNYVV-Isolaten in Europa ist in Manuskript 2 in der Abb. 1 dargestellt. Die Verbreitung

resistenzüberwindender Isolate weltweit zeigt Abb. 4 im selben Manuskript. Hinzuzufügen ist die Beschreibung des Erstauftretens von Rizomania in Dänemark durch NIELSEN et al. (2001), die das Auftreten des A-Typs nachweisen konnten. Weiterhin konnte der B-Typ in Dänemark nachgewiesen werden (eigene Beobachtungen).

Die möglichen Ursachen der Verbreitung von Pflanzenviren stellt JONES (2009) in einem Übersichtsartikel dar. Dabei nennt er vor allem anthropogene Effekte wie die Intensivierung der Landwirtschaft als Gründe für die Verbreitung von Anbauebiet zu Anbauebiet. Da es sich bei dem Vektor von BNYVV um einen bodenbürtigen Protisten handelt, ist davon auszugehen, dass die Verbreitung über Erdanhang an landwirtschaftlichen Maschinen, sowie über (Wind-)Erosion und Überschwemmung erfolgt.

### **1.3.5 Resistenzzüchtung**

Eine Wirtspflanze ist dann resistent, wenn sie die Vermehrung des Virus und die Ausprägung von Symptomen unterdrücken kann (COOPER und JONES, 1983). Resistenz zeichnet sich dadurch aus, dass es zu einer Reduktion des Virustiters kommt (BRUENING, 2006), während es bei einem Befall toleranter Pflanzen zu keiner oder geringer Ausprägung von Symptomen kommt und die Infektion nicht verhindert wird (BARKER und DALE, 2006). Zuckerrüben-Genotypen werden als Rizomania-tolerant vermarktet, obwohl sie ein *Rz*-Resistenzgen tragen. Dies beruht auf den Ergebnissen der Sortenprüfungen des Bundessortenamtes, bei denen der Ertrag unter Befall für die Zulassung berücksichtigt und Toleranz als Sorteneigenschaft geprüft wird. Tolerante Genotypen besitzen auf befallsfreien Flächen ein Ertragsniveau, das vergleichbar mit dem Ertrag auf befallenen Flächen ist (HOFFMANN et al., 1994). Dies gilt auch für Rizomania-tolerante Sorten (BESCHREIBENDE SORTENLISTE, BUNDESSORTENAMT, 2011).

Nach dem erstmaligen Auftreten von Rizomania in den 1950er Jahren begann die Resistenzzüchtung. Ziel war es zunächst, Sorten zu etablieren, die unter einem Befall nicht mit Ertragsverlusten reagieren (SCHOLTEN und LANGE, 2000). Das Züchtungsunternehmen "Holly Sugar Company" aus den USA brachte 1987 die erste Rizomania-resistente Sorte auf den Markt, die auf dem dominanten *Rz1*-Resistenzgen basiert (LEWELLEN et al., 1987). Die heute für den Landwirt zur Verfügung stehenden Sorten tragen entweder das *Rz1*-

Resistenzgen oder eine Kombination aus *Rz1+Rz2*. Zusätzliche Minorgene sind hierbei involviert (BIANCARDI et al., 2002). Die *Rz2*-Resistenz wurde in Pflanzen von *B. vulgaris* ssp. *maritima* identifiziert, die an der Küste Dänemarks gefunden und aus der Akzession WB42 eingekreuzt wurde (WHITNEY, 1989). Der Resistenzmechanismus unterscheidet sich dabei von dem der *Rz1*-Resistenz. Die phänotypischen Untersuchungen anhand von Resistenztests im Gewächshaus durch LIU et al. (2005, 2007) und PFERDMENGES et al. (2008) unterstützen diese Beobachtung. SCHOLTEN et al. (1994, 1999) konnten dies ebenso anhand von Untersuchungen zur Ausbreitung von BNYVV im pflanzlichen Gewebe durch *in situ* Lokalisation anhand von „immunogold-silver labeling“ zeigen. GIDNER et al. (2005) identifizierten ein weiteres Majorgen (*Rz3*) im Wildtyp WB41. Alle bisher identifizierten *Rz*-Resistenzgene liegen auf dem Chromosom 3, wobei das *Rz1*- und *Rz2*-Resistenzgen sich in einem Abstand von 20-25cM befinden (SCHOLTEN et al., 1999; AMIRI et al., 2003; GRIMMER et al., 2007). Bei der Selektion dieser Sorten wurde ausschließlich die Ertragsleistung betrachtet, nicht jedoch die Vermehrung des Virus und dem damit verbundenen möglicherweise gesteigertem Inokulumpotential im Boden. Das Virus kann sich weiterhin an den Seitenwurzeln vermehren ohne dabei in die Pfahlwurzel einzudringen (PAUL et al., 1993; TAMADA et al., 1999). Dies wurde an einigen Rizomania-resistenten Sorten in einem Resistenztest im Gewächshaus gezeigt (Varrelmann, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Virusgehalte waren je nach Genotyp sehr unterschiedlich. Aufgrund der Arbeiten von PFERDMENGES und VARRELMANN (2008) kann jedoch davon ausgegangen werden, dass das Inokulumpotential keinen Einfluss auf das Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten nimmt. Mit der Anreicherung des Inokulums im Boden werden jedoch auch möglicherweise Virus-Populationen angereichert, die resistenzüberwindende Eigenschaften besitzen.

Eine Virusausbreitung in resistenten Zuckerrüben-Genotypen ist trotz der *Rz1*-Resistenz möglich (TAMADA et al., 1999). Durch die Verwendung resistenter Zuckerrüben-Genotypen konnten die Ertragsverluste reduziert werden, unter Nichtbefall waren die Erträge jedoch zu Beginn der Züchtung noch niedriger als unter Befall (JOHANSSON, 1985). Tolerante Pflanzen sind nach BARKER und DALE (2006) demnach als anfällige Pflanzen anzusehen, da sie dem Virus die Möglichkeit geben sich zu vermehren. Durch die Verwendung nur eines Resistenzgens kann es nach ACOSTA-LEAL et al. (2008) zu einer Anhäufung von

Mutationen kommen, die die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten erhöht. Züchtungsprogramme, die die Dauerhaftigkeit der Rizomania-Resistenz sichern, sind zukünftig sehr wichtig, da es weiterhin keine Möglichkeit gibt, die Krankheit durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln zu bekämpfen. Weitere Ausführungen zur Resistenzzüchtung finden sich im Manuskript 2, Kapitel 1.3.

### **1.4 Dauerhaftigkeit der Virus-Resistenz**

JOHNSON (1981, 1984) definiert die Dauerhaftigkeit der Resistenz als effektiv, wenn sie in einem weiträumigen Anbaugebiet über einen längeren Zeitraum unter Umweltbedingungen, die das Auftreten von Pathogenen begünstigen, stabil bleibt. Als Beispiel für eine dauerhafte Resistenz nennt er die Resistenz in Kohl gegen *Fusarium oxysporum*, die seit mehr als 90 Jahren stabil ist. Bisher sind keine Arbeiten bekannt, bei denen die Dauerhaftigkeit der Resistenz experimentell bestimmt werden konnte. GARCÍA-ARENAL und MCDONALD (2003) untersuchten das Evolutionspotential von 29 unterschiedlichen Pflanzenviren im Hinblick auf die Dauerhaftigkeit der Resistenz. Anhand eines Risikoindices wurde gezeigt, dass die Resistenz in den meisten Fällen dauerhaft ist. Nach MCDONALD und LINDE (2002) wird die Dauerhaftigkeit der Resistenz nicht über das Vorhandensein von Resistenzgenen bestimmt, sondern durch das Evolutionspotential des Pathogens. Demnach sollte schon bei der Züchtung auf Dauerhaftigkeit die Variabilität bzw. das Anpassungsvermögen des Pathogens berücksichtigt werden (JOHNSON, 1984; GARCÍA-ARENAL und MCDONALD, 2003). Einige Arbeiten schlagen Züchtungsstrategien gegenüber unterschiedlichen Pflanzenviren vor, um die Dauerhaftigkeit der Resistenz zu erhöhen (PALLOIX et al., 2009; FABRE et al., 2012). Der Fitnessverlust von resistenzüberwindenden Virusisolaten kann als Möglichkeit zur Vorhersage der Dauerhaftigkeit der Resistenz gesehen werden (KIYOSAWA, 1982; LEACH et al., 2001; JANZAC et al., 2009). VAN DEN BOSCH und GILLIGAN (2003) haben in ihrer Arbeit anhand mathematischer Modelle versucht, die Dauerhaftigkeit zu messen. Die Dauerhaftigkeit hängt nach HARRISON (2002) von der Anzahl verwendeter Resistenzgene, der Fitness eines Pathogens, sowie der Häufigkeit des Auftretens eines Pathogens (GARCÍA-ARENAL und MCDONALD, 2003) ab. Eine polygene quantitative Resistenz ist dauerhafter als eine

monogene (BNYVV-) Resistenz (FRASER, 1992). JOHNSON (1984) weist darauf hin, dass Umweltbedingungen eine Resistenzreduktion im Wirt auslösen können. Auch auf die Rizomania-Resistenz könnten Umweltbedingungen einen Einfluss nehmen, weshalb dies im Rahmen dieser Arbeit überprüft wurde und im Folgenden betrachtet wird.

### **1.4.1 Dauerhaftigkeit der Rizomania-Resistenz**

Durch die Verwendung einer monogenen Resistenzquelle kann sich möglicherweise das Risiko des Auftretens von resistenzüberwindenden Isolaten erhöhen, was FRASER (1990) am Beispiel des *P. graminis* übertragbaren *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) zeigt. Dies hängt jedoch auch vom relativen Fitnessverlust durch Mutationen ab. Allgemein tritt die resistenzüberwindende Eigenschaft nach einem Aminosäureaustausch auf, bei dem häufig nur ein oder zwei Nukleotide betroffen sind (HARRISON, 2002). Die Dauerhaftigkeit der Rizomania-Resistenz muss seit dem Erstauftreten von resistenzüberwindenden Isolaten in den USA (LIU et al., 2005) und Spanien (PFERDMENGES et al., 2008) in Frage gestellt werden. Es wird davon ausgegangen, dass durch die Verwendung resistenter Zuckerrüben-Genotypen, die das *Rz1*-Resistenzgen tragen, ein Selektionsdruck auf BNYVV ausgeübt wird. Dies gilt nach JANZAC et al. (2009) allgemein für den Anbau resistenter Genotypen. Untersuchungen von ACOSTA-LEAL et al. (2008; 2010b) gaben Hinweise auf einen Einfluss des Zuckerrüben-Genotyps auf die Variabilität von P25. Die Tetradenvariabilität in infizierten Wurzeln *Rz1*-resistenter Zuckerrüben-Genotypen war deutlich größer im Vergleich zum anfälligen Genotyp. Ein Nachweis der Selektion resistenzüberwindender Isolate fehlte jedoch.

### **1.4.2 Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten**

Die Resistenzüberwindung definiert sich bei Rizomania dadurch, dass resistente Zuckerrübensorten hohe Virusgehalte in den Seitenwurzeln aufweisen, die vergleichbar sind mit denen in anfälligen Sorten (LIU et al., 2005). Laut HARRISON (2002) sind alle im Allgemeinen bisher bekannten resistenzüberwindenden Virusisolate von ihren Vorgängern durch Mutation entstanden. So konnten KOENIG et al. (2009) zeigen, dass ein einzelner Nukleotidaustausch beim BNYVV A-Typ innerhalb der Aminosäure-Position 67 des P25 bereits ausreichend ist, um resistenzüberwindende Eigenschaften hervorzurufen. Auch

andere Beispiele aus der Literatur zeigen, dass wenige Nukleotidaustausche die Aggressivität eines Virus verändern können, z.B. bei dem *Melon necrotic spot virus* (MNSV) an Melone (DÍAZ et al., 2004) oder dem *Potato virus Y* (PVY) an Paprika (JANZAC et al., 2010), und damit die Dauerhaftigkeit der Resistenz einschränken, da es zum Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten kommt.

### 1.4.3 Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Resistenz

Bislang wurde nicht gezeigt, ob die Variabilität von BNYVV durch erhöhte Temperaturen begünstigt wird. Weiterhin sind keine Arbeiten bekannt, die sich mit dem Temperatureinfluss auf die (systemische) Verbreitung von BNYVV in der Pflanze befassen. Die Temperatur steht scheinbar in einem engen Zusammenhang mit dem pflanzlichen Abwehrmechanismus, der nach einer Virusinfektion ausgelöst wird. Die monogen dominant vererbte Resistenz gegenüber *Bean common mosaic virus* (BCMV) in *Phaseolus vulgaris* wird durch das *I*-Gen vermittelt (ALI, 1950). COLLMER et al. (2000) konnten in Gewächshausversuchen zeigen, dass die Wirtsreaktion nach einer Infektion je nach Temperatur unterschiedlich war und eine unterschiedliche Symptomausprägung an infizierten Blättern beobachtet werden konnte. Dies deutet auf eine Temperaturabhängigkeit der Resistenz hin. Für die durch das *N*-Gen vermittelte monogene Resistenz in *N. glutinosa* gegenüber dem *Tobacco mosaic virus* (TMV) konnte ebenfalls eine Temperaturabhängigkeit beobachtet werden. Bei erhöhten Temperaturen kommt es zu einer Abschaltung des Gens, was zunächst von SAMUEL (1931) phänotypisch beobachtet wurde. Aus der Literatur sind mehrere Arbeiten bekannt, die über das „RNA silencing“ unter verschiedenen Temperaturbedingungen berichten (KALANTIDIS et al., 2002; SZITTYA et al., 2003; CHELLAPPAN et al., 2005; QU et al., 2005; VELAZQUEZ et al., 2010). BAULCOMBE (2004, 2005) und FILIPOWICZ et al. (2005) beschreiben in ihren Arbeiten den generellen Mechanismus des „RNA silencing“. Das Ziel dieses Mechanismus ist es, virale Nukleinsäure gezielt zu degradieren, um Replikation und Translation des Virus bzw. der viralen RNA zu verhindern (WATERHOUSE et al., 2001). Der Mechanismus wird angetrieben von viraler dsRNA, die während des Infektionszyklus eines Virus auftritt (VOINNET, 2005). Die dsRNA wird durch das Enzym Dicer in kleine Fragmente von 21-24nt geschnitten (siRNAs) (HAMILTON und BAULCOMBE, 1999; BAULCOMBE, 2004). Die

siRNAs werden in den RISC-Proteinkomplex („RNA-induced silencing complex“) integriert, der für die Degradierung der viralen RNA verantwortlich ist (BAULCOMBE, 2004). CHIBA et al. (2008) untersuchten die Läsionsausprägung auf mechanisch infizierten Zuckerrübenblättern als HR. Über die Wirksamkeit der bekannten Resistenzen gegenüber Rizomania im Blattgewebe von Zuckerrüben ist bisher nichts bekannt. Weitere Ausführungen finden sich im Kapitel 7.3.

### **1.4.4 Einfluss des Vektors auf das Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten**

Mit der Durchführung von „most probable number“ (MPN-) Versuchen (TUITERT, 1990; PFERDMENGES et al., 2008), konnte gezeigt werden, dass das Inokulumpotential bzw. die Dichte des Vektors keinen Einfluss auf eine Resistenzüberwindung hat. Dazu wurden infizierte Böden für Resistenztests verwendet, die zunächst bis zu einer bestimmten Anzahl infektiöser Einheiten pro ml Boden herunterverdünnt wurden. Zur Übertragungsfähigkeit von BNYVV, sowie dem Vorhandensein von unterschiedlichen Vektor-Genotypen und einer eventuellen Variabilität liegen bisher keine experimentell belegbaren Aussagen vor. Über die Effizienz der Infektion von Zoosporen ist bisher nichts bekannt (TUITERT und BOLLEN, 1993). *P. betae* stellt für BNYVV vermutlich nicht nur einen Vektor dar, sondern auch einen Wirt. Bislang ist jedoch unklar, ob sich das Virus innerhalb des Vektors repliziert (VERCHOT-LUBICZ et al., 2007).

### **1.4.5 Einfluss des pflanzlichen Genotyps und des Virus-Isolates auf die Dauerhaftigkeit der Resistenz**

Durch den Wirt wird ein Selektionsdruck auf das Virus ausgeübt. Während der Replikation kommt es zu Fehlern, die die Variabilität des Virus erhöhen und ihm die Möglichkeit geben sich an Umweltbedingungen anzupassen (HULL, 2002; GARCÍA-ARENAL et al., 2003). Durch eine erhöhte Variabilität erhöht sich die Möglichkeit für das Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten. Dies wurde bisher zwar für verschiedene Viren beschrieben (MESHI et al., 1989; JENNER et al., 2002; DIAZ et al., 2004), aber nur wenige Arbeiten berücksichtigen auch den Einfluss des Genotyps. PELHAM et al. (1970) konnten zeigen, dass durch den Anbau resistenter Tomaten-Genotypen resistenzüberwindende *Tobacco mosaic virus* Isolate selektiert werden. Welche Interaktionen dabei zwischen dem

Virus und seinem Wirt stattfinden, kann nur spekuliert werden. Man muss jedoch davon ausgehen, dass durch Selektion resistenzüberwindende BNYVV-Isolate in bodenbürtigen Virus-Populationen vorhanden sind und sich durch den Anbau resistenter Genotypen anreichern.

Je nach Aggressivität des Virus-Isolates kann es zu einer unterschiedlichen Einflussnahme auf die Dauerhaftigkeit der Resistenz kommen. Die Aggressivität kann sich wie beim BNYVV durch Punktmutationen im Bereich des P25 verändern. Dies wurde auch für andere Viren beschrieben (MESHİ et al., 1989; JENNER et al., 2002; DESBIEZ et al., 2003; CARRASCO et al., 2007; JANZAC et al., 2010). Es können jedoch auch unterschiedliche Bereiche eines Virus-Genoms Einfluss auf die Aggressivität nehmen (REDONDO et al., 2001). Die Resistenzüberwindung steht im engen Zusammenhang mit einem Fitnessverlust im anfälligen Genotyp, was für unterschiedliche Viren gezeigt werden konnte (JENNER et al., 2002; DESBIEZ et al., 2003; CARRASCO et al., 2007; ARAMBURO et al., 2010; JANZAC et al., 2010).

### **1.4.6 Einfluss weiterer Faktoren auf die Dauerhaftigkeit der Resistenz**

Der Einfluss weiterer (bodenbürtiger) Pathogene wie Pilze, Nematoden und andere Mikroorganismen, ist bislang ungeklärt. Es ist möglich, dass weitere Pathogene sowohl auf *P. betae* als auch auf BNYVV Einfluss nehmen. Kommt es zu einer Mischinfektion mit mehreren pflanzlichen Viren, besteht die Möglichkeit der Interaktion. Dabei kann es zu einer Mischinfektion kommen oder auch zur Dominanz eines Virus (HULL, 2002; ROOSSINCK, 2005).

Es ist bekannt, dass BOLV, welches ebenfalls von *P. betae* übertragen wird, in Interaktion mit BNYVV tritt. BOLV wurde in Zuckerrübenanbaugebieten identifiziert, in denen resistenzüberwindende Isolate von BNYVV auftraten (LIU und LEWELLEN, 2008). Das BSBMV wird von *P. betae* übertragen, ist BNYVV morphologisch ähnlich und wurde bislang nur in den USA identifiziert (WISLER et al., 1994; HEIDEL et al., 1997; LEE et al., 2001). Bei einer Mischinfektion mit BNYVV kommt es zu „cross-protection“ (MAHMOOD und RUSH, 1999). Die Virusgehalte in der Pflanze sind bei BSBMV stets geringer als bei alleiniger Infektion (WISLER et al., 2003).



BSBV wird wie BNYVV, BOLV und BSBMV von *P. betae* übertragen, zählt jedoch zu den Pomoviren. Über einen möglichen Synergismus mit BNYVV ist bislang nichts bekannt (CRUTZEN et al., 2009). Auch BVQ zählt zu den Pomoviren (LESEMANN et al., 1989; BARBAROSSA et al., 1992) und wird häufig zusammen mit BNYVV gefunden (MEUNIER et al., 2003), eine weitere Bedeutung ist bisher unbekannt. Der Vektor des *Beet black scorch virus* (BBSV) ist *Olpidium brassicae*, der wie *P. betae* ebenfalls zu den Plasmodiophoromyceten zählt. KOENIG und VALDIZADEH (2008) sowie GONZÁLEZ-VÁSQUEZ et al. (2009) können auch hier keine Aussagen über ein mögliches Zusammenspiel mit BNYVV treffen.

### 1.5 Virale Evolution

#### 1.5.1 Variabilität pflanzlicher Viren

MCDONALD und LINDE (2002) nennen Mutationen, Reproduktion, Selektion, Genfluss und Gendrift als treibende Kräfte der Evolution. Im Folgenden werden die drei erstgenannten Faktoren näher betrachtet. Während der Replikation kommt es zu hohen Mutationsraten, da die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase häufig Fehler verursacht und kein entsprechender Korrekturmechanismus vorhanden ist (DOMINGO und HOLLAND, 1997; DUFFY et al., 2008). DRAKE et al. (1998) und ROOSSINCK (2011) schätzen nach Angaben aus der Literatur die Fehlerrate bei einzelsträngigen RNA-Viren bei einem Fehler auf  $10^4$  Nukleotide. Genetische Variation eines Virus entsteht demnach durch das Auftreten von Fehlern während der Genomreplikation. Fehler können durch Mutation, „reassortment“ (Austausch genetischer Information) oder der Neuordnung von Aminosäuresequenzen (Rekombination) entstehen (ROOSSINCK, 1997; GARCÍA-ARENAL et al., 2001). Dadurch ist für das Virus die Möglichkeit einer Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen und verändertem Selektionsdruck gegeben (DOMINGO und HOLLAND, 1997; SCHNEIDER und ROOSSINCK, 2001). Durch einen Nukleotidaustausch kann es zu einem veränderten Aminosäuremuster kommen sowie zum „frameshift“, wenn Aminosäuren weggelassen oder hinzugefügt werden. Weiterhin kann sich die Aggressivität eines Virus verändern und es kann zu Fitnessverlusten kommen (CARRASCO et al., 2007). Alle Ereignisse, die die Variabilität beeinflussen, geschehen zufällig mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit. Die

Produkte daraus werden selektiert. Über die Höhe des Anteils an der Population von neu entstandenen Varianten entscheiden letztlich Umweltbedingungen.

Der „ $\omega$ -value“ (KIMURA, 1983) beschreibt das Verhältnis zwischen nicht-synonymen (Aminosäure-verändernder) und synonymen Mutationen („silent mutations“) auf Proteinebene, um Aussagen über den Selektionsdruck auf ein Pathogen treffen zu können (YANG et al., 2000). Ein Wert von  $\omega = 1$  bedeutet dabei eine neutrale Mutation,  $\omega > 1$  positive Selektion (möglicherweise Fitnessvorteile) und  $\omega < 1$  negative Selektion („purifying selection“). Der „ $\omega$ -value“ für das P25 von BNYVV wurde als der bisher mit dem höchsten Wert gemessene „ $\omega$ -value“ mit 0,97 geschätzt (SCHIRMER et al., 2005; ACOSTA-LEAL et al., 2008; JANZAC et al., 2009; CHIBA et al., 2011). Der „ $\omega$ -value“ anderer Viren liegt bei  $< 0,3$ . Je höher demnach der „ $\omega$ -value“ ist, desto geringer ist die Dauerhaftigkeit der Resistenz (JANZAC et al., 2009).

Ein weiterer Mechanismus der Variabilität pflanzlicher Viren ist die Rekombination (AGRIOS, 2005). Rekombinationen führen zu Veränderungen im Genom, wie beispielsweise Deletionen, Insertionen oder Sequenzaustausche zwischen zwei Genomen (HULL, 2002). Durch Rekombinationsereignisse kann es zum Auftreten von resistenzüberwindenden Virus-Isolaten kommen, wie LEGG und THRESH (2000) am Beispiel der Cassava mosaic disease, welche durch Geminiviren verursacht wird, beschreiben. Eine Übersicht zu Rekombinationsmechanismen geben LAI (1992), SIMON und BUJARSKI (1994), sowie NAGY und SIMON (1997). MIRANDA et al. (2000) berichten von „reassortment“ bei zwei Isolaten des *Rice grassy stunt virus* (RGSV). Dabei kommt es zum Austausch von genetischer Information bei einander ähnlichen Virus-Isolaten, die dieselbe Zelle infiziert haben (Ko-Replikation von Genomkomponenten).

HOLLAND et al. (1991), DOMINGO und HOLLAND (1997) und AGRIOS (2005) beschreiben Fitness als das Vermögen eines Pathogens zu überleben und sich zu reproduzieren. Die Häufigkeit einer Variante kann demnach als Maß für die Fitness gesehen werden. Fitness steht im engen Zusammenhang mit Selektion. Bei einer positiven Selektion erhöhen die fittesten Varianten ihre Häufigkeit innerhalb einer Selektion, bei negativer Selektion treten Varianten mit geringerer Fitness weniger häufig auf. Die Fitness wird u.a. beeinflusst durch den Wirt, die Umwelt und den Vektor. Nach GARCÍA-ARENAL und McDONALD (2003) können sich resistenzüberwindende Virus-Isolate innerhalb einer Population nicht

durchsetzen. Es konnte für einige Viren gezeigt werden, dass solche Isolate eine geringere Fitness besitzen, was durch eine schlechtere Übertragungsrate durch den Vektor oder einer verminderten Konkurrenzfähigkeit innerhalb der Pflanze gekennzeichnet ist.

HOLLAND et al. (1991) und GARCÍA-ARENAL et al. (2001) machen die Fitness eines Virus-Isolates dafür verantwortlich, ob dieser unter bestimmten Umweltbedingungen die Fähigkeit behält sich zu reproduzieren und zu verbreiten. ELENA (2002) zeigt den Zusammenhang zwischen der Fitness eines Pathogens und Umweltbedingungen auf. Unter bestimmten Bedingungen wie beispielsweise der Anpassung an einen neuen Wirt, entsteht ein Fitnessverlust, was wiederum theoretisch die Anpassung des Virus limitiert.

EIGEN und SCHUSTER (1977, 1978) definieren den Begriff der Quasispezies als eine wahrscheinliche Verteilung nicht identischer, jedoch verwandter Replikons. Durch Variabilität und Selektion innerhalb einer großen Population entstandene Kopien verteilen sich als eine Art Wolke um eine sogenannte Mastersequenz, die häufig auch die fitteste und am besten charakterisierte Variante darstellt (DOMINGO und HOLLAND, 1997; SCHUSTER, 1998). Die Größe der Wolke ist nach SCHNEIDER und ROOSSINCK (2001) abhängig vom Wirt. Durch die Interaktion zwischen Wirt und Virus erreicht die Diversität nach mehreren Passagen ein Gleichgewicht.

### **1.5.2 Viruspopulationsdynamik und Genetischer Flaschenhals („bottleneck“)**

Nach SCHUSTER (1998) beschreibt die Populationsdynamik den Selektionsvorgang innerhalb einer Population. Bei der Replikation treten fehlerhafte Kopien auf, die zu geringerer oder höherer Fitness führen. Bei geringer Fitness sind die Chancen gering, in der Population erhalten zu bleiben. Bei höherer Fitness können Vorgänger verdrängt werden (SCHUSTER, 1998). In größeren Populationen ist dagegen die Wahrscheinlichkeit höher, dass neue Mutanten mit einem erhöhten Fitnesspotential auftreten (AGRIOS, 2005). Durch Selektion und die Passage von „bottlenecks“ erhöht sich die Mutationshäufigkeit einer Population (SCHNEIDER und ROOSSINCK, 2001). Durch einen „bottleneck“ kommt es zu einer Reduktion der genetischen Information und dem Auftreten einer neuen Population. In Viruspopulationen treten „bottlenecks“ beispielsweise auf, wenn nur ein geringer Teil der Population auf einen neuen Wirt übertragen wird. NOVELLA et al. (1995) definieren den „bottleneck“ als Ursache für den Gründer-Effekt. CLARKE et al. (1994) konnten anhand von

## 2. Ziele der Arbeit

---

*in vitro* Konkurrenzexperimenten den Wirkmechanismus von Muller's ratchet darstellen. Dieser Mechanismus gibt die Entwicklungsrichtung einer Population vor (MULLER, 1964). Es sind einige Arbeiten bekannt, die die Passage von „bottlenecks“ mit einem Fitnessverlust in Zusammenhang stellen (CLARKE et al., 1993; BERGSTROM et al., 1999; SCHNEIDER und ROOSSINCK, 2001). Die Auswirkungen von Muller's ratchet gehen nur in eine Richtung. Mutationen führen daher nicht zu einer Umkehr der Wirkung und dem damit verbundenen Fitnessverlust. Die Auswirkungen können nur rückgängig gemacht werden, wenn es zu einem „reassortment“ kommt. Voraussetzung ist jedoch, dass sich die betreffenden Mutationen auf unterschiedlichen Segmenten befinden (CHAO, 1990). Die Arbeiten von CLARKE et al. (1993) unterstützen weiterhin die Aussage von CHAO (1990), dass Muller's ratchet während einer „bottleneck“-Passage ansetzt. Bei Viren könnte dies vor allem während der Übertragung durch den Vektor sein. „Bottlenecks“, die während der Vektorübertragung entstehen, können als Maß für die Virulenz eines Virus gesehen werden, da der Mechanismus von Muller's ratchet während der Vektorübertragung einen Fitnessverlust verursacht (CHAO, 1990; CLARKE et al., 1994; NOVELLA et al., 1995; GARCÍA-ARENAL et al., 2003) und Fitness im engen Zusammenhang mit der Virulenz steht (BERGSTROM et al., 1999). CLARKE et al. (1993) zeigen außerdem, dass die Temperatur keinen Einfluss auf das Auftreten von „bottlenecks“ nimmt.

## 2. Ziele der Arbeit

Die Ursachen für das Auftreten resistenzüberwindender BNYVV-Isolate in klimatisch wärmeren Regionen (USA und Spanien), in denen bewässert wird, sind bislang unklar. Durch die vorliegende Arbeit sollte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Isolate und einer möglichen Temperaturabhängigkeit anhand von Gewächshausversuchen überprüft werden. Dabei sollten weitere mögliche einflussnehmende Faktoren wie der Vektor und der Zuckerrüben-Genotyp im Zusammenhang mit der Selektion resistenzüberwindender Isolate untersucht werden.

Um den Einfluss einer geringen Erhöhung der Bodentemperatur zu simulieren, wurde ein Gefäßversuch unter Freilandbedingungen mit homogenisierten Feldbodenproben angelegt (Manuskript 2). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Temperatur und den

## 2. Ziele der Arbeit

---

Virusgehalten in Blättern und Wurzeln von Zuckerrüben sollte durch den Vergleich verschiedener Inokulationsmethoden und der anschließenden Kultivierung von Zuckerrüben-Jungpflanzen bei unterschiedlichen Temperaturen (18°C, 24°C, 30°C) untersucht werden.

Über den Einfluss der Vektorpopulation auf die Aggressivität unterschiedlicher Virus-Isolate ist aus der Literatur bisher nichts bekannt. Eine künstliche Beladung einer virusfreien Vektorpopulation mit resistenzüberwindenden BNYVV-Isolaten sollten einerseits Aussagen über eine mögliche Einflussnahme des Vektors und andererseits eine Charakterisierung resistenzüberwindender Isolate ermöglichen (Manuskript 1).

Das Auftreten eines neuen BNYVV-Isolates in Deutschland ermöglichte es, die Methode der Vektorbeladung zur Charakterisierung resistenzüberwindender Isolate zu prüfen und in weiteren Untersuchungen zu verwenden (Manuskript 3).

Durch den weltweiten Anbau von Zuckerrüben-Genotypen mit nur einem Resistenzgen wird ein Selektionsdruck auf die BNYVV-Population ausgeübt. Ein möglicher Einfluss des Zuckerrüben-Genotyps auf das Auftreten resistenzüberwindender Virusisolate sollte daher in Konkurrenzexperimenten untersucht werden (Manuskript 4). Weiterhin sollten durch diese Experimente Aussagen über Fitnessunterschiede unterschiedlicher BNYVV-Isolate getroffen werden können. Die mehrfache Kultur anfälliger und resistenter Zuckerrüben-Genotypen in virusinfiziertem Feldboden sollte zeigen, ob sich die Zusammensetzung des Pathogenitätsfaktors P25 ändert und dies zu einer möglichen Selektion von aggressiven Virus-Isolaten führt bzw. pathogenitätsbestimmende Mutationen entstehen.

### 3. Manuskript 1

*published in Phytopathology 101, pp.718-724 (2011)*

## **Analysis of the Resistance-breaking Ability of Different *Beet necrotic yellow vein virus* Isolates Loaded into a single *Polymyxa betae* Population in Soil**

Kathrin Bornemann and Mark Varrelmann\*

Institute of Sugar Beet Research, Holtenser Landstr. 77, D-37079 Goettingen, Germany

\*Author for correspondence: phone: +49-551-5056270, fax: +49-551-5056299, E-mail address: varrelmann@ifz-goettingen.de

### **ABSTRACT**

Bornemann, K., and Varrelmann, M. 2010. Analysis of the resistance-breaking ability of different *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) isolates loaded into a single *Polymyxa betae* population in soil. *Phytopathology*

The genome of most *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) isolates is comprised of four RNAs. The ability of certain isolates to overcome *Rz1*-mediated resistance in sugar beet grown in the USA and Europe is associated with point mutations in the pathogenicity factor P25. When the virus is inoculated mechanically into sugar beet roots at high density, the ability depends on an alanine to valine substitution at P25 position 67 (Koenig et al., 2009). Increased aggressiveness is shown by BNYVV P type isolates, which carry an additional RNA species that encodes a second pathogenicity factor, P26. Direct comparison of aggressive isolates transmitted by the vector, *Polymyxa betae*, has been impossible due to varying population densities of the vector and other soil-borne pathogens that interfere with BNYVV infection. Mechanical root inoculation and subsequent cultivation in soil that carried a virus-free *P. betae* population was used to load *P. betae* with three BNYVV isolates: a European A type isolate, an American A type isolate, and a P type isolate. Resistance tests demonstrated that changes in viral aggressiveness towards *Rz1* cultivars were independent of the vector population. This method can be applied to the study of the synergism of BNYVV with other *P. betae*-transmitted viruses.

*Additional keywords:* quasispecies, virus evolution, Benyvirus, host adaptation, Beet soil-borne virus, durable resistance

Rhizomania is one of the most devastating diseases of sugar beet in most areas in which it is grown. However, it has been controlled satisfactorily since a major resistance gene, *Rz1*, was isolated by the Holly Sugar Company (California, USA) (23). This gene has been introduced into most of the commercial varieties that are currently grown worldwide (4). Different accessions of wild beet (WB) have been identified that harbor additional sources of resistance, such as *Rz2* and *Rz3* (9,38,39,46). The major resistance genes, in combination with other minor genetic factors, provide a variable degree of quantitative resistance (4). Resistant plants show reduced accumulation of the virus in small rootlets, inhibition of the spread of the virus to the taproot, and a lack of rootlet proliferation and other rhizomania-associated symptoms (14,38,43).

Economic sugar production depends strongly on the durability of rhizomania resistance traits because severe infection can result in a reduction in yield as high as 90% in susceptible beets (15). As a consequence, the re-emergence of aggressive forms of the disease in the United States (25,26,36) and Europe (33) is of increasing concern.

The Benyvirus *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), which is the causal agent of rhizomania, is a multipartite single-stranded, positive-sense RNA virus. Its genome consists of four or five RNA species. RNA 1 and 2 contain the coding sequences for essential house-keeping functions, which include RNA replication, movement, vector transmission, encapsidation, and suppression of RNA silencing (8,19,31). P31, which is encoded by RNA 4, is also involved in the suppression of RNA silencing and transmission by the protozoan *Polymyxa betae* (35), whereas RNA 3-encoded P25 and RNA 5-encoded P26 are viral pathogenicity factors. P25 is responsible for the development of the typical symptoms of rhizomania in sugar beet roots (17,43). P26 is an additional pathogenicity protein that acts in a synergistic manner with P25 (42). Isolates that contain RNA 5 have been found mainly in Asia (30), in Europe in a small region near Pithiviers, France (P type) (18), and recently at four locations in the United Kingdom (12,45). The French P type is transported more rapidly in sugar beet roots (14) and produces a higher BNYVV content in *Rz1*-greenhouse

plants (32,33) than types with four RNA species, and also it is able to produce severe symptoms of rhizomania in the field (unpublished observations)

The ability of BNYVV that contains only four RNA species to overcome plant resistance has been linked to specific mutations in the RNA 3-encoded P25 pathogenicity factor (2,3,25). Nucleotides 199–210 of the P25 open reading frame (ORF), which encode a tetrad of amino acids (aa 67–70), exhibit a high degree of variability among isolates around the world, and these isolates have different abilities to overcome resistance (19,24,37,44). Recently, Koenig et al. (20) have used BNYVV pseudorecombinants and reverse genetics to prove that the substitution of valine for alanine at aa 67 of P25 in a Swedish A type isolate with four RNAs is responsible for the elevated virus content in *Rz1* and *Rz1+Rz2* plants following mechanical root inoculation.

To date, separation of BNYVV isolate aggressiveness and resistance-breaking abilities from other interfering soil-borne factors has been impossible and also direct comparison of isolate aggressiveness in soil resistance tests. In soil samples that have the ability to overcome *Rz1* resistance, we have observed additional severe infestation with the plant pathogens *Aphanomyces cochlioides*, *Fusarium oxysporum*, and *Rhizoctonia solani*. These pathogens might increase the symptoms of rhizomania or benefit from root injuries due to *P. betae* and virus infection (32). However, the possible synergistic or antagonistic interactions between BNYVV and other soil-borne viruses that infect sugar beet and are transmitted by *P. betae*, such as *Beet soil-borne virus* (BSBV), *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV), *Beet oak-leaf virus* (BOLV), and *Beet virus Q* (BVQ), which are often found in mixed infections (13,26,27,29,34), have not been elucidated. There is some evidence for antagonistic effects between BNYVV and BSBV from the studies of Prillwitz and Schlösser (34), and between BNYVV and BSBMV from the work of Mahmood and Rush (28) and Wisler et al. (47). Owing to the lack of an effective method to introduce different BNYVV isolates into a virus-free *P. betae* population, Koenig et al. (20) have used high inoculum doses of ground leaf tissue from *Chenopodium quinoa* lesions infected with BNYVV to inoculate young seedlings mechanically.

In this study, we cultivated sugar beet plants, whose roots had been inoculated mechanically, in soil infested with virus-free *P. betae* to load the vector with BNYVV isolates of varying aggressiveness. The different soil samples were used in resistance tests



under controlled greenhouse conditions to investigate whether the ability to overcome resistance, which was observed in the field, was independent of the vector population and other soil-borne factors.

## MATERIALS AND METHODS

**Preparation of viral isolates and inoculum.** The BNYVV non-resistance-breaking A type isolate (referred to as A) was derived from Rovigo, Italy. The resistance-breaking P type isolate (referred to as P) was obtained from a soil sample collected in the Pithiviers region, France. Soils infested with A and P, respectively, were kindly supplied by KWS Saat AG (Einbeck, Germany). The resistance-breaking A type isolate from Imperial Valley, California, USA (referred to as IV) was kindly provided by B.-L. Lennefors (Syngenta Seeds AB, Landskrona, Sweden). Plants of the BNYVV-susceptible sugar beet cultivar (*rz1rz1*, see below) were grown as bait plants in infected soil, and root samples from the infected plants were used to inoculate the leaves of 5-week-old plants of the local lesion host *C. quinoa*. For the inoculation, small samples of root from plants infected with the different BNYVV isolates were diluted fivefold with 0.05 M phosphate buffer (1 g KHPO<sub>4</sub> and 7.2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 1 l DEPC-treated water, pH 7–7.4). The leaves were inoculated using a cotton swab with Celite (Roth, Karlsruhe, Germany) as an abrasive. After two passages in *C. quinoa*, lesions were harvested at 10 dpi and stored at –80°C until inoculation.

**Virus-free field soil that contained *P. betae*.** A sample of field soil that contained *P. betae* but not BNYVV nor other soil-borne sugar beet-infecting viruses, such as BSBV and BVQ, was collected from a sugar beet field in Reutershof, Brandenburg, Germany. In this particular field, sugar beet is grown in a 3-year rotation, but to date, no rhizomania has been reported. Initially, to confirm the presence of *P. betae* and absence of BNYVV, a 5-week bait test comprised of 10 pots with seven plants each was carried out using an *rz1rz1* cultivar. The absence of BNYVV, BSBV and BVQ was assessed by specific ELISA (BNYVV) and by RT-PCR (BSBV, BVQ) using virus-specific primers (see below). The presence of *P. betae* in small rootlets was observed using a microscope.

**Sugar beet genotypes.** Three different sugar beet genotypes were used: one *Rz1*-resistant cultivar (*Rz1rz1*), one *Rz1+Rz2* cultivar, which carried the two major resistance genes *Rz1* and *Rz2* (*Rz1rz1+Rz2rz2*), and a susceptible cultivar (*rz1rz1*). To allow direct comparison with results from different studies, we used previously reported genotypes (20,25,32,33).

**Vortex inoculation and cultivation.** Sugar beet seedlings from a susceptible cultivar (see below) were inoculated mechanically in accordance with the method described by Koenig and Stein (16), with some modifications. To inoculate 12-day-old seedlings, a 4 ml inoculum of each BNYVV isolate (A, IV, and P) and 40 mg of carborundum (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany) were placed, together with the seedlings, in a 10 ml plastic tube. The inoculum was prepared as described above. The tube was vortexed with a Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA; speed setting 6) for 30 s, left for 30 s, vortexed again for 30 s, and then the plants were left for an additional 5 min in the suspension of inoculum. For the mock-inoculated control, ground leaf tissue from healthy *C. quinoa* leaves was used in place of the inoculum. Seedlings were washed in tap water and planted in sterile soil that had been mixed 1:2 (v/v) with vermiculite (Vermiculite Dämmstoffe, Sprockhövel, Germany). The plants were kept in a greenhouse at 20°C without additional light for the next 2 days. Subsequently, the temperature was raised by 2°C every second day up to 24°C (day)/18°C (night), and a 10-h photoperiod of additional light was introduced. For each viral isolate and the healthy control, 175 plants were inoculated mechanically and planted into 25 × 700 ml pots per viral isolate (seven plants per pot) and randomized in a complete block design. The plants were cultivated for 5 weeks to allow multiplication of the virus before they were transplanted into field soil that contained the vector (see above), using the same number of pots per isolate and same design. Before transplantation, a representative root sample was removed from each pot and subjected to ELISA to determine the infection rate and BNYVV content. Subsequently, after a further 5 weeks of cultivation to allow the *P. betae* population to acquire the viral isolate (which we term viral loading), the plants were harvested. The concentration of BNYVV was determined by ELISA and infection with *P. betae* was verified microscopically. All the small roots of the plants were left in the respective soil samples, which were subsequently air-dried and mixed.

**Resistance test.** Soil samples in which *P. betae* had been loaded with one of the three different BNYVV isolates were used for a sugar beet resistance test with the three genotypes of sugar beet in 42 repetitions. For this test, 150 ml pots were used. To control *Aphanomyces cochlioides*, the planted seedlings were treated with the fungicide Tachigaren 70 WP (Sumitomo, Düsseldorf, Germany) at 90 g per 100,000 plants. A total of 504 test pots were randomized in blocks that contained six pots each. After being grown for 10 weeks under the same conditions as described above, the plants were harvested and the small roots were used for RNA extraction and BNYVV ELISA.

**Detection of BNYVV, BSBV and BVQ.** Small roots from beets that had been harvested from a single pot and pooled were processed immediately or stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further processing. Ground root tissue was produced and BNYVV was detected and quantified as described previously (33). Root samples were considered to be infected with BNYVV when ELISA values exceeded the mean plus three times standard deviations of the healthy controls. For the detection and sequencing of BNYVV, BSBV, and BVQ, total RNA was extracted from samples of small roots (100 mg) using an RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), in accordance with the manufacturer's protocol. RT-PCR conditions were as described previously (22,33). For the detection and subsequent sequencing of the P25 ORF, primers BN333-low (5'-GTCCCAACCAGATCAACAA-3') and BN34-up (5'-TCGGAATATCCAAGGTTTAAAAG-3'), which amplified nt 302–1207 of BNYVV RNA 3 (Genebank Acc. No. M36894), were used. The presence of BNYVV RNA 5 was detected with primers that amplified the entire P26 ORF (nt 447–1103 of GenBank Acc. No. U78293). The presence of BSBV and BVQ was assayed by single RT-PCRs using the primers described by Meunier et al. (29). PCR products were visualized on a UV transilluminator after electrophoresis in a 1% agarose gel that contained ethidium bromide. The PCR products were purified using SureClean reagent (Bioline Ltd., London, UK) and then sequenced by a commercial company (MWG Eurofins Operon, Ebersberg, Germany) with specific primers. The sequences were analyzed using the Vector NTI (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and Chromas Lite software packages ([http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)).

**Data analysis.** Statistical analysis was carried out using SAS version 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The data regarding BNYVV content displayed a lack of homogeneity of

variance; therefore, non-parametric analysis was performed to evaluate the data properly (5,40). BNYVV content was assessed for mixed samples that consisted of four plants per pot. For each pot, the relative effect (RE) was calculated before an ANOVA-type statistical analysis (ATS) was performed. The REs were used to perform a non-parametric test for factorial designs in accordance with Brunner and Munzel (5) and Shah and Madden (40). Least square means for the ranks of marginal effects with respect to virus content were computed to allow multiple comparisons between treatments (adjustment = Tukey). To assign letters for multiple comparisons, we used the SAS macro MULT (<https://www.uni-hohenheim.de/bioinformatik/beratung/toolsmacros/sasmacros/mult.sas>). For the REs of the single experimental units (one pot), estimated relative treatment effects with appropriate confidence limits were calculated with the SAS macro LD\_CI ([http://www.ams.med.uni-goettingen.de/de/sof/ld/LD\\_CI.SAS](http://www.ams.med.uni-goettingen.de/de/sof/ld/LD_CI.SAS)). The data were evaluated as a series of randomized complete block designs with the factor block nested within location as a random effect. However, the randomization structure could not be implemented in the LD\_CI macro. In addition to the less demonstrative RE, median values of the medians of the virus content of each pot and the extreme median values were calculated.

## RESULTS

**A virus-free *P. betae* population in soil can be loaded with different BNYVV isolates.** To demonstrate that the ability of BNYVV isolates that carried four or five RNA species to overcome plant resistance was independent of the vector population, we attempted to load samples of field soil that contained the vector *P. betae* with the different isolates, BNYVV-A, -IV and -P, from infected roots. Subsequently, the different soil samples were used for a greenhouse resistance test with different BNYVV-resistant cultivars of sugar beet. Small rootlets infected with BNYVV isolate A, IV or P were used for mechanical inoculation of *C. quinoa* leaves. The absence of BVQ and BSBV in the inoculum was verified by RT-PCR. The amino acid sequence of P25, including the tetrad aa 67–70, was determined for all isolates by direct sequencing of RT-PCR products generated from total RNA extracted from roots, followed by *in silico* translation. The following tetrad sequences were detected:

IV - VLHG; P - SYHG; and A - ACHG (which all agreed with the previously published sequences). Leaf material from the second passage in *C. quinoa* was used to inoculate 175 sugar beet seedlings per isolate (susceptible cultivar, 25 pots with seven plants each) by the vortex method, after which the seedlings were cultivated in heat-sterilized virus-free soil. For the negative control, plantlets were mock-inoculated with ground leaf tissue from healthy *C. quinoa* plants. From 9-12 days after mechanical vortex inoculation, several seedlings displayed symptoms of BNYVV infection on their leaves. These yellow lesions and veins occurred more frequently in plants inoculated with BNYVV P type than with the other two types (data not shown). Before transplantation into the vector-containing field soil, a lateral root sample from each of the 25 pots per isolate was checked for successful BNYVV infection by means of quantitative ELISA (mean virus content: A type, 79.3 ng/ml; IV type, 108.8 ng/ml; and P type, 71.8 ng/ml). BNYVV infection was detected in nearly all plants (84–96%; Table 1). After a further 5 weeks of cultivation in field soil that contained the vector, detection of the virus in the inoculum plants was repeated and BNYVV infection confirmed (mean virus content A type: 90.3 ng/ml; IV: 66.2 ng/ml; and P: 52.3 ng/ml). The percentage of plants that showed BNYVV infection was 8–20% lower than after mechanical inoculation. After the inoculum plants had been removed and the soil dried, resistance tests using the *rz1rz1*, *Rz1rz1*, and *Rz1rz1+Rz2rz2* cultivars were set up with the virus-infected soil samples. The total amount of soil differed between treatments because some soil was lost when the inoculum plants, which were the source of the virus, were harvested. This resulted in variable numbers of replications per plant genotype × isolate (Table 2). The number of replications varied between 38 and 48 pots, which contained four plants each. This very high number of replications and a total of four plants per replicate were chosen because: (i) natural vector-mediated infection with BNYVV is known to be highly variable; and (ii) commercial sugar beet cultivars do not display homogenous BNYVV infection. The plants were harvested after 10 weeks of cultivation in a greenhouse. No obvious phenotypic differences were found between treatments. Total RNA was prepared from small rootlets to verify the identity of the viral isolate and to detect possible cross contamination. The presence of the P25 and P26 ORFs was verified for all isolates by RT-PCR. P26 was only detected in plants infected with the P type virus. Direct sequencing of the PCR products for the P25 ORF and evaluation of electropherograms

confirmed that all isolates showed the expected tetrad sequence, and the absence of double peaks showed that no mixed infections had occurred (data not shown). A lateral root sample was taken from all plants in each pot and used for the quantification of BNYVV by ELISA. The percentages of infected plants are shown in Table 1. The high proportion of susceptible plants that tested positive for BNYVV infection (92.1–100%) showed that loading of *P. betae* was successful and independent of the viral isolate. The proportion of virus-infected plants was lower in the *Rz1* plants than in the susceptible plants. Among the *Rz1* plants, the proportion was much higher in those grown in soil that contained type IV (87.5%) or P (73.7%) than in soil that contained type A (45%). Not surprisingly, in *Rz1+Rz2* plants, only a few isolates displayed ELISA values that were above the limit. The obvious difference in the number of infected *Rz1* plants between the reference A type isolate and isolate IV, as well as the P type, was consistent with the expected ability of the latter isolates to overcome resistance.

**BNYVV isolates IV and P retain their ability to overcome *Rz1* resistance when loaded into the same vector population.** The mean ELISA absorption values for BNYVV in the lateral roots of *rz1rz1* (susceptible), *Rz1rz1* (resistant), and *Rz1rz1+Rz2rz2* (double-resistant) plants are shown in Table 2. Although all isolates gave a mean  $A_{405}$  of 0.9–1.2 in *rz1rz1* plants, independent of their ability to overcome resistance, only the IV and P type isolates gave elevated levels of absorption in *Rz1rz1*-resistant plants. In the *Rz1rz1+Rz2rz2* plants, none of the isolates was able to produce ELISA values that were higher than those of the healthy controls. However, the nonhomogeneous distribution of virus in the lateral roots led to a relatively high mean SD. To evaluate the ability of the BNYVV isolates to produce an elevated concentration of virus in resistant plants, the ELISA readings displayed in Table 2 were used to calculate virus content, as represented by nanograms coat protein per milliliter ground root tissue. Representative values for the variation in virus content, minimum, median, and maximum of medians were calculated (Table 2). No BNYVV infection was detected in the roots of the healthy controls for any of the sugar beet genotypes. The highest concentrations of virus were detected in the small rootlets of susceptible (*rz1*) plants. Remarkably, BNYVV IV and P types produced median virus contents that were only 25% of the median content produced by the A type. The variation in virus content was highest in plants infected with the P type isolate (4.8–248.8 ng/ml

ground root tissue) and lowest in plants infected with the A type (284.9–515.7 ng/ml). In *Rz1* plants, contrasting virus contents were observed. The median virus contents produced by the IV and P type isolates were 10–20 times higher than those in the plants infected with the A type reference isolate. In contrast to the A type-infected *Rz1* plants, the virus content of the plants infected with the BNYVV IV and P type isolates showed much greater variation, with maximum values (91.0 and 168.2 ng/ml, respectively) that almost reached those obtained for both isolates in susceptible plants (121.2 and 107.7 ng/ml, respectively). In addition to the very low percentage of infected *Rz1+Rz2* plants that reached the ELISA threshold (Table 1), rootlets of the *Rz1+Rz2* plants displayed very low ELISA values, which meant that no BNYVV could be detected, independent of the isolate.

To confirm the observed variation in virus content depending on the plant genotype and BNYVV isolate, the data were subjected to statistical analysis. ANOVA-type statistical analysis (ATS) was performed and showed that viral isolate, plant genotype, and viral isolate  $\times$  plant genotype had a significant effect ( $***P < 0.001$ ) on the concentration of the virus in small rootlets (data not shown). To obtain the source of the effects for twofold interaction, the effects were sliced for sugar beet genotype and viral isolate, and are shown in Table 3. When the viral isolate was kept constant, the three different sugar beet genotypes, significantly affected the virus content, except in the healthy control. When the genotype was kept constant, a significant influence of the viral isolate on virus content was observed for the *Rz1* as well as the *rz1* plants but not for the double resistant *Rz1+Rz2* cultivar.

As a result of the lack of homogeneity of variance, median values for the virus contents were used to calculate the relative effects (REs) shown in Fig. 1. The REs for virus content that were induced by different isolates did not differ significantly in plants of the *Rz1+Rz2* cultivar, and were indistinguishable from those of the healthy controls. In *Rz1*-resistant plants, REs that were induced by the A type isolate were significantly lower (three levels of significance) than those in susceptible plants. In contrast, these RE values were not significantly different from each other when P type infections in *Rz1* versus *rz1* cultivars were evaluated, and differed by one level of significance in the case of the IV isolate. Although the virus content in susceptible plants differed by a factor of four between the reference and resistance-breaking isolates, the high variability of the absolute virus contents

prevented the detection of significant differences, except between the P and A types. Although the absolute BNYVV contents in susceptible *rzI* plants were approximately four times higher in the A type-infected than in the IV and P type-infected plants (Table 2), these differences were only statistically significant between REs that were induced by the A type and P type isolates, respectively (Fig. 1). Similar relationships were observed when the REs of viral isolates were compared in *RzI* plants. Only the IV type induced significantly higher virus contents in *RzI*-resistant plants than BNYVV A type.

## DISCUSSION

Our experiments resulted in two major findings that both support the initial working hypothesis that differences in aggressiveness between BNYVV isolates are independent of the vector population, but might be influenced in the field by other biotic and abiotic soil factors.

First, we showed that a natural soil-borne virus-free population of *P. betae* could be loaded with BNYVV in field soil with high efficiency by the culture of sugar beet seedlings that had been inoculated mechanically with BNYVV. When the viral inoculum obtained from *C. quinoa* lesions was of high quality (high density of lesions and little or no leaf damage), the method resulted in high infection rates for all three isolates and the subsequent production of large amounts of infected soil. This allowed us to set up a resistance test with a sufficient number of replicates to differentiate among viral isolates that showed different degrees of aggressiveness in the field. Previous studies of the functions of viral proteins involved in vector transmission have used non-viruliferous zoospore suspensions from systemically infected *Beta macrocarpa* plants for virus acquisition and viruliferous zoospores for transmission (41,42). To the best of our knowledge, there has only been one previous study that has shown that a virus-free *P. betae* population can acquire BNYVV from leaf-inoculated, systemically infected *Spinacia oleracea*, and transmit it through the soil to neighboring sugar beet roots (22). However, the authors of the earlier study did not separate the root systems of the virus donor and bait plants entirely. In addition to the application used in this study, the ability to load a virus-



free population of *P. betae* might enable investigation of the proposed interaction of BNYVV with BSBV or BSBMV, or the establishment of standardized resistance tests with other plasmodiophorid-transmitted viruses (1, 21).

Second, in this study, we aimed to demonstrate that BNYVV isolates that caused a reduction in yield in *Rz1* sugar beets in the field and produced elevated concentrations of virus in lateral roots in greenhouse tests retained their increased aggressiveness when loaded into the same vector population in field soil. To evaluate rhizomania resistance in sugar beet, and demonstrate the ability to overcome resistance, remains a challenge, because resistance is expressed as a quantitative trait, with a phenotype of reduced replication and movement of the virus as well as a lower reduction in yield. In practice, yield produced in infected soil is the main criterion for the registration of cultivars. Several previous studies have shown that virus content in small rootlets is a measure of resistance and correlates with yield performance during natural BNYVV infestation in the field (6,7,10,11).

The elevated concentration of BNYVV P type in *Rz1* plants was in accordance with the findings of previous field and greenhouse studies (32,33), except that in the current study the P type did not lead to detectable concentrations of virus in the double-resistant cultivar. This indicates that other environmental factors interfered with the expression of resistance. The BNYVV IV isolate, which is able to produce strong BNYVV symptoms and reduce the yield in *Rz1* cultivars, retains the ability to overcome *Rz1* resistance (25,33) when loaded into an independent virus-free population of *P. betae*. Future resistance studies should use additional *P. betae* isolates from different geographic origins to establish whether variations exist in their ability to act as a vector.

The comparison of infection efficiency for all three isolates and plant genotypes (Table 1) illustrated convincingly that quantitative resistance reduced viral replication and the number of plants that showed a virus content above the threshold of the quantitative ELISA. In the incompatible interaction between *Rz1* and the A type isolate, only half of the plants were rated as infected. In contrast, when *Rz1* plants were exposed to either of the two resistance-breaking isolates, viral replication and infection efficiency were both increased significantly, and nearly reached the levels observed in susceptible plants. The additive effects of the two major resistance genes reduced the infection efficiency further in a dramatic manner, as suggested by Gidner et al. (9). When the absolute virus contents in the

*rzl* susceptible plants are compared, it might be assumed that the A type strain possesses enhanced fitness in comparison to the IV and P types, although only the values for the P type were significantly lower. It is possible that P25, which is encoded by RNA 3, interferes directly or indirectly with factors encoded by *Rz1*, which allow the virus to infect more efficiently and replicate to a higher level, and that this in turn interferes negatively with propagation (rather than infection efficiency) in susceptible host plants, which leads to reduced fitness. This observation of possible variation in fitness complicates the evaluation of absolute virus contents in *Rz1* plants in this study, and the confirmation of resistance-breaking ability, when the three isolates are compared. The P type virus content, which was indistinguishable between the susceptible and *Rz1* plants, clearly indicates that resistance has been overcome. In the case of BNYVV IV, the ability to overcome resistance in *Rz1* plants can be deduced from the different levels of significance by which the virus content differed when compared with the reference A type isolate. The content of BNYVV A differed between *Rz1* and *rzl* plants by three levels of significance, whereas only one level of difference was detected for BNYVV IV. The resistance assay performed in this study, which used natural vector-driven infection and a standardized population of vector, shows that transmission by the vector adds another source of variability to virus content that depends on plant genotype. This becomes clear when the data are compared with those obtained by mechanical inoculation (20).

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank A. Walter and H. Korf for their excellent technical assistance, and U. Beiersdorf for providing us with rhizomania-free soil. We thank C. Buhre for helpful comments and critical discussions. C. Kluth is acknowledged for statistical advice. For critical reading of the manuscript, we thank R. Berglas and D. McIntosh.

## LITERATURE CITED

1. Adams, M. J., Swaby, A. G., and Macfarlane, I. 1986. The susceptibility of barley cultivars to *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) and its fungal vector, *Polymyxa graminis*. *Ann. Appl. Biol.* 109:561-572.
2. Acosta-Leal, R., Fawley, M. W., and Rush, C. M. 2008. Changes in the intrasolate genetic structure of *Beet necrotic yellow vein virus* populations associated with plant resistance breakdown. *Virology* 376:60-68.
3. Acosta-Leal, R., Bryan, K. B., Smith, J. T., and Rush, C. M. 2010. Breakdown of host resistance by independent evolutionary lineages of *Beet necrotic yellow vein virus* involves a parallel C/U mutation in its p25 gene. *Phytopathology* 100:127-133.
4. Biancardi, E., Lewellen, R. T., de Biaggi, M., Erichsen, A. W., and Stevanato, P. 2002. The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica* 127:383-397.
5. Brunner, E., and Munzel, U. 2002. *Nichtparametrische Datenanalysen*. Berlin: Springer.
6. Bürcky, K., and Büttner, G. 1985. Ansätze zur Selektion rizomaniatoleranter Zuckerrüben während der Jugendentwicklung–I. Virustiter. *Zuckerindustrie* 110:997-1000.
7. Bürcky, K., and Büttner, G. 1991. Gehalt an Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in der Hauptwurzel von Zuckerrübenpflanzen verschiedener Sorten und deren Leistung unter Rizomaniabefall im Feld. *J Phytopathol.* 131:1-10.
8. Dunoyer, P., Pfeffer, S., Fritsch, C., Hemmer O., Voinnet, O., and Richards, K.E. 2002. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant J.* 29:555-567.
9. Gidner, S., Lennefors, B.-L., Nilsson, N.-O., Bensefelt, J., Johansson, E., Gyllenspetz, U., and Kraft, T. 2005. QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. *Genome* 48:279-285.
10. Giunchedi, L., de Biaggi, M., and Poggi Pollini, C. 1985. Evaluation of ELISA technique for the screening of Rhizomania-tolerant sugar beet genotypes. In: *Proceedings of the 48th Congress of the IIRB (International Institute for Beet Research)* 385-390.

11. Giunchedi, L., de Biaggi, M., and Pollini, C. 1987. Correlation between tolerance and Beet necrotic yellow vein virus in sugar beet genotypes. *Phytopathologia Mediterranea* 26:23-28.
12. Harju, V.A., Mumford, R.A., Blockley, A., Boonham, N., Clover, G.R.G., Weekes, R., and Henry, C.M. 2002. Occurrence in the United Kingdom of *Beet necrotic yellow vein virus* isolates which contain RNA5. *Plant Pathol.* 51:811.
13. Heidel, G.B., and Rush, C.M. 1994. Distribution of beet necrotic yellow vein virus, beet distortion mosaic virus, and an unnamed soil-borne sugar beet virus in Texas and New Mexico. *Plant Dis.* 78:603-606.
14. Heijbroek, W., Musters, P. M. S., and Schoone, A. H. L. 1999. Variation in pathogenicity and multiplication of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in relation to the resistance of sugar beet cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:397-405.
15. Johansson, E., 1985. Rhizomania in sugar beet – a threat to beet growing that can be overcome by plant breeding. *Sveriges Utsädesförenings Tidskrift* 95:115-121.
16. Koenig, R. and Stein, B. 1990. Distribution of Beet necrotic yellow vein virus in mechanically inoculated sugarbeet plantlets of cultivars with different degrees of rhizomania resistance. *Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft*, vol. 1. Proceedings of the First Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Braunschweig, Germany, August 21-24, pp. 87-90.
17. Koenig, R., Jarausch, W., Li, Y., Commandeur, U., Burgermeister, W., Gehrke, M., and Lüddecke, P. 1991. Effect of recombinant Beet necrotic yellow vein virus with different RNA compositions on mechanically inoculated sugarbeets. *J. Gen. Virol.* 72:2243-2246.
18. Koenig, R., Lüddecke, P., and Haeblerlé, A.M. 1995. Genome difference between beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) sources from different parts of the world. *Proceedings of the 58th Congress of the IIRB (International Institute for Beet Research)*, Beaune: 271-278.
19. Koenig, R., Kastirr, U., Holtschulte B., Deml, G., and Varrelmann, M. 2008. Distribution of various types and P25 subtypes of Beet necrotic yellow vein virus in Germany and other European countries. *Arch. Virol.* 153:2139-2144.

20. Koenig, R., Loss, S., Specht, J., Varrelmann, M., Lüddecke, P., and Deml, G. 2009. A single U/C nucleotide substitution changing alanine to valine in the *Beet necrotic yellow vein virus* P25 protein promotes increased virus accumulation in roots of mechanically inoculated, partially resistant sugar beet seedlings. *J. Gen. Virol.* 90:759-763.
21. Kühne, T. 2009. Soil-borne viruses affecting cereals—Known for long but still a threat. *Virus Res.* 14:174-183.
22. Lemaire, O., Merdinoglu, D., Valentin, P., Putz, C., Ziegler-Graff, V., et al. 1988. Effect of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA composition on transmission by *Polymyxa betae*. *Virology* 162:232-235.
23. Lewellen, R. T., Skoyen, I. O., and Erichsen, A. W. 1987. Breeding sugar beet for resistance to rhizomania: evaluation of host-plant reactions and selection for and inheritance of resistance. *Proceedings of the IIRB 50th Winter Congress (Vol. II, pp. 139-156)*, Brussels, Belgium.
24. Li, M., Liu, T., Wang, B., Han, C., Li, D., and Yu, J. 2008. Phylogenetic analysis of Beet necrotic yellow vein virus isolates from China. *Virus Genes* 36:429-433.
25. Liu, H. Y., Sears, J. L., and Lewellen, R. T. 2005. Occurrence of resistance-breaking *Beet necrotic yellow vein virus* of sugar beet. *Plant Dis.* 89:464-468.
26. Liu, H. Y., and Lewellen, R. T. 2007. Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* in the United States. *Plant Dis.* 91:847-851.
27. Liu, H. Y., and Lewellen, R.T. 2008. Suppression of resistance-breaking Beet necrotic yellow vein virus isolates by Beet oak-leaf virus in sugar beets. *Plant Dis.* 92:1043-1047.
28. Mahmood T., and Rush C. 1999. Evidence of cross protection between *Beet soilborne mosaic virus* and *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet. *Plant Dis.* 83:521-26.
29. Meunier, A., Schmit, J. F., Stas, A., Kutluk, N., and Bragard, C., 2003. Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of beet necrotic yellow vein virus, Beet soilborne virus, and Beet virus Q and their vector *Polymyxa betae* KESKIN on sugar beet. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2356-2360.

30. Miyanishi, M., Kusume, T., Saito, M., and Tamada, T. 1999. Evidence for three groups of sequence variants of Beet necrotic yellow vein virus RNA 5. Arch. Virol. 144:879-892.
31. Peltier, C., Hleibieh, K., Thiel, H., Klein, E., Bragard, C., and Gilmer, D. 2008. Molecular biology of the Beet necrotic yellow vein virus. Plant Viruses 2:14-24.
32. Pferdmenges, F., Korf, H., and Varrelmann, M. 2009. Identification of rhizomania-infected soil in Europe able to overcome *Rz1* resistance in sugar beet and comparison with other resistance-breaking soils from different geographic origins. Eur. J. Plant Pathol. 124:31-43.
33. Pferdmenges, F. and Varrelmann, M. 2009. Breaking of Beet necrotic yellow vein virus resistance in sugar beet is independent of virus and vector inoculum densities. Eur. J. Plant Pathol. 124:231-245.
34. Prillwitz H, and Schlösser E. 1993. Interactions between *Beet soilborne virus* (BSBV-2) and *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV). J. Plant Dis. Prot., 100:665-669.
35. Rahim, M.D., Andika, I.B., Han, C., Kondo, H. and Tamada, T. 2007. RNA 4-encoded p31 of Beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. J. Gen. Virol. 88:1611-1619.
36. Rush, C. M., Liu, H.-Y., Lewellen, R. T., Acosta-Leal, R. (2006) The continuing saga of rhizomania of sugar beets in the United States. Plant Dis. 90:4-15.
37. Schirmer, A., Link, D., Cognat, V., Moury, B., Beuve, M., Meunier, A., et al. 2005. Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. J. Gen. Virol. 86:2897-2911.
38. Scholten, O. E., Paul, D., van Lent, J. W. M., and Goldbach, R. W. 1994. *In situ* localization of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in rootlets of susceptible and resistant beet plants. Arch. Virol. 136:349-361.
39. Scholten, O. E., De Bock, T., Klein-Lankhorst, R. M., and Lange, W. 1999. Inheritance of resistance to Beet necrotic yellow vein virus in *Beta vulgaris* conferred by a second gene for resistance. Theor. Appl. Gen. 99:740-746.

40. Shah, D.A., and Madden, L.V. 2004. Nonparametric analysis of ordinal data in designed factorial experiments. *Phytopathology* 94:33-43.
41. Tamada, T., Shirako, Y., Abe, H., Saito, M., T. Kiguchi, T. and T. Harada, T. 1989. Production and pathogenicity of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *J. Gen. Virol.* 70:3399-3409.
42. Tamada, T., Schmitt, C., Saito, M., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G. 1996. High resolution analysis of the readthrough domain of Beet necrotic yellow vein virus readthrough protein: a KTER motif is important for efficient transmission of the virus by *Polymyxa betae*. *J. Gen. Virol.* 77:1359-1367.
43. Tamada, T., Uchino, H., Kusume, T. and Saito, M. 1999. RNA 3 deletion mutants of beet necrotic yellow vein virus do not cause rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology* 89:1000-1006.
44. Tamada, T., Miyanishi, M., Kondo, H., Chiba, H. and Han, C. G. 2003. Pathogenicity and molecular variability of Beet necrotic yellow vein virus isolates from Europe, Japan, China and the United States. In: *Proceedings of the Fifth Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors* (Rush, C.M., ed.), pp. 13–16. Denver, CO: American Society of Sugar Beet Technologists.
45. Ward, L., Koenig, R., Budge, G., Garrido, C., McGrath, C., Stubbley, H. and Boonham, N. 2007. Occurrence of two different types of RNA-5-containing Beet necrotic yellow vein virus in the UK. *Arch. Virol.* 152:59-73.
46. Whitney, E. D. 1989. Identification, distribution, and testing for resistance to Rhizomania in *Beta maritima*. *Plant Dis.* 73:287-290.
47. Wisler, G. C., Lewellen, R. T., Sears, J. L., Wasson, J. W., Liu, H. Y., and Wintermantel, W. M. 2003. Interactions between *Beet necrotic yellow vein virus* and *Beet soilborne mosaic virus* in sugar beet. *Plant Dis.* 87:1170-1175.

### 3. Manuskript 1

TABLE 1. Number of infected plants after vortex inoculation, *P. betae* loading, and the resistance test

BNYVV isolate	Genotype	Vortex inoculation	Loading	Resistance test
		% infected plants <sup>a</sup>	% infected plants <sup>a</sup>	% infected plants <sup>b</sup>
A	<i>rz1rz1</i>	96	88	100
A	<i>Rz1rz1</i>	na <sup>c</sup>	na	45
A	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	na	na	4.5
IV	<i>rz1rz1</i>	96	84	100
IV	<i>Rz1rz1</i>	na	na	87.5
IV	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	na	na	2.2
P	<i>rz1rz1</i>	84	64	92.1
P	<i>Rz1rz1</i>	na	na	73.7
P	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	na	na	7.5

<sup>a</sup> mixed sample obtained from seven plants per pot; <sup>b</sup> mixed sample obtained from four plants per pot; <sup>c</sup> na = not applicable

TABLE 2. Mean BNYVV ELISA absorption values measured in the small rootlets of sugar beet genotypes grown in the resistance test, and measured total virus content for all replications per treatment

BNYVV type	Genotype	Mean A <sub>405</sub>	MSD	No. of replications	Virus content <sup>b</sup>		
					Max. of medians	Median of medians	Min. of medians
hc <sup>a</sup>	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	0.121	0.01	40	0	0	0
P	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	0.140	0.07	40	0	0	0
IV	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	0.129	0.08	46	0	0	0
A	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	0.135	0.07	44	0	0	0
hc	<i>Rz1rz1</i>	0.114	0.01	39	0	0	0
P	<i>Rz1rz1</i>	0.617	0.59	38	168.24	8.373	0
IV	<i>Rz1rz1</i>	0.583	0.42	40	91.06	20.313	9.35
A	<i>Rz1rz1</i>	0.277	0.25	42	23.00	0.825	0
hc	<i>rz1rz1</i>	0.166	0.02	38	0	0	0
P	<i>rz1rz1</i>	0.949	0.63	38	248.889	107.742	4.876
IV	<i>rz1rz1</i>	1.040	0.41	48	227.2	121.216	88.579
A	<i>rz1rz1</i>	1.261	0.22	42	515.753	441.223	284.995

<sup>a</sup>Healthy control

<sup>b</sup>Absolute virus content in small rootlets in ng/ml ground root tissue  
MSD, mean SD of absorption

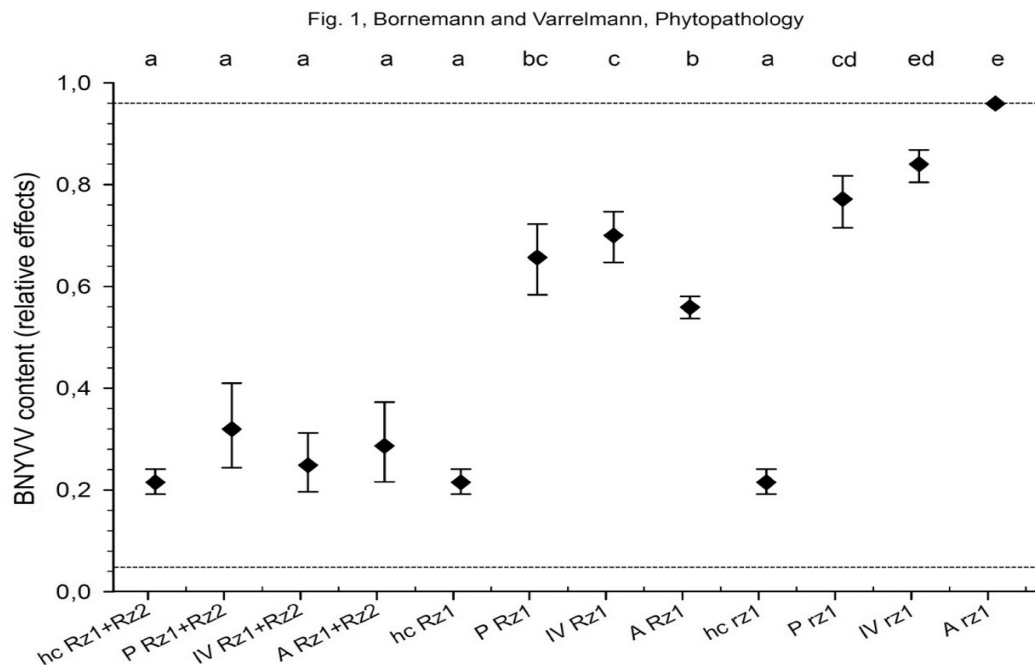


### 3. Manuskript 1

TABLE 3. ATS for BNYVV content in small rootlets of sugar beet plants grown in the resistance test (test of effect slices)

Effect	VI	Genotype	NomDF	DenDF	F Value	$P > F$
VI×SB	healthy		2	68	0.00	1.0000 ns
VI×SB	A		2	68	136.35	<.0001***
VI×SB	IV		2	68	129.00	<.0001***
VI×SB	P		2	68	65.69	<.0001***
VI×SB		<i>rz1rz1</i>	3	68	131.01	<.0001***
VI×SB		<i>Rz1rz1</i>	3	68	57.57	<.0001***
VI×SB		<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	3	68	2.48	0.0688 ns

VI, virus isolate; SB, sugar beet; NomDF, nominator degrees of freedom; DenDF, denominator degrees of freedom. Levels of significance: \*\*\* $P < 0.001$ ; ns = not significant



#### Figure caption

**Fig. 1.** Total virus contents induced by three BNYVV isolates in different sugar beet genotypes shown as the range of relative effects; greenhouse resistance test with 10-week-old plants. Y-axis: BNYVV content expressed as relative effects of replication per variant. X-axis: A, BNYVV A type; IV, BNYVV IV type; P, BNYVV P type; hc, healthy control × sugar beet genotypes: *Rz1+Rz2*, *Rz1Rz2* double-resistant genotype; *Rz1rz1*, *Rz1* single-resistant genotype; and *rz1rz1*, susceptible genotype. Whiskers: 95% CI. For relative effects with non-overlapping letters, ranges differ significantly ( $\alpha = 0.05$ , adjustment: Tukey). The upper and lower limits of the relative effects are displayed as dotted lines.

## 4. Manuskript 2

veröffentlicht in *Zuckerindustrie/Sugar Industrie* 9, pp. 21-29 (2011)

### **Faktoren der Stabilität von Rizomaniaresistenz in Zuckerrüben** **Stability factors of rhizomania resistance in sugar beet**

Kathrin Bornemann und Heike Thiel

Rizomania in Zuckerrüben wird durch das *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) verursacht, das durch den bodenbürtigen Protisten *Polymyxa betae* übertragen wird. Die weltweite Kultur teilresistenter Sorten mit Toleranzeigenschaften sichert die Wirtschaftlichkeit des Zuckerrübenanbaus. An verschiedenen, unabhängigen Standorten wird seit einiger Zeit jedoch eine Resistenzüberwindung beobachtet. Als deren Ursache wurden weder der Virusvektor noch die Interaktion mit anderen Schaderregern, sondern virale Mutationen identifiziert. Ebenso wurde bisher in Gewächshausversuchen keine Abhängigkeit der Rizomaniaresistenz von der Bodentemperatur nachgewiesen. Da der zugrundeliegende Mechanismus der verwendeten Resistenzen bis heute ungeklärt ist, kann über mögliche Ursachen der Resistenzüberwindung wie auch den auf die Viruspopulation ausgeübten Selektionsdruck nur spekuliert werden. Verantwortlich für eine erhöhte Aggressivität bestimmter Isolate ist unter anderem die Zusammensetzung des BNYVV Pathogenitätsfaktors P25. Es besteht intensiver Forschungs- und züchterischer Selektionsbedarf zum erweiterten Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktion und der Sicherung der Dauerhaftigkeit der Resistenz.

**Stichwörter:** BNYVV, Resistenzüberwindung, Variabilität, P25-Interaktion, Vektorübertragung

Rhizomania in sugar beet is caused by the *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) and transmitted by the soil-borne plasmodiophoromycete *Polymyxa betae*. Until today, the economic sustainability of the world-wide sugar beet production can only be assured by the use of partially resistant genotypes. However, recent observations from several regions of the world have shown that some isolates are able to overcome the virus resistance in sugar beet, probably due to viral mutations, which are neither caused by the fungal vector nor by any interactions with other pathogens. Additionally, greenhouse trials indicate that

temperature has no influence on the performance of BNYVV resistant cultivars. Until now, the responsible resistance mechanism as well as the reasons for resistance breaking and the conditions of selection pressure on the virus population are totally unclear. However, the composition of the BNYVV pathogenicity factor P25 is responsible for the increased aggressiveness of certain isolates among other factors. Extensive research and breeding efforts are needed to better understand the host-pathogen interaction in order to secure the stability of BNYVV resistance.

**key words:** BNYVV, resistance breaking, variability, P25 interaction, vector transmission

## 1 Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)

### 1.1 Bedeutung und Verbreitung

Rizomania ist eine der wichtigsten Viruserkrankungen im Zuckerrübenanbau, welche die Wirtschaftlichkeit des Anbaus in Frage stellen kann. Nach ihrer Erstbeschreibung 1959 in Italien (*Canova*, 1959) gewann Rizomania zunehmend an Bedeutung, da die Krankheit bei Nichtbekämpfung zu hohen Ertragsverlusten von 70 % und mehr führte (*Johansson*, 1985; *Richard-Molard*, 1985) und somit für starke Einbußen des Zuckergehaltes verantwortlich war.

Seit seinem Erstauftreten in Italien hat sich Rizomania über einen Zeitraum von ca. 50 Jahren weltweit in nahezu alle Anbauggebiete verbreitet. Das verursachende Virus, das *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), ist ein einzelsträngiges, sinnpositives RNA-Virus des Genus *Benyvirus*, welches aus vier bis fünf RNA-Komponenten, verpackt in stäbchenförmige Viruspartikel, besteht. Die Genome verschiedener BNYVV-Isolate sind hoch konserviert. Die Sequenzunterschiede beschränken sich im Wesentlichen auf Mutationen im Hüllprotein und im Pathogenitätsfaktor, dem Protein P25. Einige Isolate besitzen darüber hinaus eine zusätzliche fünfte RNA-Komponente. Anhand dieser Mutationen werden BNYVV-Isolate verschiedenen Typen namens A, B, J und P zugeordnet, wobei nur die P- und J-Typen eine RNA5 besitzen (*Schirmer* et al., 2005; *Koenig* und *Lennefors*, 2000). Die geografische Verbreitung der unterschiedlichen BNYVV-Typen in Europa ist in Abbildung 1 dargestellt.

In Europa sind bis heute vier BNYVV-Typen (A, B, P und J) identifiziert worden. Der A-Typ ist in vielen Ländern Europas, aber auch im Iran, den USA, China und Japan zu finden (Saito et al., 1996; Miyanishi et al., 1999; Lennefors et al., 2000; Sohi und Maleki, 2004). RNA5-tragende P-Typ Isolate wurden im französischen Pithiviers (Koenig et al., 1997), in Kasachstan (Koenig und Lennefors, 2000) und in Großbritannien (Harju et al., 2002) identifiziert. RNA5-tragende Isolate asiatischer Herkunft aus China (Koenig und Lennefors, 2000) und Japan (Miyanishi et al., 1999) werden dem J-Typ zugeordnet.

### **1.2 BNYVV-Befallssymptome und Biologie des Vektors *Polymyxa betae***

Die Krankheit Rizomania zeichnet sich durch ein sehr charakteristisches Schadbild aus. Nach Infektion kommt es zur vermehrten Ausbildung von Seitenwurzeln, einem sogenannten Wurzelbart, und zum Auftreten deutlich verkleinerter Rübenkörper, die durch Einschnürungen der Hauptwurzel und Verbräunungen der Gefäßleitbündel charakterisiert sind. Die auftretenden Blattsymptome erscheinen in Form von Aufhellungen, welche sich nesterweise in Feldbeständen zeigen, sowie durch Welkeerscheinungen trotz ausreichender Bodenfeuchte. Die Virusübertragung erfolgt durch den obligat biotrophen Plasmodiophoromyceten *Polymyxa betae* Keskin (Keskin, 1964). Dieser ist in der Lage, sich durch Zoosporen im Bodenwasser zu verbreiten und durch die Ausbildung von stabilen Dauersporen, sogenannten Cystosori, bis zu 20 Jahre im Boden zu überdauern (Abe und Tamada, 1986). Unklar ist bisher, ob sich BNYVV im Vektor vermehren kann (Abe und Tamada, 1986; Verchot-Lubicz et al., 2007).

### **1.3 Resistenzzüchtung**

Pflanzliche Resistenzeigenschaften gegenüber BNYVV stellen bis heute die einzig wirksame Bekämpfungsmöglichkeit dar. Eine chemische Bekämpfung des virusübertragenden Vektors *Polymyxa betae*, der in den meisten Ackerböden vorkommt, ist aus ökologischen Gesichtspunkten nicht zulässig. Ebenso ist die Bekämpfung des Vektors über die Fruchtfolge aufgrund der langen Lebensfähigkeit der pilzlichen Dauersporen nicht realistisch. Daher sind Resistenz-Züchtungsprogramme von höchster Bedeutung.

Die Resistenzzüchtung gegenüber Rizomania wurde bereits in 1970er Jahren in Italien begonnen. Zu der Zeit wurden tolerante Zuckerrübenotypen identifiziert und selektiert, die bessere Qualitätsmerkmale wie Ertrag und Zuckergehalt aufwiesen, aber keine geringeren Virusgehalte zeigten (Bürcky, 1987; Scholten und Lange, 2000; Biancardi et al., 2002). Bisher sind mehrere Resistenzgene (*Rz1-Rz5*) (Whitney, 1989; Scholten et al., 1994; Scholten et al., 1999; Gidner et al., 2005; Grimmer et al., 2007) identifiziert worden. Allerdings basieren die für den Landwirt erwerbbaaren Sorten nach Angaben der Züchtungsunternehmen hauptsächlich auf den monogenen Resistenzen der Majorgene *Rz1* und *Rz2*. Die „Holly Sugar Company“ entdeckte die erste Resistenzquelle - die „Holly“ Resistenz, die auf dem dominanten Resistenzgen *Rz1* basiert und eine partielle Resistenz vermittelt, welche die Virusvermehrung reduziert, nicht jedoch die Infektion verhindert (Lewellen et al., 1987; Scholten et al., 1996). Zusätzlich ist bekannt, dass die *Rz1*-vermittelte Resistenz durch weitere Minorgene unterstützt und modifiziert wird. In Deutschland werden vom Bundessortenamt (BSA) Sorten mit BNYVV-Toleranzeigenschaften zugelassen. Rizomaniatolerante Sorten tolerieren den BNYVV-Befall und besitzen unter Nichtbefall ein Ertragsniveau, welches vergleichbar mit dem anfälliger Sorten ist (Beschreibende Sortenliste, Bundessortenamt). Nur mit diesen Sorten ist bis heute die Kontrolle von Rizomania möglich.

Die quantitativen Resistenzeigenschaften können jedoch eine Virusinfektion und, in Abhängigkeit vom Genotyp, auch eine Virusvermehrung nicht verhindern. Daher ist aus Gründen der Sicherung der Resistenzstabilität sowohl eine Überprüfung der Virusvermehrung, der Inokulumdichte wie auch der genetischen Zusammensetzung des Virus angezeigt.

Eine weitere Möglichkeit zur Resistenzherzeugung bietet die Herstellung transgener virusresistenter Pflanzen. Diese Pflanzen werden mit viralen Sequenzen transformiert, die zur Ausbildung von doppelsträngigen (ds) RNA-Strukturen führen. Diese Strukturen stellen das Startermolekül für den pflanzeigenen Virusresistenzmechanismus des „RNA-Silencing“ dar (Baulcombe 2004; Filipowicz et al., 2005). Dieser degradiert sequenzspezifisch die eindringenden, sich vermehrenden Viren, was schlussendlich zur Ausbildung einer Infektionsresistenz führen kann. Die Erzeugung transgener BNYVV-Resistenz in Zuckerrüben wurde von Lennefors et al. (2008) beschrieben.

Freisetzungsversuche werden in den USA durchgeführt. Bisher ist jedoch eine Markteinführung nicht in Sicht. Aufgrund fehlender gesellschaftlicher Akzeptanz stehen derartige transgene Pflanzen für den Anbau in Deutschland auf absehbare Zeit nicht zur Verfügung.

## 2 Die Funktionen des viralen Pathogenitätsfaktors P25

### 2.1 Genomorganisation des BNYVV

Die meisten BNYVV-Isolate bestehen aus vier RNA-Segmenten, einige Isolate aus Asien und Europa tragen jedoch eine zusätzliche RNA-Komponente in ihrem Genom (siehe Kapitel 1.1.). Die einzelsträngigen RNAs werden jeweils in stäbchenförmige Partikel verpackt und sind nur mit Hilfe der Elektronenmikroskopie optisch darstellbar (*Putz, 1977*). Die BNYVV Genomorganisation ist in Abbildung 2 dargestellt. Der Leserahmen der RNA1 translatiert für ein Polyprotein, welches für die Replikation verantwortlich ist (*Bouzoubaa et al., 1987; Richards und Tamada, 1992*). Die RNA2 kodiert mehrere Leserahmen (*Bouzoubaa et al., 1987*). Der am 5'-Ende liegende Leserahmen translatiert das Hüllprotein („Coat protein“), welches neben der Verpackung mit für die Übertragung verantwortlich ist (*Niesbach-Klosgen et al., 1990; Haeberle et al., 1994*). Der sich anschließende „triple gene block“, der aus drei überlappenden Leserahmen besteht, ist für die Ausbreitung innerhalb und zwischen pflanzlichen Zellen verantwortlich (*Gilmer et al., 1992*). Der am 3'-Ende liegende Leserahmen translatiert das Protein P14, welches die Funktion eines Pathogenitätsfaktors besitzt (*Gilmer et al., 1992*) und darüber hinaus den Resistenzmechanismus des „RNA-Silencing“ teilweise unterdrücken kann (*Dunoyer et al., 2002*). Die RNA3 ist für die Symptomausprägung verantwortlich. Auf ihr ist der Pathogenitätsfaktor P25 kodiert (siehe Kapitel 2.2.). Der Leserahmen der RNA4 kodiert das Protein P31, welches ebenfalls für die Vektor-Übertragung verantwortlich ist (*Tamada und Abe, 1989; Rahim et al., 2007*). RNA5 kommt nur in Isolaten der Typen P bzw. J vor und trägt einen zweiten Pathogenitätsfaktor P26. Durch P26 werden die Krankheitssymptome verstärkt (*Heijbroek et al., 1999*). Allerdings zeigen nur P-Typ RNA5-Isolate deutlich höhere virale Aggressivität und führen zu höheren Ertragsverlusten.

## 2.2 Funktionen des Pathogenitätsfaktors P25

Die RNA3 ist essentiell für die Pathogenität des BNYVV, d.h. nur durch ihre Anwesenheit und die Expression des darauf kodierten P25-Proteins ist eine vollständige Ausbreitung im gesamten Wurzelsystem für das Virus möglich (Tamada et al., 1989; Koenig et al., 1991; Jupin et al., 1992). P25 ist weiterhin für die Symptomausprägung an Blatt und Wurzel wie auch für die Aggressivität verantwortlich. Das beobachtete anormale Wurzelwachstum wird durch Störungen im Phytohormonhaushalt induziert (Peltier et al., 2010). Poggi Pollini und Giunchedi (1989) und Poggi Pollini et al. (1990) beschrieben, dass BNYVV-anfällige Zuckerrüben auf eine Infektion mit erhöhten Konzentrationen des Phytohormons Auxin reagieren. Auxine sind an vielen pflanzlichen Wachstums- und Entwicklungsprozessen, wie Zellelongation und Seitenwurzelbildung beteiligt (Teale et al., 2006). Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass die Erhöhung der Auxingehalte in resistenten Pflanzen nach Infektion nicht beobachtet wird (Poggi Pollini et al., 1990).

P25-Proteine weisen zwischen unterschiedlichen BNYVV-Isolaten insgesamt nur eine geringe Sequenzvariabilität auf. Nur innerhalb einer Abfolge von vier Aminosäuren (AS), der Tetrade AS67-70 und an Position 135 wird hohe Variabilität nachgewiesen (Tamada et al., 2003; Schirmer et al., 2005; Acosta-Leal et al., 2008; Chiba et al., 2008; Koenig et al., 2008; Rush et al., 2006). Änderungen innerhalb der Aminosäuretetrade können zu starken Veränderungen der viralen Aggressivität in Zuckerrüben führen. Tabelle 1 zeigt sämtliche der bisher identifizierten P25-Tetradenvarianten. Die funktionelle Charakterisierung des P25 ist weit fortgeschritten. Vetter et al. (2004) zeigten, dass P25 sowohl im Zellkern wie auch im Cytoplasma lokalisiert ist und identifizierten funktionelle Domänen für diese Eigenschaften (Abb. 3). Aktuelle Arbeiten am Institut für Zuckerrübenforschung untersuchen die Beteiligung der Interaktion von P25 mit pflanzlichen Proteinen an der Viruspathogenität und der Rizomaniaresistenz. In Nachweissystemen zur Protein-Protein-Interaktion identifizierte Kandidatengene der Zuckerrübe umfassen 36 Interaktionspartner, die möglicherweise für eine BNYVV-Vermehrung bzw. -Resistenz verantwortlich sein können (Thiel und Varrelmann, 2009). Postulierte Funktionen sind u. a. eine Erkennung des P25, Ubiquitinierung und somit Zelldegradation, eine Beteiligung am

Phytohormonstoffwechsel oder dem Zellwand- und Zytoskeltaufbau (Thiel und Varrelmann, 2009).

### 3 Das Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten

Das Auftreten resistenzüberwindender Isolate an geografisch unabhängigen Orten (Abb. 4) wurde bereits wenige Rotationen nach Einführung von Sorten mit Resistenzeigenschaften beschrieben (Liu und Lewellen, 2007; Pferdmenges et al., 2009; Acosta-Leal et al., 2010a; Bornemann und Varrelmann, 2011; Chiba et al., 2011). Die Beobachtung des Auftretens von erhöhten BNYVV-Gehalten in *Rz1*-Genotypen, nicht jedoch in Pflanzen mit zwei unterschiedlichen Major-Resistenzgenen *Rz1+Rz2* bei einer Verwendung von Feldbodenproben in Gewächshausversuchen, deutete auf eine *Rz1*-spezifische Resistenzüberwindung hin. Mit verschiedensten Hypothesen wurde versucht, das Phänomen der Resistenzüberwindung zu erklären. Prinzipiell bestand die Möglichkeit, dass weitere bodenbürtige Krankheitserreger wie z.B. *Rhizoctonia*, *Fusarium* oder Nematoden synergistische Effekte ausüben und die Virusvermehrung unterstützen. Darüber hinaus wurde angenommen, dass nur durch eine Erhöhung des Inokulumpotentials im Boden, auch bei Anbau von resistenten Sorten, die quantitative Resistenz überwunden werden könnte. Auch eine Resistenzinstabilität in Abhängigkeit von Umweltbedingungen wie Temperatur und Feuchtigkeit wurde postuliert, ebenso wie auch eine Beeinflussung durch den Genotyp und die Übertragungseffizienz des Vektors *Polymyxa betae*.

In Gewächshausversuchen führten Feldbodenproben aus Regionen, in denen Resistenzüberwindung beobachtet wurde, an Jungpflanzen resistenter Genotypen zu erhöhten Virusgehalten und Rizomania-Symptomen. Daher wurde eine genetische Anpassung des Virus vermutet. Pflanzenviren erreichen häufig extrem hohe Populationsdichten im Wirtsgewebe. Aufgrund der fehlenden Fehlerkorrekturfähigkeit liegt die Mutationsrate bei RNA-Viren relativ hoch (Roossinck, 1997; Holland und Domingo, 1998; Garcia-Arenal et al., 2003). Dies führt bereits innerhalb einer infizierten Pflanze zur Bildung einer Vielzahl von unterschiedlichen Sequenzvarianten, die um eine so genannte Mastersequenz variieren und sehr anpassungsfähig sind. Die zugrunde liegenden



Mechanismen sind Mutation, Rekombination und Reassortierung (Austausch von Genomkomponenten) bei multipartiten Genomen. Es wird daher bei Viruspopulationen auch von einer Quasispezies gesprochen (Roossinck, 1997). Aufgrund dieser Eigenschaften war zu erwarten, dass durch die Verwendung einer monogenen quantitativen Resistenz und dem daraus folgenden erhöhten Selektionsdruck resistenzüberwindende BNYVV Isolate mit veränderten Genomen auftreten würden. Dieses Phänomen von Selektionsdruck und Anpassung ist jedoch nicht spezifisch für eine Resistenzform zu erwarten. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass auch jede andere Resistenzform einen Druck auf die Viruspopulation zur Selektion von Isolaten mit der Fähigkeit zur Vermehrung und Ausbreitung ausübt (Roossinck, 1997). Allerdings kann sich durch Mutationen die Fitness von Isolaten in anfälligen Genotypen auch zum Nachteil verändern.

In Arbeiten, die resistenzüberwindende BNYVV-Isolate identifizierten, wurden wie in Kapitel 2.1 beschrieben besondere Zusammensetzungen im Bereich der P25-Tetrade AS67-70 beobachtet (Tab. 1). Koenig et al. (2009) trennten die BNYVV-Zuckerrübeninfektion vom Vektor *Polymyxa betae* und zeigten mittels Mutageneseverfahren den Einfluss von Mutationen der Tetrade auf die BNYVV-Aggressivität. Acosta-Leal et al. (2010b) wiesen in populationsgenetischen Experimenten nach, dass die BNYVV-Vermehrung in resistenten Genotypen zu einer erhöhten Variabilität der Tetrade führt. Die experimentelle Selektion von Mutationen mit bekannten, resistenzüberwindenden Eigenschaften konnte bisher jedoch noch nicht gezeigt werden.

Im Zuckerrübenanbau werden derzeit ausschließlich teilresistente Sorten angebaut, die die Virusvermehrung nur reduzieren, jedoch nicht unterbinden und dabei mit Ertragstoleranz reagieren. Nicht nur der Resistenzmechanismus ist bisher unbekannt, auch der von ihm ausgeübte Selektionsdruck auf die Viruspopulation kann bisher nicht quantifiziert werden. Da experimentelle Systeme zur Untersuchung und ggf. Quantifizierung des Selektionsdrucks bisher fehlen, kann die zu fordernde maximale Dauerhaftigkeit von Virusresistenz nicht geprüft und damit optimiert werden.

Die BNYVV-Populationsdynamik ist unverstanden. Es ist unklar, warum sich einige Isolate geografisch nicht ausbreiten. Weder der A- noch der P-Typ traten bisher in Deutschland auf, obwohl eine Verbreitung über verschiedene Wege wie beispielsweise Überschwemmungsereignisse möglich gewesen wären (Koenig et al., 2008). Dabei spielen

Faktoren wie eine ausreichende Bodenfeuchtigkeit eine entscheidende Rolle, da die begeißelten *Polymyxa*-Zoosporen sich nur so verbreiten können.

#### **4 Wird Rizomania-Resistenzstabilität durch den Vektor *Polymyxa betae* beeinflusst?**

Da die Infektion mit BNYVV unter natürlichen Bedingungen von einem Vektor abhängig ist, dessen mobile Infektionseinheiten (Zoosporen) außerordentlich feuchtigkeits- und temperaturabhängig sind, wurde ein Einfluss von *Polymyxa betae* auf die Rizomania-Resistenzstabilität vermutet. Dies konnte bisher aber nicht bestätigt werden. Durch Variation der Inokulumdichte in Gewächshausversuchen mit Zuckerrübenjungpflanzen wurde jedoch gezeigt, dass unter kontrollierten Bedingungen eine Resistenzüberwindung unabhängig vom Inokulumpotential des Vektors und des Virus stattfindet (*Pferdmenges* und *Varrelmann*, 2009). In weiteren Gewächshausversuchen wurde der Frage nachgegangen, ob bestimmte BNYVV-Isolate mit unterschiedlicher Aggressivität [A, P, IV- (Imperial Valley in Kalifornien)] auch nach Übertragung durch die gleiche *Polymyxa betae*-Population ihre resistenzüberwindenden Eigenschaften beibehalten (*Bornemann* und *Varrelmann*, 2011). Zu diesem Zweck musste das Verfahren der Beladung von *Polymyxa betae* optimiert und an die Anforderungen von Topfversuchen mit großer Wiederholungszahl und hohem Substratbedarf angepasst werden. Es wurden die Wurzeln anfälliger Zuckerrüben-Jungpflanzen nach der Methode von *Koenig* und *Stein* (1990) mit unterschiedlichen BNYVV-Isolaten mechanisch inokuliert (Vortexinokulation) und in sterilem Boden kultiviert (Abb. 5). Nach fünf Wochen wurde ein Teil der Seitenwurzeln entfernt und mittels „Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) (*Clark* und *Adams*, 1977) die Virusgehalte quantifiziert. Weiterhin wurde über Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit anschließender Sequenzierung die Identität der Isolate überprüft und bestätigt. Die Pflanzen wurden anschließend in einen Feldboden gepflanzt, der den Vektor *Polymyxa betae*, jedoch keine Zuckerrüben infizierenden Viren enthielt. Nach einer weiteren Kulturzeit von fünf Wochen wurden die Pflanzen geerntet und ein Teil der Seitenwurzeln im Boden belassen. Der Boden wurde luftgetrocknet und erneut in Töpfe gefüllt. In diesen Töpfen wurde ein kreuzklassifizierter Resistenztest mit

anfälligen (KWS3), *Rz1*-resistenten (Beta4430) und *Rz1+Rz2*-resistenten (Angelina) Hybriden angesetzt. Nach zehn Wochen wurden erneut die Seitenwurzeln geerntet und die Virusgehalte bestimmt. Die Ergebnisse des Resistenztests zeigt Abbildung 7. Ausgehend von einer identischen *Polymyxa betae*-Population und einer natürlichen Übertragung bei der Infektion von anfälligen, resistenten und doppelt resistenten Zuckerrüben-Genotypen zeigten sich teilweise signifikante Unterschiede des Virusgehaltes. Auffällig ist der Unterschied in der Infektion der anfälligen Genotypen zwischen den Varianten. Der A-Typ ist in der Lage, höhere Virusgehalte hervorzurufen als die resistenzüberwindenden Isolate IV und P, was zunächst so nicht zu erwarten war. Sowohl der IV- als auch der P-Typ waren andererseits in der Lage, den resistenten Genotypen mit höheren Virusgehalten als der A-Typ zu infizieren. Bei dem doppelt resistenten (*Rz1+Rz2*) Genotyp Angelina konnten in keiner Variante höhere Virusgehalte nachgewiesen werden, lediglich einzelne Pflanzen wurden gering infiziert.

## 5 Einfluss der Temperatur auf die Resistenzstabilität

Resistenzüberwindende Isolate mit vier RNA-Komponenten traten bislang nur in klimatisch wärmeren Regionen des Zuckerrübenanbaus auf (Abb. 4). Daher sollte in Gefäßversuchen ein möglicher Zusammenhang zwischen der Bodentemperatur und der Resistenzstabilität überprüft werden. Anfällige und *Rz1*-resistente Genotypen wurden in Gefäßen mit infiziertem Feldboden außerhalb des Gewächshauses unter natürlichen Bedingungen kultiviert. Jeweils eine Variante mit 32 Einzelpflanzen (Wiederholungen) wurde über eine Bodenheizung beheizt. Über einen Regler konnten definierte Temperaturdifferenzen zur unbeheizten Variante eingestellt werden. Die Virusgehalte in den Seitenwurzeln sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Ernte erfolgte nach sechs Wochen Kulturdauer mit anschließender Bestimmung der Virusgehalte mittels ELISA. Die Temperaturdifferenz zwischen den Varianten wurde täglich kontrolliert und angepasst. Eine ausreichende Bodenfeuchtigkeit war während des Versuches gegeben und wurde täglich bestimmt (Daten nicht gezeigt). Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass die beheizte Variante höhere Virusgehalte aufweist als die unbeheizte Variante. Der resistente Genotyp

zeigte nur in einem Durchgang eine geringe Infektion, während beim anfälligen Genotyp in allen Durchgängen erhebliche Virusgehalte nachgewiesen werden konnten.

Neben erhöhten Temperaturen treten in den von Resistenzüberwindung betroffenen Regionen zudem häufig Bewässerungs- und/oder Überschwemmungsereignisse auf. Ob diese zu einer Beteiligung der Vektorpopulation an der Resistenzüberwindung führen, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

## 6 Diskussion

Die züchterische Entwicklung von Sorten mit BNYVV-Resistenzeigenschaften hat nach der schnellen Verbreitung der Krankheit in den 1980er Jahren den wirtschaftlichen Zuckerrübenanbau gesichert. Umfangreiche Züchtungsprogramme haben Sorten hervorgebracht, die auch unter Nichtbefall ein Ertragspotential vergleichbar zu anfälligen Sorten besitzen. Die Konzentration der Prüfung von Toleranzeigenschaften im Rahmen der Sortenzulassung hat diesen Fortschritt ebenfalls vorangetrieben. Seit 2006 werden beim Bundessortenamt keine BNYVV-anfälligen Sorten mehr zur Zulassung angemeldet.

Es handelt sich jedoch bei der Krankheit um ein bodenbürtiges Pathogen mit großer Persistenz und der Fähigkeit, sehr hohe Populationsdichten sowohl in der Pflanze, wie auch im Boden ausbilden zu können. Darüber hinaus besitzt der Erreger wie alle Pflanzenviren eine hohe genetische Flexibilität und kann sich schnell an neue Umweltbedingungen anpassen.

Die Gesamtbetrachtung der Forschungsaktivitäten zum Auftreten von resistenzüberwindenden BNYVV-Isolaten der vergangenen Jahre zeigt deutlich, dass sich Isolate mit bestimmten Mutationen in geografisch unabhängigen Regionen in Feldböden anreichern und sich innerhalb der vorhandenen BNYVV-Population ausbreiten bzw. diese möglicherweise lokal auch verdrängen können. Die Resistenz ist jedoch in der Mehrzahl der Anbauggebiete über eine Vielzahl von Zuckerrübenkulturen in der Rotation seit Einführung der ersten toleranten Sorten stabil.

Die züchterische Fokussierung zu Beginn der BNYVV-Epidemie auf ein dominantes Hauptmerkmal und der weltweite Anbau von Sorten mit hauptsächlich einer

Resistenzquelle (*RzI*) war ökonomisch sinnvoll. Auch wenn schlussendlich der experimentelle Beweis für eine Selektion von resistenzüberwindenden Isolaten durch den Anbau von Sorten mit *RzI*-Resistenz noch fehlt, so verdichten sich die experimentellen Befunde für eine Bestätigung dieser Hypothese. Von *Koenig et al.* (2009) konnte unter Verwendung von RNA3 cDNA-Klonen mit spezifischen Mutationen der Tetrade AS67-70 gezeigt werden, dass ein Aminosäureaustausch (Alanin-Valin) an Position 67 des P25 für die Fähigkeit verantwortlich ist, erhöhte Virusgehalte in *RzI*-resistenten Genotypen zu erzeugen. Weitere Untersuchungen wiesen eine erhöhte Variabilität dieser Tetrade in *RzI*-resistenten Sorten nach (*Acosta Leal et al.*, 2008). Die experimentellen Befunde, dass eine modifizierende Wirkung der Inokulumdichte (*Pferdmenges und Varrelmann*, 2009) und der Vektorübertragungseigenschaften (*Bornemann und Varrelmann*, 2011) als unbedeutend eingestuft werden kann, unterstützen diese Hypothese. Durch die Beladung einer identischen *Polymyxa betae*-Population mit verschiedenen BNYVV-Isolaten konnte im anschließenden Resistenztest gezeigt werden, dass die unterschiedliche Pathogenität, die im Feld beobachtet wurde (*Liu et al.*, 2005; *Pferdmenges et al.*, 2009), auch unter standardisierten Gewächshausbedingungen wiederzufinden war. Diese Ergebnisse bestätigen ebenfalls die Arbeiten von *Koenig et al.* (2009). Der BNYVV A-Typ zeigte im Vergleich zu IV und P höhere Virusgehalte im anfälligen Genotyp. Dies deutet auf eine mögliche verminderte Fitness der resistenzüberwindenden Isolate hin. Möglicherweise gibt es einen Zusammenhang zwischen der P25-Variabilität und der *RzI*-Resistenz, wodurch das Virus in der Lage ist, hohe Virusgehalte zu verursachen bzw. sich vermehrt zu replizieren. Auch *Acosta Leal et al.* (2010a und 2010b) berichten von einem derartigen Zusammenhang.

Da BNYVV nur über eine pflanzlicher Resistenz sinnvoll und erfolgreich bekämpft werden kann, ist zu diskutieren, wie die Dauerhaftigkeit der Resistenz erhöht werden kann.

Trotz intensiver Forschungstätigkeit ist der zugrunde liegende *RzI*-Resistenzmechanismus bisher nicht verstanden. Unklar ist, warum er in Linien zu niedrigen Virusgehalten führt, in Sorten jedoch sehr variable Virusgehalte gemessen werden können (*Varrelmann*, unveröffentlichte Ergebnisse). Dies weist auf weitere, sortenspezifisch modifizierende genetische Faktoren hin. Ein tieferes molekulares Verständnis der Wirt-Virus Interaktion bzw. der molekularen Wechselwirkung würde helfen, zukünftige

Selektionskriterien zu definieren. Für ein erfolgreiches Resistenzmanagement müsste ebenfalls experimentell gezeigt werden, welche Form der Resistenz- bzw. Toleranzausprägung dauerhafter ist. Aus solchen zu entwickelnden Systemen können jedoch nur Anhaltspunkte für ein Verhalten von Sorten unter natürlichen Umwelt- und praktischen Anbaubedingungen abgeleitet werden.

Weiterhin fehlt bisher ein grundlegendes Verständnis zur Wechselwirkung und zur Fitness von BNYVV-Isolaten unterschiedlicher Aggressivität bzw. Vermehrungseigenschaften in verschiedenen Zuckerrüben-Genotypen. Insbesondere stellt sich die Frage, ob und wie schnell sich selektierte Virusisolate in der bereits vorhandenen Population im Boden durchsetzen können. Bisher gibt es nur erste Hinweise darauf, dass resistenzüberwindende Isolate sich in anfälligen Genotypen mit geringerer Effizienz vermehren können (Abb. 6). Bei diesem Vorgang spielt wahrscheinlich die horizontale Ausbreitung von *Polymyxa betae* eine entscheidende Rolle. Mit hoher Bodenfeuchte bzw. bei Be-, Entwässerungs- und Überschwemmungsereignissen können sich Zoosporen, beladen mit aggressiven Isolaten, ggf. über große Distanzen innerhalb eines Feldes oder einer Region ausbreiten. Nachfolgend kann das Isolat an vielen neuen Orten die vorhandene, weniger aggressive Viruspopulation verdrängen. Diese Eigenschaften müssen sicherlich im Rahmen eines Resistenzmanagements mit berücksichtigt werden.

Weitere *Rz*-Resistenzgene sind beschrieben, haben jedoch aufgrund der fehlenden Leistung erst in wenigen Fällen die Marktreife erreicht. Wie die o. a. Arbeiten zur Beschreibung der Eigenschaften aggressiver BNYVV-Isolate zeigen, wird eine Kombination mehrerer Major-Resistenzgene von diesen Isolaten aktuell nicht überwunden. Dies deutet auf unterschiedliche virale Zielmoleküle bzw. modifizierte Resistenzmechanismen hin und lässt vermuten, dass eine Kombination mehrerer Major-Resistenzgene basierend auf unterschiedlichen Mechanismen die Wahrscheinlichkeit eines Auftretens aggressiver Isolate mit resistenzüberwindenden Eigenschaften erheblich reduzieren wird. Damit stellt diese Strategie mit Sicherheit die Methode der Wahl dar. Die Notwendigkeit einer intensiven phytopathologischen Beschreibung der Genotyp-abhängigen Virusvermehrung und der Reaktion der Viruspopulation auf den resistenten oder toleranten Genotyp bleibt jedoch weiterhin bestehen. Die methodischen Entwicklungen der letzten Jahre im Bereich der Hochdurchsatzsequenzierung ermöglichen

jetzt erstmals eine regelmäßige Überwachung der genetischen Zusammensetzung von Viruspopulationen auch im Feldmaßstab.

Durch eine Erhöhung der Bodentemperatur um wenige Grad Celsius, wie sie mittel- und langfristig durch den Klimawandel prognostiziert wird, scheint es an Standorten mit B-Typ-Infektion kein erhöhtes Risiko einer Resistenzüberwindung zu geben. Zwischen den einzelnen Durchgängen des oben beschriebenen Versuches zeigt sich eine hohe Variation der Virusgehalte, die durch unbekannte Umweltbedingungen verursacht wurde. Es wird jedoch deutlich, dass der resistente Genotyp nicht infiziert wurde. Nach dem dritten Durchgang zeigte sich eine geringe BNYVV-Infektion, die auf eine Anreicherung von Mutationen zurückzuführen sein könnte. Aus der Literatur sind Angaben zu einem Temperatur-Optimum für die Infektion der Zuckerrüben-Wurzeln mit *Polymyxa betae* bekannt, welches bei 25 °C liegt (Blunt et al., 1991; Webb et al., 2000). Es kann geschlussfolgert werden, dass weder der Vektor noch die Temperatur einen direkten bzw. alleinigen Einfluss auf mögliche Resistenzüberwindungsereignisse haben. Auch wenn Untersuchungen zur Resistenzstabilität in Abhängigkeit von z.B. Bodentemperaturen, wie hier unter definierten Bedingungen durchgeführt, nicht auf eine starke Umweltabhängigkeit hinweisen, ist eine Prüfung der umweltvariablen Virusvermehrung und Resistenzstabilität in verschiedenen geografischen Regionen unter Feldbedingungen weiterhin angezeigt.

Das hier betrachtete System Zuckerrübe-Rizomania ist repräsentativ für die generelle Abhängigkeit des Anbaus landwirtschaftlicher Kulturpflanzen vom Befall mit Schaderregern. BNYVV besitzt höchste Persistenz und Schadpotential und weist gegenüber Selektionsfaktoren wie pflanzlicher Resistenz hohe genetische Flexibilität und damit Anpassungsfähigkeit auf. Ein erfolgreiches Resistenzmanagement besitzt aktuell und in Zukunft höchste Bedeutung für die weltweite Anbauwürdigkeit und wirtschaftliche Konkurrenzfähigkeit von Zuckerrüben.

### **Danksagung**

Das Klima-Projekt wird unterstützt vom Niedersächsischen Ministerium für Wissenschaft und Kultur innerhalb des Netzwerkes KLIFF – Klimawandel und Anpassungsstrategien in

Niedersachsen. Besonderer Dank gilt *Annette Walter, Valeska Pollzien, Helmut Korf* und *Manfred Jordan* für die technische Assistenz.

## Literatur

1. *Abe, H.; Tamada, T.* (1986): Association of beet necrotic yellow vein virus with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. Annual Phytopathological Society Japan 52, 235–247
2. *Acosta-Leal, R.; Fawley, M.W.; Rush, C.M.* (2008). Changes in the inraisolate genetic structure of *Beet necrotic yellow vein virus* populations associated with plant resistance breakdown. Virology 376, 60–68
3. *Acosta-Leal, R.; Bryan, K.B.; Smith, J.T.; Rush, C.M.* (2010a). Breakdown of host resistance by independent evolutionary lineages of *Beet necrotic yellow vein virus* involves a parallel C/U mutation in its p25 gene. Phytopathology 100, 127–133
4. *Acosta-Leal, R.; Bryan, B.K.; Rush, C.M.* (2010b). Host Effect on the Genetic Diversification of *Beet necrotic yellow vein virus* Single-Plant Populations. Phytopathology 100, 1204–1212
5. *Baulcombe, D.* (2004): RNA silencing in plants. Nature 431, 356-363
6. *Biancardi, E.; Lewellen, R.T.; de Biaggi, M.; Erichsen, A.W.; Stevanato, P.* (2002): The origin of rhizomania resistance in sugar beet, Euphytica 127, 383–397
7. *Blunt, S.J.; Asher, M.J.C.; Gilligan, C.A.* (1991): Infection of sugar beet by *Polymyxa betae* in relation to soil temperature. Plant Pathol. 40, 257–267
8. *Bornemann, K.; Varrelmann, M.* (2011): Analysis of the resistance-breaking ability of different *Beet necrotic yellow vein virus* isolates loaded into a single *Polymyxa betae* population in soil. Phytopathology 101, 718-724
9. *Bouzoubaa, S.; Quillet, L.; Guilley, H.; Jonard, G.; Richards, K.* (1987): Nucleotide sequence of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA1. J. Gen. Virol. 68, 615–626
10. *Bürcky, K.* (1987): BNYVV-Resistenz induzierende Merkmale und deren mögliche Nutzung zur Selektion rizomaniatoleranter Zuckerrüben. Proceedings of the 50<sup>th</sup> IIRB Congress , 11-12 February 1987, Brüssel, Belgien, 131–137



11. *Canova, A.* (1959): Appunti di patologia della barbabietola, *Inf. Fitopatol.* 20, 390–396
12. *Chiba, S.; Miyanishi, M.; Andika, I.B.; Kondo, H.; Tamada, T.* (2008): Identification of amino acids of the Beet Necrotic Yellow Vein Virus P25 protein required for induction of the resistance response in leaves of *Beta vulgaris* plants. *J. Gen. Virol.* 89, 1314–1323
13. *Chiba, S.; Kondo, H.; Miyanishi, M.; Andika, I. B.; Han, C.; Tamada, T.* (2011): The Evolutionary History of *Beet necrotic yellow vein virus* Deduced from Genetic Variation, Geographical Origin and Spread, and the Breaking of Host Resistance. *MPMI* 24, 207–218
14. *Clark, M.F.; Adams, A.N.* (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 475–483
15. *Dunoyer, P.; Pfeffer, S.; Fritsch, C.; Hemmer, O.; Voinnet, O.; Richards, K.E.* (2002): Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by *Peanut clump virus*. *The Plant Journal* 29, 555–567
16. *Filipowicz, W.; Jaskiewicz, L.; Kolb, F.A.; Pillai, R.S.* (2005): Posttranscriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. in Struc. Biol.* 15, 331–341
17. *Garcia-Arenal, F.; Fraile, A.; Malpica, J.M.* (2003): Variation and evolution of plant virus populations. *Int. Microbiol.* 6, 225–232
18. *Gidner, S.; Lennefors, B.L.; Nilsson, N.O.; Bensefelt, J.; Johansson, E.; Gyllenspetz, U.; Kraft, T.* (2005): QTL mapping of BNYVV resistance from the Wb41 source in sugar beet. *Genome* 48, 279–285
19. *Gilmer, D.; Bouzoubaa, S.; Hehn, A.; Guilley, H.; Richards, K.; Jonard, G.* (1992): Efficient cell-to-cell movement of *Beet necrotic yellow vein virus* requires 3' proximal genes located on RNA2. *Virology* 189, 40–47
20. *Grimmer, M.; Trybush, S.; Hanley, S.; Francis, S.; Karp, A.; Asher, M.* (2007): An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to Beet necrotic yellow vein virus. *TAG* 114, 1151–1160

21. *Haeberle, A.M.; Stussi-Garaud, C.; Schmitt, C.; Garaud, J.C.; Richards, K.E.; Guilley, H.; Jonard, G.* (1994): Detection by immunogold labelling of P75 readthrough protein near an extremity of *Beet necrotic yellow vein virus* particles. *Archives of Virology* 134, 195–203
22. *Harju, V.A.; Mumford, R.A.; Bockley, A.; Boonham, N.; Clover, G.R.G.; Weekes, R.; Henry, C.M.* (2002): Occurrence in the United Kingdom of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Isolates which contain RNA 5. *Plant Pathol.* 51, 811
23. *Heijbroek, W.; Musters, P.M.S.; Schoone, A.H.L.* (1999): Variation in pathogenicity and multiplication of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in relation to the resistance of sugar-beet cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 397–405
24. *Holland, J.J.; Domingo, E.* (1998): Origin and evolution of viruses. *Virus Genes* 16, 13–21
25. *Johansson, E.* (1985) Rhizomania in sugar beet – a threat to beet growing that can be overcome by plant breeding. *Sveriges Utsädesförenings Tidskrift* 95, 115–121
26. *Jupin, I.; Guilley, H.; Richards, E.; Jonard, G.* (1992): Two proteins encoded by *Beet necrotic yellow vein virus* RNA3 influence symptom phenotype on leaves. *The EMBO Journal* 11, 479–488
27. *Keskin, B.* (1964): *Polymyxa betae* n.sp., ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. *Archiv für Mikrobiologie* 49, 218–226
28. *Koenig, R.; Stein, B.* (1990): Distribution of Beet necrotic yellow vein virus in mechanically inoculated sugar beet plantlets of cultivars with different degrees of rhizomania resistance. *Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, Vol. 1. Proceedings of the First Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Braunschweig, Germany, August 21-24*, 87–90
29. *Koenig, R.; Jarausch, W.; Li, Y.; Commandeur, U.; Burgermeister, W.; Gehrke, M.; Lüddecke, P.* (1991): Effect of recombinant Beet necrotic yellow vein virus with different RNA compositions on mechanically inoculated sugar beets. *J. Gen. Virol.* 72, 2243–2246

30. Koenig, R.; Haeberle, A.-M.; Commandeur, U. (1997): Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugarbeet growing area in Europe. *Arch. Virol.* 142, 1499–1504
31. Koenig, R.; Lennefors, B.L. (2000): Molecular analyses of European A, B and P type sources of Beet necrotic yellow vein virus and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Arch. Virol.* 145, 1561–1570
32. Koenig, R.; Kastirr, U.; Holtschulte B.; Deml, G.; Varrelmann, M. (2008): Distribution of various types and P25 subtypes of Beet necrotic yellow vein virus in Germany and other European countries. *Arch. Virol.* 153, 2139–2144
33. Koenig, R.; Loss, S.; Specht, J.; Varrelmann, M.; Lüddecke, P.; Deml, G. (2009): A single U/C nucleotide substitution changing alanine to valine in the *Beet necrotic yellow vein virus* P25 protein promotes increased virus accumulation in roots of mechanically inoculated, partially resistant sugar beet seedlings. *J. Gen. Virol.* 90, 759–763
34. Kutluk Yilmaz, N.D.; Meunier, A.; Schmit, J.F.; Stas, A.; Bragard, C. (2007): Partial nucleotide sequence analysis of Turkish isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) RNA-3. *Plant Pathol.* 56, 311–316
35. Lennefors, B.L.; Lindsten, K.; Koenig, R. (2000): First record of A and B type Beet necrotic yellow vein virus in sugar beets in Sweden. *Europ. J. Plant Pathol.* 106, 199–201
36. Lennefors, B.L.; van Roggen, P.M.; Yndgaard, F.; Savenkov, E.I.; Valkonen, J.P. (2008): Efficient dsRNA-mediated transgenic resistance to Beet necrotic yellow vein virus in sugar beets is not affected by other soilborne and aphidtransmitted viruses. *Transgenic Res.* 17, 219–228
37. Lewellen, R.T.; Skoyen, I.O.; Erichsen, A.W. (1987): Breeding sugar beet for resistance to rhizomania: Evaluation of host-plant reactions and selection for and inheritance. *Proceedings of the 50<sup>th</sup> IIRB Congress*, 11-12 February 1987, Brüssel, Belgien, 139–156
38. Liu, H.Y.; Sears, J.L.; Lewellen, R.T. (2005): Occurrence of resistance-breaking Beet necrotic yellow vein virus of sugar beet. *Plant Dis.* 89, 464–468

39. *Liu, H.-Y.; Lewellen, R.T. (2007):* Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of Beet necrotic yellow vein virus in the United States. *Plant Dis.* 91, 847–851
40. *Miyanishi, M.; Kusume, T.; Saito, M.; Tamada, T. (1999):* Evidence for three groups of sequence variants of beet necrotic yellow vein virus RNA 5. *Arch. Virol.*, 144, 879–892
41. *Niesbach-Klosgen, U.; Guilley, H.; Jonard, G.; Richards, K. (1990):* Immunodetection in vivo of Beet necrotic yellow vein virus encoded proteins. *Virology* 178, 52–61
42. *Peltier, C.; Schmidlin, L.; Klein, E.; Tacconnat, L.; Prinsen, E.; Erhardt, M.; Heintz, D.;*
43. *Weyens, G.; Lefebvre, M.; Renou, J.P.; Gilmer, D. (2010):* Expression of the Beet necrotic yellow vein virus p25 protein induces hormonal changes and a root branching phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *Transgenic Res.* 20, 443–66
44. *Pferdmenges, F.; Korf, H.; Varrelmann, M. (2009):* Identification of rhizomania-infected soil in Europe able to overcome *Rz1* resistance in sugar beet and comparison with other resistance-breaking soils from different geographic origins. *Eur. J. Plant Pathol.* 124, 31–43
45. *Pferdmenges, F.; Varrelmann, M. (2009):* Breaking of Beet necrotic yellow vein virus resistance in sugar beet is independent of virus and vector inoculum densities. *Eur. J. Plant Pathol.* 124, 231–245
46. *Poggi Pollini, C.; Giunchedi, L. (1989):* Comparative histopathology of sugar beets that are susceptible and partially resistant to rhizomania. *Phytopath. Medit.* 28, 16–21
47. *Poggi Pollini, C.; Masia, A.; Giunchedi, L. (1990):* Free indole-3-acetic acid in sugar beet of rhizomania susceptible and moderately resistant cultivars. *Phytopath. Medit.* 29, 191–195
48. *Putz, C. (1977):* Composition and structure of Beet necrotic yellow vein virus. *J. Gen. Virol.* 35, 397–401

49. *Rahim, M.D.; Andika, I.B.; Han, C.; Kondo, H.; Tamada, T.* (2007): RNA4-encoded P31 of Beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *J. Gen. Virol.* 88, 1611–1619
50. *Ratti, C.; Clover, G.R.G; Autonell, C.R.; Harju, V.A.; Henry, C.M.* (2004): A multiplex RT-PCR assay capable of distinguishing beet necrotic yellow vein virus types A and B. *J. Virol. Methods* 124, 41–47
51. *Richard-Molard M.* (1985): Beet rhizomania disease-the problem in Europe. Report of the 1984 British Crop Protection Conference – Pests and Diseases, 837–845
52. *Richards, K.; Tamada, T.* (1992): Mapping functions on the multipartite genome of Beet necrotic yellow vein virus. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 291–313
53. *Roossinck, M.J.* (1997): Mechanisms of plant virus evolution. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 191–209
54. *Rush, C.M.; Liu, H.-Y.; Lewellen, R.T.; Acosta-Leal, R.* (2006): The continuing saga of Rhizomania of sugar beets in the United States. *Plant Dis.* 90, 4-15
55. *Saito, M.; Kiguchi, T.; Kusume, T.; Tamada, T.* (1996): Complete nucleotide sequence of the Japanese isolate S of Beet necrotic yellow vein virus RNA and comparison with European isolates. *Arch. Virol.* 141, 2163–2175
56. *Schirmer, A.; Link, D.; Cognat, V.; Moury, B.; Beuve, M.; Meunier, A.; Bragard, C.; Gilmer, D.; Lemaire, O.* (2005): Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. *J. Gen. Virol.* 86, 2897–2911
57. *Scholten, O.E.; Paul, H.; Peters, D.; Van Lent, J.W.; Goldbach, R.W.* (1994): In situ localisation of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in rootlets of susceptible and resistant beet plants. *Arch. Virol.* 136, 349–361
58. *Scholten, O.E.; Jansen, R.C.; Keizer, L.C.P.; de Bock, T.S.M.; Lange, W.* (1996): Major genes for resistance to Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta vulgaris*. *Euphytica*, 91, 331–339
59. *Scholten, O.E.; de Bock, T.S.M.; Klein-Lankhorst, R.M.; Lange, W.* (1999): Inheritance of resistance to Beet necrotic yellow vein virus in *Beta vulgaris*, conferred by a second gene for resistance. *Theor. Appl. Genet.* 99, 740–746
60. *Scholten, O.E.; Lange, W.* (2000): Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: a review. *Euphytica* 112, 219–231

61. *Sohi, H.; Maleki, M. (2004): Evidence for presence of types A and B of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in Iran. Virus Genes 29, 353–358*
62. *Tamada, T.; Abe, H. (1989): Evidence that Beet necrotic yellow vein virus RNA-4 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. J. Gen. Virol. 70, 3391–3398*
63. *Tamada, T.; Shirako, Y.; Abe, H.; Saito, M.; Kiguchi, T.; Harada, T. (1989): Production and pathogenicity of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. J. Gen. Virol. 70, 3399–3409*
64. *Tamada, T.; Miyanishi, M.; Kondo, H.; Chiba, S.; Han, C.G. (2003): Pathogenicity and molecular variability of Beet necrotic yellow vein virus isolates from Europe, Japan, China, and the United States. 5<sup>th</sup> Symp. Of the Int. Working Group of Plant Viruses with Fungal Vectors, Zürich, Schweiz*
65. *Teale, W.D., Paponov, I.A. & Palme, K. (2006): Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 7, 847–859*
66. *Thiel, H.; Varrelmann, M. (2009): Identification of *Beet necrotic yellow vein virus* P25 pathogenicity factor – interacting sugar beet proteins that represent putative virus targets or components of plant resistance. MPMI 22, 999–1010*
67. *Verchot-Lubicz, J., Rush, C.M., Payton, M., Colberg, T. (2007): *Beet necrotic yellow vein virus* accumulates inside resting spores and zoosporangia of its vector *Polymyxa betae* BNYVV infects *P. betae*. Virology Journal 4, 37*
68. *Vetter, G.; Hily, J.-M.; Klein, E.; Schmidlin, L.; Haas, M.; Merkle, T.; Gilmer, D. (2004): Nucleo-cytoplasmatic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA3-encoded P25 protein. J. Gen. Virol. 85, 2459–2469*
69. *Ward, L.; Koenig, R.; Budge, G.; Garrido, C.; McGrath, C.; Stubbley, H.; Boonham, N. (2007): Occurrence of two different types of RNA-5-containing Beet necrotic yellow vein virus in the UK. Arch. Virol. 152, 59–73*
70. *Webb, C.R.; Gilligan, C.A.; Asher, M.J.C. (2000): Modelling the effect of temperature on the development of *Polymyxa betae*. Plant Pathol. 49, 600–607*
71. *Whitney, E.D. (1989): Identification, Distribution, and Testing for Resistance to Rhizomania in Beta-Maritima. Plant Dis. 73, 287–290*

**Tab. 1:** Sequenzvariationen der Aminosäuretetrade AS67-70 des Pathogenitätsfaktors P25 und seine verschiedenen Typen. Grau hinterlegte Aminosäuren kennzeichnen Tetradenzusammensetzungen von resistenzüberwindenden Isolaten.

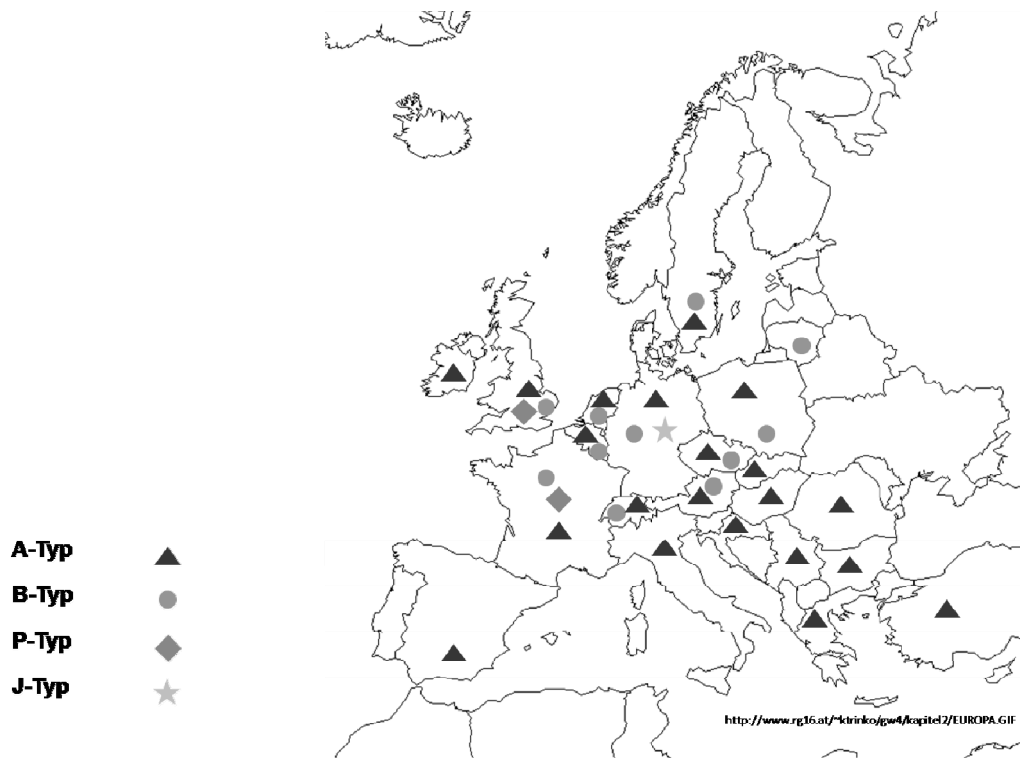
Aminosäure Position	67	68	69	70
A-Typ	A	C	H	G
	A	F	H	G
	A	H	H	G
	A	L	H	G
	A	S	H	G
	A	Y	F	G
	A	Y	H	G
	A	Y	P	R
	A	Y	R	V
	S	Y	H	G
	T	Y	P	R
	T	Y	H	G
	V	C	H	G
	V	L	H	G
B-Typ	A	H	H	R
	A	Y	H	G
	A	Y	H	V
J-Typ	A	Y	R	G
	A	Y	H	G
	A	F	H	G
P-Typ*	S	Y	H	G

\* erhöhte Aggressivität beruht auf dem Vorhandensein einer fünften RNA und nicht auf der Zusammensetzung der Tetrade.

**Tab. 2:** Mittlere Virusgehalte ( $n = 32$ ) in Seitenwurzeln anfälliger und resistenter Zuckerrübenotypen in Abhängigkeit von der Bodentemperatur nach sechs Wochen Kulturdauer. Dargestellt sind die Durchgänge 1- 5 mit den unterschiedlichen Temperaturdifferenzen und durchschnittlichen Bodentemperaturen. In grün dargestellte Werte kennzeichnen die Durchgänge, die außerhalb des Gewächshauses stattgefunden haben. Die Werte des dritten, vierten und fünften Durchganges wurden innerhalb des Gewächshauses erhoben.

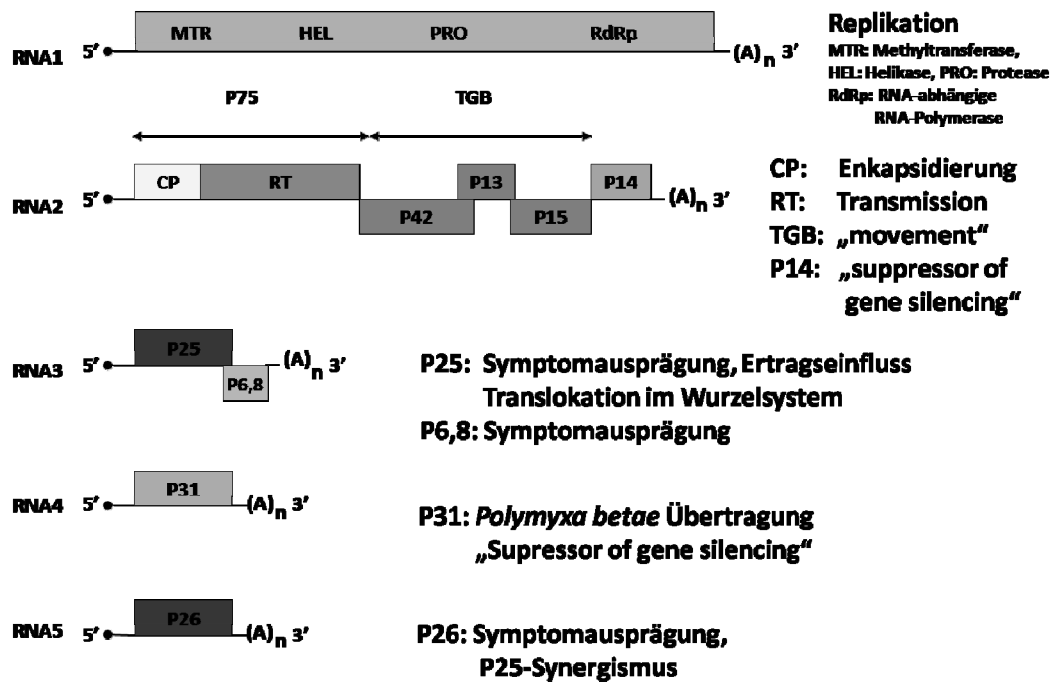
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Durchschnittstemperatur beheizt</b>	25,6 °C	23,5 °C	21,5 °C	19,7 °C	22,8 °C
<b>Durchschnittstemperatur unbeheizt</b>	21,4 °C	15,2 °C	19,9 °C	17,2 °C	20,1 °C
<b>Temperaturdifferenz</b>	<b>4,2 °C</b>	<b>8,3 °C</b>	<b>1,6 °C</b>	<b>2,5 °C</b>	<b>2,7 °C</b>
Virusgehalte in Seitenwurzeln in $\text{ng ml}^{-1}$ Wurzelpresssaft					
<b>Anfällig, beheizt</b>	138	63	257	390	139
<b>Resistent, beheizt</b>	2	0	43	0	0
<b>Anfällig, unbeheizt</b>	190	30	168	369	122
<b>Resistent, unbeheizt</b>	0	0	0,14	0	0





modifiziert nach *Harju et al., 2002; Ratti et al., 2004; Schirmer et al., 2005; Kutluk Yilmaz et al., 2007; Ward et al., 2007 und Koenig et al., 2008.*

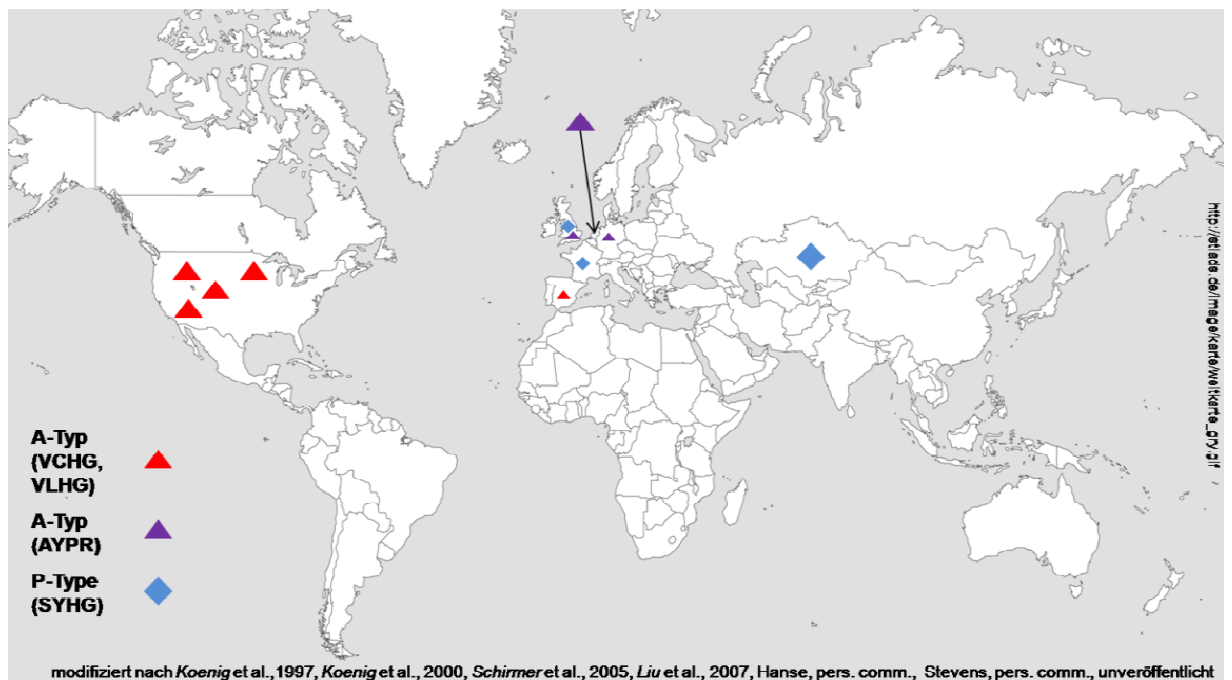
**Abb. 1:** Geografische Verbreitung von unterschiedlichen BNYVV-Typen in Europa.



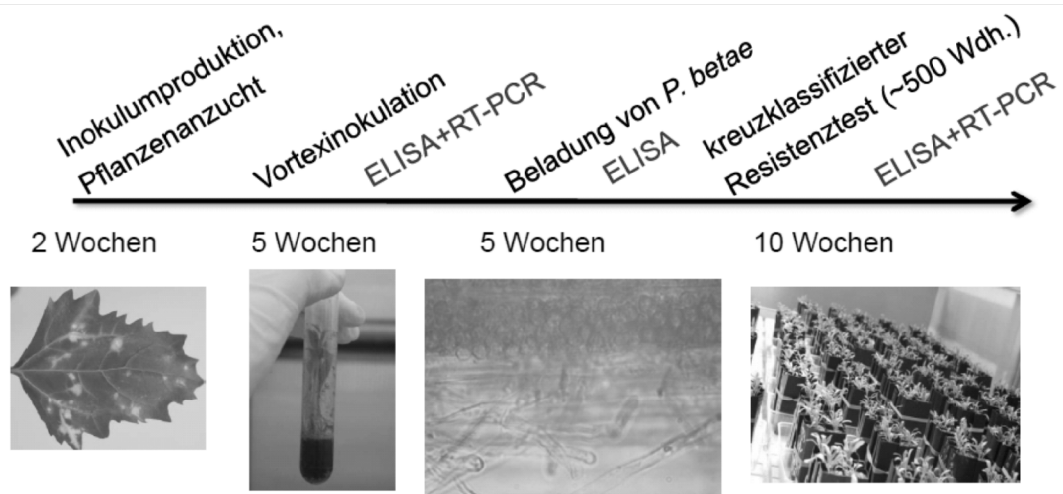
**Abb. 2:** Genomorganisation des *Beet necrotic yellow vein virus*, Expressions- und Translationsschema, CP: Coat Protein, RT: Readthrough Protein, TGB: Triple gene block.



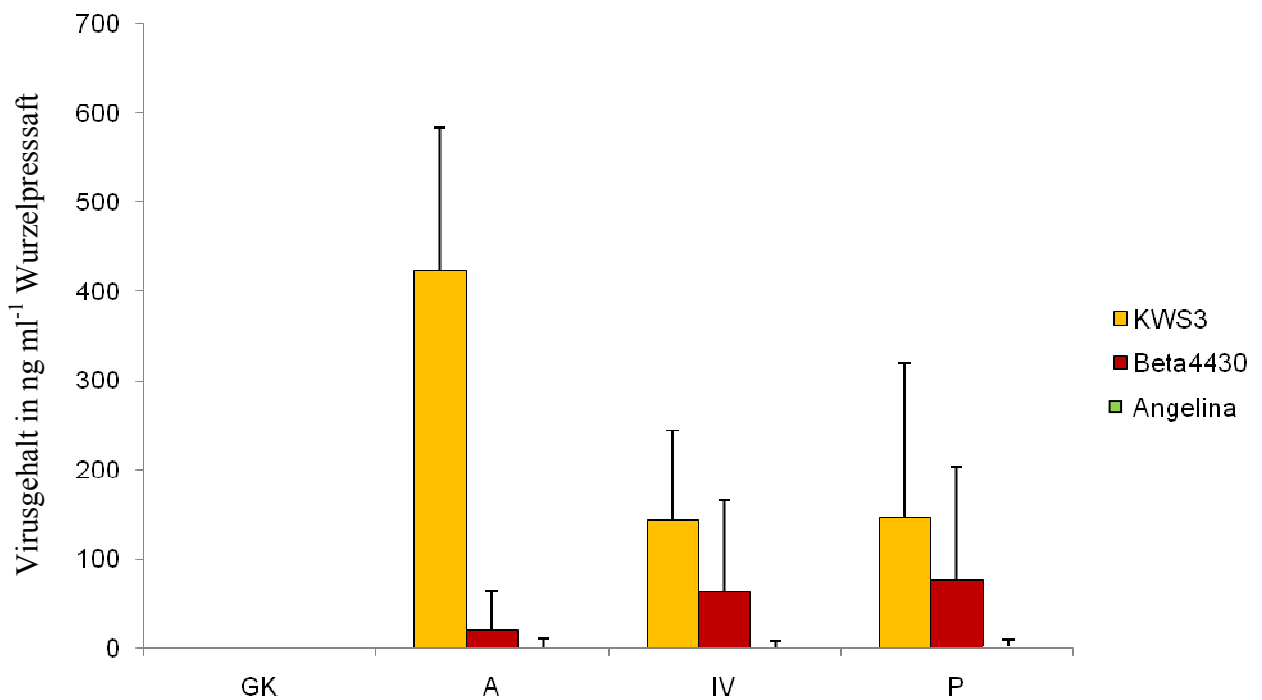
**Abb. 3:** P25 und seine funktionellen Domänen: Darstellung des P25-Proteins mit Lokalisationssignalen – Kernlokalisierungssignal (57-62) und Kernexportssignal (AS169-178) sowie Aminosäuretetrade (AS67-70).



**Abb. 4:** Verbreitung resistenzüberwindender BNYVV-Isolate weltweit. Das Auftreten der A-Typ Isolate (VCHG, VLHG) beschränkte sich bisher auf klimatisch wärmere Regionen, in denen bewässert wird (Spanien, USA). Erst seit einigen Jahren treten resistenzüberwindende A-Typ Isolate (AYPR) auch in Nordeuropa auf.



**Abb. 5:** Darstellung der Versuchsdurchführung einer künstlichen Beladung von *Polymyxa betae* mit BNYVV und anschließendem Resistenztest. Erläuterungen siehe Text.



**Abb. 6:** Absolute Virusgehalte in Seitenwurzeln anfälliger (KWS3), *Rz1*-resistenter (Beta4430) und *Rz1+Rz2*-resistenter (Angelina) Zuckerrüben-Genotypen nach zehn Wochen Kulturdauer in einem BNYVV-Boden, der mit unterschiedlichen Virus-Isolaten beladene *Polymyxa betae*-Zoosporen enthielt.



**Abb. 7:** Gefäßversuch mit anfälligen und resistenten Zuckerrüben-Genotypen zur Untersuchung der Resistenzstabilität bei unterschiedlichen Bodentemperaturen. Die linken zwei Gefäße werden über eine Bodenheizung beheizt, dabei entsteht eine Temperaturdifferenz zur unbeheizten Variante, die variabel eingestellt werden kann.

## 5. Manuskript 3

*will be submitted to Plant Pathology*

### **Occurrence of resistance-breaking strains of *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet in Northern Europe and the identification of a new variant of the viral pathogenicity factor P25**

K. Bornemann<sup>1</sup>, B. Hanse<sup>2</sup>, M. Varrelmann<sup>1</sup> and M. Stevens<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Sugar Beet Research, Holtenser Landstr.77, D-37079 Goettingen, Germany

<sup>2</sup>IRS, Postbus 32, 4600 AA Bergen op Zoom, NL

<sup>3</sup>Broom's Barn Experimental Station, Higham, Bury St Edmunds, Suffolk IP28 6NP, UK

\*Author for correspondence: phone: +44 (0) 1284 812 200, e-mail address: mark.stevens@rothamsted.ac.uk

Rhizomania, one of the most devastating diseases in sugar beet production, is caused by *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) and transmitted by *Polymyxa betae*. In the past, control of the disease was mainly possible by cultivation of sugar beet hybrids carrying a major resistance gene *Rz1* grown in all areas affected by the disease. These genotypes restrict virus accumulation in taproots and suppress symptom development. Since a few years, BNYVV strains with four RNA components occur which are able to overcome *Rz1*-mediated resistance. All strains described so far possess an A67V mutation in the hypervariable amino acid tetrad 67-70 of the RNA3-encoded P25 pathogenicity factor. Here BNYVV was isolated from *Rz1* plants collected in 71 fields in UK, NL and D, displaying patches of strong rhizomania symptoms. Sequencing of the coat protein and P25 gene of three representative isolates detected 100% homology on nucleotide level and detected AYPR as tetrad composition. The ability to accumulate to higher levels in young plants of *Rz1*- but not in *Rz1+Rz2* genotypes was initially demonstrated in greenhouse assays in natural field soil. One strain was loaded into a virus-free *P. betae* population and compared to reference strains in a resistance test. The AYPR strain retained its resistance-breaking ability in the *Rz1* genotypes and displayed replication at a higher rate compared to the *Rz1* resistance-breaking P type. The strain origin is unclear and it remains speculative, if the occurrence at different geographic locations is the result of independent selection or displacement of infested soil.

*keywords:* plant RNA virus, breeding for resistance, resistance durability, virus variability, selection pressure

## Introduction

Following its first record in Italy in 1952 (Canova, 1959), rhizomania, caused by *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) and transmitted by the plasmodiophoromycete *Polymyxa betae*, was spread during five decades to all sugar beet growing areas worldwide (summarized in McGrann *et al.*, 2009). Due to the severe crop damage, induced by the virus symptoms (Asher, 1993; Henry, 1996), this rapid spread has severely threatened sugar beet production. Identification of a major resistance gene *Rz1* (Lewellen *et al.*, 1987) and introduction into most of the varieties grown worldwide (Biancardi *et al.*, 2002) finally saved the crop. The underlying *Rz1*-resistance mechanism is unknown; plants display a phenotype of partial resistance with reduced virus replication in lateral roots, restricted movement and suppressed disease development (Scholten *et al.*, 1994; Scholten & Lange, 2000).

BNYVV, a multipartite single-stranded, positive-sense RNA virus, is the type member of the genus *Benyvirus*. Its genome structure has been reviewed elsewhere (Tamada, 1999; Peltier *et al.*, 2008; McGrann *et al.*, 2009). Whereas most of the genome does not show high variability and only RNA2 point mutations permit allocation to strain groups (A or B type) (Kruse *et al.*, 1994), the RNA3-encoded P25, mainly responsible for rhizomania symptom development and virus aggressiveness (Koenig *et al.*, 1991; Tamada *et al.*, 1999), shows high sequence variation, especially in a four amino acid stretch at positions 67-70 called the hypervariable tetrad.

Since aggressive forms of the disease re-emerged in *Rz1*-resistant genotypes in the United States and Europe (Liu *et al.*, 2005; Liu & Lewellen, 2007; Pferdmenges *et al.*, 2008), resistance durability is under debate. The ability of BNYVV A type strains with four RNA components to propagate to higher virus titers in *Rz1* plants is associated with a specific composition of the P25 tetrad. All strains described in the past possess A67V in P25 (Acosta-Leal *et al.*, 2010a; Pferdmenges *et al.*, 2008) and Koenig *et al.* (2009) showed

by means of reverse genetics that this amino acid exchange alone is responsible for the induction of *Rz1* resistance-breaking (RB) ability in an European A type strain. The selection of this resistance-breaking mutation by *Rz1* is quite probable, because another resistance source *Rz2* (Scholten *et al.*, 1999) in combination with *Rz1* is still effectively reducing replication of mutated strains (Liu *et al.*, 2005; Pferdenges *et al.*, 2008; Bornemann & Varrelmann, 2011), however, experimental evidence is still missing. Acosta-Leal *et al.* (2010b) detected increased P25 tetrad diversity in resistant sugar beet plants, indicative for virus adaptation to restrictive host conditions. Following loading of a virus-free soil-borne *P. betae* vector population, indication for reduced fitness of RB strains in susceptible genotypes, indicative for virulence costs of mutations was obtained (Bornemann & Varrelmann, 2011).

In contrast to previously identified RB A type strains with VLHG or VCHG P25 tetrad compositions, first in 2004 a BNYVV strain with an unusual P25 tetrad composition AYPR (A- RB) was isolated from field grown rhizomania resistant sugar beets displaying severe symptoms in the Netherlands (unpublished observation). Similar field observations were made in England in 2007 and P25 AYPR tetrad composition was observed in 26 field soil samples (M. Stevens, Broom's Barn Experimental Station, UK, personal communication). Schirmer (unpublished results) also identified an A (RB) strain, but without relating to *Rz1* RB (Peltier *et al.*, 2008).

A survey for rhizomania symptomatic sugar beets in two countries (NL and D) was performed to study the spread of this newly identified aggressive strain and to obtain information about epidemic and economic significance. Sugar beet reference genotypes (BNYVV susceptible, *Rz1* and *Rz1+Rz2*) were used in greenhouse resistance tests in three different environments to find evidence for RB abilities under controlled conditions. In order to prove that this strain, possessing a new P25 tetrad combination in addition to those previously described, and not other soil-borne factors are responsible for the observed RB effect, it was compared to reference strains in resistance tests followed by loading of a virus-free soil-borne vector population.



## **Materials and methods**

### **Sugar beet genotypes**

Three reference sugar beet genotypes with and without major BNYVV resistance genes *Rz1* and *Rz2*, applied in numerous previous studies, were used in this work (Liu *et al.*, 2005; Pferdmenges *et al.*, 2008; Pferdmenges & Varrelmann, 2008; Koenig *et al.*, 2009; Bornemann & Varrelmann, 2011): one *Rz1*-resistant genotype (*Rz1rz1*), one *Rz1+Rz2* genotype, which carries the two major resistance genes *Rz1* and *Rz2* (*Rz1+Rz2rz2*), and a susceptible genotype (*rz1rz1*). The different genotypes were used both in field test and greenhouse assay.

### **Field trials**

At two field sites in the Netherlands and Germany where patches with rhizomania symptoms were observed in 2010, a field trial was conducted to monitor symptom development and expression during the growing season in 2011. In order to compare the resistance stability under natural growth conditions, the same sugar beet genotypes were used as in the experiments described below. Some plants of each genotype were harvested every five weeks to compare symptom development (data not shown).

### **Rhizomania infested soil samples and virus isolation**

Soil samples were taken from patches with BNYVV resistant sugar beet plants displaying severe rhizomania symptoms from two different field locations in the Netherlands and Germany, respectively. Samples were homogenized and an aliquot was used for BNYVV baiting by growth of susceptible sugar beet plants in pots for four weeks. Lateral roots were harvested and used for mechanical inoculation of *Chenopodium quinoa* leaves to generate BNYVV local lesions for *P. betae* loading experiments and preparation of total RNA for RT-PCR and sequencing.

### **BNYVV identification and sequencing**

To allocate the BNYVV strain to a strain group and identify the P25 tetrad composition, the coding sequences of the coat protein (CP) gene (RNA2) and P25 gene (RNA3) of two

isolates from the Netherlands and Germany, respectively, were amplified and sequenced. An additional isolate from the UK (kindly provided by M. Stevens) was also included in the sequence analysis. In detail, total RNA was extracted from 100mg of infected lateral roots using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). A Reverse Transcriptase (RT)-PCR was performed with P25 open reading frame (ORF) specific primers BN333-low (5'-GTCCCAACCAGATCAACAA-3') and BN34-up (5'-TCGGAATATCCAAGGTTTAAAAG-3') amplifying nt 302–1207 of BNYVV RNA3 (Genebank Acc. No. M36894). The absence of a fifth RNA was assayed by amplification of the P26 ORF using P26 specific primers (nucleotides 447 to 1103 of GenBank accession number U78293). RNA2 CP primers CP-for-111 (5'-AAGTAGCCGCGTCCAGAAG-3') and CP-rev-747 (5'-TCGAATGTGTGCCGTCACCC-3') were used to amplify a CP gene containing part of RNA2 (nucleotides 111-747 of GenBank accession number X04197). RT-PCR chemicals and conditions were the same as described in Pferdmenges *et al.* (2008). For the RNA2 CP RT-PCR the following PCR program was conducted: 96°C for 2 min, 36 cycles of 96°C for 45 s, 52°C for 1 min and 72°C for 1 min and final synthesis for 10 min 72°C. To visualize BNYVV PCR products, agarose gel electrophoresis was performed. PCR samples were purified with SureClean (Bioline Ltd.) and sequenced by a commercial company (MWG Eurofins Operon) with specific primers.

### **Sequence alignment**

Sequences were analyzed using the Vector NTI (Invitrogen) and Chromas Lite ([http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)) software packages. Sequence alignment was performed with the EditSeq and MegAlign software (DNASTAR).

### **Greenhouse resistance test**

To compare the RB ability of the new strains possessing deviating P25 tetrad composition with reference strains of known aggressiveness, at first a greenhouse test with young sugar beet plants of three reference genotypes (see above) with field soil samples was performed in both countries. One field soil sample harboring a BNYVV strain with AYPR tetrad composition was compared in each country to two reference soils (same in both countries) and one healthy sterilized soil. As a non-resistance-breaking (WT) reference, a BNYVV B

type soil from Southern Germany (kindly provided by Syngenta Seeds) was applied. A soil from the area around Pithiviers (France) containing a BNYVV strain with five RNA components and well known to possess *Rz1* RB abilities (Pferdmenges *et al.*, 2008) was used as a further control.

Plants of the three genotypes were sown in sterile quartz sand and after twelve days transplanted into the field soil. Damping-off diseases were controlled by a one-time spraying with the fungicide Tachigaren 70 WP (Sumitomo) at 90g per 100,000 plants. The plants were grown in 700ml plastic pots for six or ten weeks, depending on the greenhouse protocol. The number of replications consisted of 20 pots per treatment with seven plants each pot. Temperatures (day/night) were between 23 and 24°C/16 and 18°C with 16h of additional light. To analyze the virus titer of one single pot, lateral roots were harvested, washed out gently under running tap water, air dried and stored at -80°C until further processing.

### **Loading of a virus-free *Polymyxa betae* population**

Four different BNYVV strains were used for loading a virus-free *P. betae* population. A WT A type strain (referred to as A- WT) was derived from Italy. A second WT B type strain (referred to as B- WT) was derived from Southern Germany. The RB P type strain (referred to as P- RB) was obtained from a soil sample collected in the Pithiviers region, France. Representative for the new A type strain with AYPR tetrad composition, one strain from the Netherlands, was applied (referred to as A- RB). The protocol including the preparation of inoculum, *Polymyxa*-infested virus-free field soil, mechanical inoculation and greenhouse resistance test was exactly conducted as described in Bornemann & Varrelmann (2011).

### **BNYVV quantification in lateral sugar beet roots**

Virus titer in lateral roots was determined by means of Enzyme Linked Immunosorbent Essay (ELISA) (Clark & Adams, 1977) following the protocol described in Bornemann & Varrelmann, 2011.

### **Data analysis**

Statistical analysis was carried out using SAS version 9.1 (SAS Institute). The data regarding BNYVV titer displayed a lack of homogeneity of variance; therefore, non-parametric analysis was performed to evaluate the data properly (Brunner & Munzel, 2002; Shah & Madden, 2004). Data analysis was performed the same way as described in Bornemann & Varrelmann (2011). To assign letters for multiple comparisons, the SAS macro MULT (<https://www.uni-hohenheim.de/bioinformatik/beratung/toolsmacros/sasmacros/mult.sas>) was used. For the relative effects (RE) of the single experimental units (one pot), estimated relative treatment effects with appropriate confidence limits were calculated with the SAS macro LD\_CI ([http://www.ams.med.uni-goettingen.de/de/sof/ld/LD\\_CI.SAS](http://www.ams.med.uni-goettingen.de/de/sof/ld/LD_CI.SAS)).

### **Results**

#### **Observation of typical rhizomania symptoms in the field in *Rz1*-resistant sugar beet during the growing season**

On both locations BNYVV-infected susceptible (*rz1*) and resistant (*Rz1*) genotypes showed typical symptoms like wineglass-shaped roots with a root beard. Leaves turned yellow in several patches over the field. Plants of the double-resistant genotype (*Rz1+Rz2*) did not show any symptoms (data not shown).

#### **Greenhouse resistance tests with different sugar beet genotypes demonstrate *Rz1* RB abilities of soil samples containing BNYVV A type (RB) strains**

BNYVV symptoms were observed in a number of fields in the Netherlands and one field in Northern Germany in the past years. *Rz1*-resistant sugar beet showed massive lateral root proliferation and yellowing of the foliage, which gave a first hint of RB. Therefore, a resistance test with three different BNYVV sugar beet genotypes was performed in greenhouses at two different locations in the Netherlands (Instituut voor Rationele Suikerproductie- IRS) and Germany (Institut für Zuckerrübenforschung - IfZ) in order to demonstrate RB abilities of soil samples infected with a new BNYVV strain under

controlled conditions. To determine the virus titer in lateral roots, comparable ELISA procedures using the same antiserum were conducted after harvest. BNYVV B and P type infested soils (WT and *Rz1* RB, respectively) served as reference. Soil samples infested with BNYVV A (RB) were collected from the fields where typical symptoms had occurred during the growing season. Reference soils were included in both experimental setups, because absolute viral replication rates often show high variability depending on the environmental conditions during the test (unpublished observations). Plants were harvested after six weeks to determine the virus titer in lateral roots. Due to expected effects of the test location ELISA values of the resistance tests were analyzed separately.

Infection rates were calculated between 90 and 100% of the plants of the *Rz1* resistant and susceptible genotypes in all variants. The *Rz1+Rz2*-resistant genotype was infected by the P type by 75% (IRS) and 95% (IfZ), whereas the other variants resulted in lower infection rates (10-50%) (data not shown). Expectedly, root samples of the susceptible (*rz1*) genotype displayed ELISA values at a very high level, ranging between 2.43 and 2.57 for the IRS results and 1.58 and 1.92 for the IfZ results, induced by all virus strains except the healthy control, which was not infected (Table 1). Under both test conditions RB strains (P and A (RB) from both countries) replicated to high levels in lateral roots of the resistant (*Rz1*) genotype, comparable to susceptible plants. In contrast, absorption values induced by the B type were two to three times lower in *Rz1* than in susceptible plants. Lateral roots of the double-resistant genotype (*Rz1+Rz2*) did not show detectable infection by the B type (WT) and the German A type (RB), but infection was detectable (even at low levels) by the Dutch A type (RB). ELISA values induced by the P type in *Rz1+Rz2* plants ranged between 0.37 and 0.58, respectively, four to five times lower compared to the values in the other two genotypes. The B type was not able to replicate to significant levels in the double resistant plants.

### **Sequence analysis**

For type identification and to find evidence for a relation between the A type (RB) strains of different geographic regions, representative root samples of the newly identified strains from UK, NL and D were used for preparation of total RNA and RT-PCR amplification of CP (RNA2), P25 (RNA3) and P26 (RNA5) and sequencing. All three strains contained P25

with amino acid (aa) AYPR tetrad composition and no additional RNA5 was detected in any of the strains. The P25 sequence electropherogram did not show double peaks in the coding sequence, giving no indication for intra-isolate variability or mixed infections. P25 as well as partial CP sequence alignment on nucleotide level did not detect any polymorphism between strains from the three countries (data not shown). CP gene NCBI Blast search on nucleotide level as well as analysis of CP amino acids 62, 103 and 172 (Kruse *et al.*, 1994; Koenig *et al.*, 1995) classified the AYPR strains to the A type strain group.

**BNYVV A type with P25 AYPR tetrad retains its ability to overcome *Rz1* resistance when loaded into a virus-free soil-borne *P. betae* vector population**

An influence of other soil-borne pathogens on the aggressiveness of BNYVV cannot be excluded. Therefore evidence should be obtained if BNYVV A type (RB) retains its *Rz1* RB ability after being loaded into a virus-free soil-borne *P. betae* population, followed by a resistance test with reference sugar beet genotypes as described by Bornemann & Varrelmann (2011). The Dutch strain was chosen for this purpose, because it had accumulated to higher levels in *Rz1* plants and displayed clear RB abilities in the resistance test in natural soil (see above). First, 12-day-old sugar beet plants (*rz1*) were mechanically inoculated with four different isolates. In order to compare the RB abilities of the newly identified BNYVV A type (RB) strain with other RB strains, the same P type strain as in the resistance test described above was chosen. Additionally, two WT strains from Italy (A type) and Germany (B type) were included in the experiment as reference. Plantlets were transplanted into sterile soil and cultivated for five weeks. A small amount of lateral roots was removed for detection of BNYVV by means of quantitative ELISA (data not shown). Mechanical inoculation proved to be highly effective, leading to infection rates between 96 and 100% (Table 2). Infected plants were then transplanted into a virus-free, but *P. betae*-containing field soil. Again plants were harvested after additional five weeks of cultivation to determine the virus titer in lateral roots (data not shown). The proportion of infected plants ranged between 92 and 100% (Table 2). Subsequently, the soil was used for a resistance test with the same sugar beet genotypes used in the above-described resistance assay. As expected, susceptible plants of all variants showed an infection rate between

91.7% (A- RB) and 97.2% (B- WT), respectively, and 100% (A- WT and P- RB), whereas *Rz1*-resistant plants in reference soils showed 0% for the A (WT) type and 22.2% for the B (WT) type, respectively. The proportion of virus-infected plants was 100% for the P- RB as well as A- RB type. The double-resistant genotype (*Rz1+Rz2*) showed less infection rates compared to susceptible and resistant genotype. The WT strains produced infection rates of only 5.5% (A- WT) and 2.7% (B- WT). RB strains were able to infect double-resistant plants at a higher rate (A- RB: 16.7% and P- RB: 36.1%). After ten weeks, plants were harvested and virus titer in lateral roots was determined (Table 3). High virus titers were detected in susceptible plants of all variants. The WT showed less (B:  $A_{405nm}$  of 0.218) or no infection (A: 0.123). The RB strains also showed high absorption values in *Rz1*-resistant plants [reference P type (RB): 1.045; A (RB) 1.557].

The mean ELISA absorption values for BNYVV in the lateral roots of *rz1*, *Rz1*, and *Rz1+Rz2* plants are shown in Table 3. Although all strains gave a mean  $A_{405nm}$  of 0.7 to 1.7 in *rz1* plants, independent of their ability to overcome resistance, only the A- RB and P- RB type strains resulted in elevated absorption values in *Rz1*-resistant plants. In the *Rz1+Rz2* plants, only the RB strains were able to produce ELISA values that were higher than those of the healthy controls. We observed a relatively high mean standard deviation (SD), probably caused by the nonhomogeneous distribution of virus in the lateral roots. The ability of the BNYVV strains to produce an elevated concentration of virus in resistant plants was evaluated by using the ELISA values displayed in Table 3 for calculation of virus titer, as represented by ng coat protein per milliliter ground root tissue. Representative values for the variation in virus titer, minimum, median, and maximum of medians were calculated (Table 3). For any of the sugar beet genotypes BNYVV infection was detectable in the roots of the healthy controls. In the small rootlets of *rz1* plants, highest virus concentrations were detected. The A type RB strain with AYPR tetrad produced the highest (4.6 to 256.2 ng/ml ground root tissue) and the A type (WT) the lowest variation in virus titer (285 to 515.8 ng/ml). Remarkably, the BNYVV A type strain (RB) produced a median virus titer that was nearly six times higher than the median titer produced by the A type (WT). In *Rz1* plants, a contrasting situation was detected. The A and B type strain (WT) were both unable to replicate to detectable levels in *Rz1* plants. In contrast to the A type (WT) infected *Rz1* plants, the virus titer of the plants infected with the BNYVV A- RB and

P type strain showed much greater variation, with maximum median values (465.31 and 104.2 ng/ml, respectively) that almost reached those obtained for both strains in susceptible plants (396.8 and 174.54 ng/ml, respectively). The median virus titer produced by the A-RB strain was more than five times higher than in the plants infected with the P type. In addition to the very low percentage of infected *Rz1+Rz2* plants that reached the ELISA threshold in most variants (Table 3), rootlets of the *Rz1+Rz2* plants displayed very low ELISA values, meaning that no BNYVV could be detected, except for P- RB and A- RB.

The absolute virus concentrations obtained were subjected to statistical analysis to confirm the observed variation depending on the plant genotype and BNYVV strain. The ANOVA-type statistical analysis showed that viral strain, plant genotype, and viral strain  $\times$  plant genotype significantly affected ( $***P < 0.001$ ) the concentration of the virus in lateral roots (data not shown). To obtain the source of the effects for twofold interaction, the effects were sliced for sugar beet genotype and viral strain, (Table 4). When the viral strain was kept constant, the three different sugar beet genotypes, significantly affected the virus titer, except in the healthy control. When the genotype was kept constant, a significant influence of the viral strain on virus titer was observed for all sugar beet genotypes.

The lack of homogeneity of variance made the calculation of REs of virus titer median values necessary (Fig. 1). The RE values of the RB strains differed by significance level of two (A- RB) or three (P- RB) over all genotypes, respectively, when compared to the WT strains A type and B type. In *Rz1*-resistant plants, REs that were induced by the A- WT strain were significantly lower (three levels of significance) than those in susceptible plants. For the B type (WT), the level of significance differed by two when *Rz1*-resistant and susceptible plants were compared. In contrast, these RE values were not significantly different from each other when P type infections in *Rz1* versus *rz1* genotype were evaluated, and showed no difference in case of the A- RB strain. The RB A and P type strains showed one to three times higher levels of significance when compared to A and B WT. Compared to the WT strains, both *Rz1* RB strains (P and A type) induced higher relative virus concentrations in double-resistant plants (*Rz1+Rz2*). The influence of possible soil-borne factors was excluded by using one vector population in the experiment. Although the virus titer in susceptible plants differed by a factor of four to five between the reference and RB strains (Table 3), the high variability of the absolute virus titer prevented



the detection of significant differences, except between the A- RB and A- WT types. Although the absolute BNYVV titer in susceptible *rz1* plants was approximately four to five times higher in the A type (RB) infected than in the A (WT) and B (WT) type infected plants (Table 3), these differences were only statistically significant between REs that were induced by the A (RB) type and A (WT) type strains, respectively (Fig. 1). Similar relationships were observed when the REs of viral strains were compared in *Rz1* plants. Only the A- RB and P- RB type induced significantly higher virus titer in *Rz1*-resistant plants than BNYVV A (WT) or B (WT) type.

### Discussion

Severe BNYVV symptoms were observed in the Netherlands, the UK (M. Stevens, Broom's Barn Experimental Station, UK, personal communication) and Germany in different fields with sugar beet genotype carrying *Rz1*. Preliminary P25 sequence analysis detected an unusual tetrad composition without the typical valine aa position 67 (unpublished observations), but exchanges at aa position 69-70, leading to AYPR tetrad composition which was already described previously (Peltier *et al.*, 2008), but not put into the context of RB. A first resistance test under standardized greenhouse conditions with soil samples and well-characterized sugar beet reference genotypes showed that the *Rz1*-resistant genotype was highly infected by the new strains comparable to the susceptible one, whereas the combination of *Rz1+Rz2* was still effectively reducing virus replication. The level of infection was similar to the P type soil, used as a RB reference and independent of A- RB strain origin. As expected, the environmental conditions at the different test locations, as well as the slightly different ELISA procedures, influenced the absolute BNYVV accumulation measured. The relative differences of strain accumulation in dependence of the plant genotype, however, were consistent between the test locations. The assumption of RB was supported by the fact that the B type WT strain did not accumulate to comparable levels in *Rz1* plants in both test environments. Growth of the same reference genotypes in the field as well resulted in development of rhizomania

symptoms in *Rz1* plants and further supported the suggestion that a new RB strain had been identified.

As it was demonstrated previously that RB BNYVV strains shall retain their high aggressiveness, even when loaded into another soil-borne vector population (Bornemann & Varrelmann, 2011), the Dutch A- RB strain was applied for this assay together with appropriate reference strains. Infection rate, virus titer and RE data consistently demonstrated the *Rz1* RB abilities comparable to the RNA5 containing P type strain.

As the analyzed genome parts did not show any polymorphism between the A- RB strains independent of the geographic origin, it can be assumed that all strains with this unusual tetrad composition possess the ability to overcome the *Rz1* resistance mechanism and can induce elevated virus titers.

The genotype specific accumulating ability of the A- RB strain, in the resistance assays described here, suggests its selection by *Rz1*. It remains unexplained, however, why mutations at different positions can be the result of the selection pressure applied by one major dominant plant resistance factor. The evaluation of the RE of the BNYVV strain accumulation in susceptible plants indicates that the A- RB strain accumulates to higher levels than the A type strain with WT properties. This finding is in contrast to our previous study (Bornemann & Varrelmann, 2011), where lower replication rates of RB strains in susceptible plants, indicative for virulence costs of RB mutations, were detected. As direct comparison of VCHG with AYPR aggressiveness was not performed in the current study, it can only be speculated that this unusual composition might not be associated with a loss of relative fitness.

It was anticipated that wide-spread growth of sugar beet genotypes with *Rz1* resistance has selected strains with a modified P25 pathogenicity factor, although experimental evidence is still missing. Up to this present finding, only A type strains with four RNAs and P25 VLHG or VCHG tetrad were able to overcome *Rz1* and A67V exchange was shown to be responsible for the effect (Koenig *et al.*, 2009). Sequence analysis of several BNYVV strains (Schirmer *et al.*, 2005; Peltier *et al.*, 2008; Chiba *et al.*, 2011) showed that A type P25 displays much higher tetrad variability than the B type. Although all experimental evidence obtained so far only relates A67V to RB, aa68 displays the highest variability among all A type P25 sequences known so far. In the AYPR tetrad, aa67 is not indicative

for RB abilities. Tyrosine at aa68 was previously found in P25 of B type isolates and similarly was not associated with RB as well as arginine at aa70, which was found in numerous WT isolates. Only proline at aa69 was detected here for the first time and therefore seems to be a plausible candidate for the critical mutation. However, experimental evidence by means of reverse genetics is missing. As histidine is the most frequent amino acid found in A type strains, an exchange to proline changes a polar, hydrophilic to a small, hydrophobic side group. An exchange of alanine to valine at aa 67 implies only slight chemical changes as both aas have hydrophobic side-chains; the valine side-chain has aliphatic properties. The only tetrad composition known so far which shows an arginine at the last tetrad position is BNYVV A type AFHR (Peltier *et al.*, 2008).

The tetrad composition of the parent of A- RB strains with WT properties is unknown. Anticipating the tetrad ACHG being the parental as it was detected in Italian A type strains, where BNYVV originated in Europe, only one point mutation in the codon is required for A67V mutation, whereas a total of three nucleotide exchanges in codon 68-70 are necessary to convert ACHG to AYPR. In principal, the probability for three nucleotide replacements to occur is much lower than for a single mutation. The finding of both events in nature is somewhat in contrast to the current theories for prediction of resistance durability. Harrison (2002) and Janzac *et al.* (2009) suggested that resistance durability might be either in part a consequence of the number of mutations in the virus genome required for shifts in virulence and a function of the selective constraints applied on the corresponding avirulence factor. Competition experiments of BNYVV strains with different RB abilities need to be performed to ascertain whether AYPR tetrad mutations are connected with lower fitness costs compared to VCHG. Finally, the identification of RB BNYVV with AYPR tetrad in three different countries raises the question if they were the result of independent selection or spread of one strain by the migration routes well known for rhizomania-like spore spread with wind and water or soil adhering to plant material (Tamada, 1999).

It can be summarized that the variability of the P25 pathogenicity factor allows BNYVV to overcome *Rz1* resistance which again poses a threat to sugar production. This depends on the spread of these strains to outcompete the WT ones in rhizomania-infected soils and on the sugar beet genotypes grown as it is not expected that RB strains can colonize areas that to date are healthy. Other resistance sources like *Rz2* and *Rz3* are known (Biancardi *et al.*,

2002; Gidner *et al.*, 2005) and useful to save the crop but to date, due to yield penalty, only the combination of *Rz1+Rz2* is used in a few genotypes. The *Rz1* specific RB suggests that the *Rz2* mode of action is somewhat different. If the *Rz2* resistance targets another viral avirulence gene or exerts effects on P25, additive to *Rz1*, is unknown. As this study has shown that both RB strains infect a higher percentage of double-resistant plants compared to the WT strains and accumulate to higher ELISA absorption values, it is suggested that as well *Rz2* durability will be finite. Only extensive monitoring and population analysis of the P25 variability (i.e. by means of deep sequencing) will detect RB variants before they are able to spread widely in the WT population. Efforts to identify the *Rz2* target as well as its mode of action are essential to be able to monitor the viral population when *Rz1+Rz2* combinations are grown on a large scale.

## Acknowledgements

We thank the staff of IRS and IfZ for excellent technical assistance. The project was conducted within COBRI (Coordination Beet Research International). We would also like to thank KWS for providing us with sugar beet seeds and Syngenta Seeds for collecting BNYVV-infested soil.

## References

1. Acosta-Leal R, Bryan KB, Smith JT, Rush CM, 2010a. Breakdown of host resistance by independent evolutionary lineages of *Beet necrotic yellow vein virus* involves a parallel C/U mutation in its p25 gene. *Phytopathology* **100**, 127–133.
2. Acosta-Leal R, Bryan BK, Rush CM, 2010b. Host effect on the genetic diversification of *Beet necrotic yellow vein virus* single-plant populations. *Phytopathology* **100**, 1204–1212.
3. Asher MJC, 1993. Rhizomania. In: Cook DA, Scott RK (Eds.). *The Sugar Beet Crop*. London, UK: Chapman & Hall/CRC Press.

4. Biancardi E, Lewellen RT, de Biaggi M, Erichsen AW, Stevanato P, 2002. The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica* **127**, 383–397.
5. Brunner E, Munzel U, 2002. *Nichtparametrische Datenanalysen*. Berlin, D: Springer.
6. Bornemann K, Varrelmann M, 2011. Analysis of the resistance-breaking ability of different *Beet necrotic yellow vein virus* isolates loaded into a single *Polymyxa betae* population in soil. *Phytopathology* **101**, 718–724.
7. Canova A, 1959. Appunti di patologia della barbabietola. *Informatore Fitopatologia* **20**, 390–396.
8. Chiba S, Kondo H, Miyanishi M, Andika IB, Han C, Tamada T, 2011. The evolutionary history of *Beet necrotic yellow vein virus* deduced from genetic variation, geographical origin and spread, and the breaking of host resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 207–218.
9. Clark MF, Adams AN, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**, 475–483.
10. Gidner S, Lennefors BL, Nilsson NO, Bensefelt J, Johansson E, Gyllenspetz U, Kraft T, 2005. QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. *Genome* **48**, 279–285.
11. Harrison BD, 2002. Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica* **124**, 181–192.
12. Henry C, 1996. Rhizomania- its effect on sugar-beet yield in the UK. *British Sugar Beet Review* **64**, 24–26.
13. Janzac B, Fabre F, Palloix A, Moury B, 2009. Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. *Molecular Plant Pathology* **10**, 599–610.
14. Koenig R, Jarausch W, Li Y, Commandeur U, Burgermeister W, Gehrke M, Lüddecke P, 1991. Effect of recombinant *Beet necrotic yellow vein virus* with different RNA compositions on mechanically inoculated sugarbeets. *Journal of General Virology* **72**, 2243–2246.

15. Koenig R, Lüddecke P, Haeberlé AM, 1995. Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-stranded conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *Journal of General Virology* **76**, 2051–2055.
16. Koenig R, Kastirr U, Holtschulte B, Deml G, Varrelmann M, 2008. Distribution of various types and P25 subtypes of *Beet necrotic yellow vein virus* in Germany and other European countries. *Archives of Virology* **153**, 2139–2144.
17. Koenig R, Loss S, Specht J, Varrelmann M, Lüddecke P, Deml G, 2009. A single U/C nucleotide substitution changing alanine to valine in the *Beet necrotic yellow vein virus* P25 protein promotes increased virus accumulation in roots of mechanically inoculated, partially resistant sugar beet seedlings. *Journal of General Virology* **90**, 759–763.
18. Kruse M, Koenig R, Hoffmann A, Kaufmann A, Commandeur U, Solovyev AG, Savenkov I, Burgermeister W, 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of beet necrotic yellow vein virus. *Journal of General Virology* **75**, 1835–1842.
19. Lewellen RT, Skoyen IO, Erichsen AW, 1987. Breeding sugar beet for resistance to rhizomania: evaluation of host–plant reactions and selection for and inheritance of resistance. *Proceedings of the IIRB 50<sup>th</sup> Winter Congress, Belgium*, 139–156.
20. Liu HY, Sears JL, Lewellen RT, 2005. Occurrence of resistance-breaking *Beet necrotic yellow vein virus* of sugar beet. *Plant Disease* **89**, 464–468.
21. Liu HY, Lewellen RT, 2007. Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* in the United States. *Plant Disease* **91**, 847–851.
22. McGrann GRD, Grimmer MK, Mutasa-Göttgens ES, Stevens M, 2009. Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. *Molecular Plant Pathology* **10**, 129–141.
23. Peltier C, Hleibieh K, Thiel H, Klein E, Bragard C, Gilmer D, 2008. Molecular biology of the *Beet necrotic yellow vein virus*. *Plant Viruses* **2**, 14–24.

24. Pferdmenges F, Korf H, Varrelmann M, 2008. Identification of rhizomania-infected soil in Europe able to overcome *Rz1* resistance in sugar beet and comparison with other resistance-breaking soils from different geographic origins. *European Journal of Plant Pathology* **124**, 31–43.
25. Pferdmenges F, Varrelmann M, 2008. Breaking of *Beet necrotic yellow vein virus* resistance in sugar beet is independent of virus and vector inoculum densities. *European Journal of Plant Pathology* **124**, 231–245.
26. Schirmer A, Link D, Cognat V, Moury B, Beuve M, Meunier A, Bragard C, Gilmer D, Lemaire O, 2005. Phylogenetic analysis of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* collected worldwide. *Journal of General Virology* **86**, 2897–2911.
27. Scholten OE, Paul D, van Lent JWM, Goldbach RW, 1994. In situ localization of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in rootlets of susceptible and resistant beet plants. *Archives of Virology* **136**, 349–361.
28. Scholten OE, de Bock TSM, Klein-Lankhorst RM, Lange W, 1999. Inheritance of resistance to Beet necrotic yellow vein virus in *Beta vulgaris*, conferred by a second gene for resistance. *Theoretical Applied Genetics* **99**, 740–746.
29. Scholten OE, Lange W, 2000. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: a review. *Euphytica* **112**, 219–231.
30. Shah DA, Madden LV, 2004. Nonparametric analysis of ordinal data in designed factorial experiments. *Phytopathology* **94**, 33–43.
31. Tamada T, Uchino H, Kusume T, Saito M, 1999. RNA 3 deletion mutants of beet necrotic yellow vein virus do not cause rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology* **89**, 1000–1006.
32. Tamada T, 1999. Benyviruses. In: Webster R, Granoff A (Eds.). *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn. New York, NY, USA: Academic Press.

**Table 1** Mean BNYVV ELISA absorption values measured in small rootlets of sugar beet genotypes grown in the greenhouse resistance test at two different locations. The results of the different test locations (IfZ and IRS) are displayed separately

greenhouse location	BNYVV strain	Sugar beet genotype	Number of replications	Mean absorption (405nm)	MSD <sup>b</sup>
Germany (IfZ)	A (RB) - D	<i>rz1rz1</i>	20 <sup>a</sup>	1.58	0.44
	A (RB) - D	<i>Rz1rz1</i>	20	1.03	0.42
	A (RB) - D	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	20	0.14	0.13
	B (WT)	<i>rz1rz1</i>	20	1.92	0.30
	B (WT)	<i>Rz1rz1</i>	20	0.77	0.45
	B (WT)	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	20	0.06	0.17
	P (RB)	<i>rz1rz1</i>	20	1.68	0.72
	P (RB)	<i>Rz1rz1</i>	20	1.84	0.64
	P (RB)	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	20	0.37	0.37
	h.c.	<i>rz1rz1</i>	20	0.12	0.04
	h.c.	<i>Rz1rz1</i>	20	0.11	0.00
	h.c.	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	20	0.11	0.01
	Netherlands (IRS)	A (RB) - NL	<i>rz1rz1</i>	20	2.57
A (RB) - NL		<i>Rz1rz1</i>	20	2.45	0.19
A (RB) - NL		<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	20	0.26	0.59
B (WT)		<i>rz1rz1</i>	20	2.52	0.27
B (WT)		<i>Rz1rz1</i>	20	0.76	0.81
B (WT)		<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	20	0.05	0.06
P (RB)		<i>rz1rz1</i>	20	2.43	0.19
P (RB)		<i>Rz1rz1</i>	20	2.21	0.19
P (RB)		<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	20	0.58	0.39
h.c.		<i>rz1rz1</i>	20	0.01	0.01
h.c.		<i>Rz1rz1</i>	20	0.01	0.00
h.c.		<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	20	0.01	0.00

<sup>a</sup>Mixed sample obtained from seven plants per pot.

<sup>b</sup>MSD: mean standard deviation of absorption.

WT: BNYVV wild type.

RB: resistance-breaking BNYVV type.

h.c.: healthy control.



**Table 2** Number of infected plants after mechanical inoculation, *P. betae* loading, and the resistance test

BNYVV strain	Sugar beet genotype	Mechanical inoculation	Vector loading	Resistance test
		% infected plants <sup>a</sup>	% infected plants <sup>a</sup>	% infected plants <sup>b</sup>
A (WT)	<i>rz1rz1</i>	100	100	100
A (WT)	<i>Rz1rz1</i>	n.a.	n.a.	0
A (WT)	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	n.a.	n.a.	5·5
A (RB)	<i>rz1rz1</i>	96	92	91·7
A (RB)	<i>Rz1rz1</i>	n.a.	n.a.	100
A (RB)	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	n.a.	n.a.	16·7
B (WT)	<i>rz1rz1</i>	100	100	97·2
B (WT)	<i>Rz1rz1</i>	n.a.	n.a.	22·2
B (WT)	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	n.a.	n.a.	2·7
P (RB)	<i>rz1rz1</i>	100	100	100
P (RB)	<i>Rz1rz1</i>	n.a.	n.a.	100
P (RB)	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	n.a.	n.a.	36·1

<sup>a</sup> Mixed sample obtained from seven plants per pot.

<sup>b</sup> Mixed sample obtained from four plants per pot.

n.a.: not applicable.

5. Manuskript 3

**Table 3** Mean BNYVV ELISA absorption values measured in the small rootlets of sugar beet genotypes grown in the resistance test, and measured total virus titer for all replications per treatment

BNYVV strain	Sugar beet genotype	Mean absorption (405nm)	MSD <sup>c</sup>	No. of replications	Virus titer <sup>b</sup>		
					Max. of medians	Median of medians	Min. of medians
h.c.	<i>rz1rz1</i>	0.109	0.00	36	0	0	0
h.c.	<i>Rz1rz1</i>	0.111	0.00	36	0	0	0
h.c. <sup>a</sup>	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	0.117	0.01	36	0	0	0
A (WT)	<i>rz1rz1</i>	0.744	0.31	36	113.81	68.07	16.20
A (WT)	<i>Rz1rz1</i>	0.123	0.03	36	0	0	0
A (WT)	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	0.127	0.05	36	0	0	0
A (RB)	<i>rz1rz1</i>	1.432	0.56	36	486.19	396.75	4.56
A (RB)	<i>Rz1rz1</i>	1.557	0.51	36	465.31	335.08	226
A (RB)	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	0.207	0.15	36	0	0	0
B (WT)	<i>rz1rz1</i>	1.048	0.45	36	182.98	97.82	66.58
B (WT)	<i>Rz1rz1</i>	0.218	0.20	36	0.01	0	0
B (WT)	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	0.124	0.04	36	0	0	0
P (RB)	<i>rz1rz1</i>	1.681	0.39	36	238.57	174.54	124.49
P (RB)	<i>Rz1rz1</i>	1.045	0.52	36	104.20	62.04	26.06
P (RB)	<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	0.314	0.31	36	8.38	0	0

<sup>a</sup>h.c.: healthy control.

<sup>b</sup>Absolute virus titer in small rootlets in ng/ml ground root tissue.

<sup>c</sup>MSD: mean standard deviation of absorption.

**Table 4** ANOVA type statistics (ATS) for BNYVV titer in small rootlets of sugar beet plants grown in the resistance test (test of effect slices)

Effect	VI	Sugar beet genotype	NomDF	DenDF	F-value	<i>P</i> > F
VS×SB	healthy		2	76	0·00	1·0000 n.s.
VS×SB	A (WT)		2	76	59·31	<·0001***
VS×SB	A (RB)		2	76	74·64	<·0001***
VS×SB	P (RB)		2	76	18·38	<·0001***
VS×SB	B (WT)		2	76	55·18	<·0001***
VS×SB		<i>rz1rz1</i>	4	76	65·08	<·0001***
VS×SB		<i>Rz1rz1</i>	4	76	82·80	<·0001***
VS×SB		<i>Rz1rz1+Rz2rz2</i>	4	76	16·76	<·0001***

VS: virus strain.

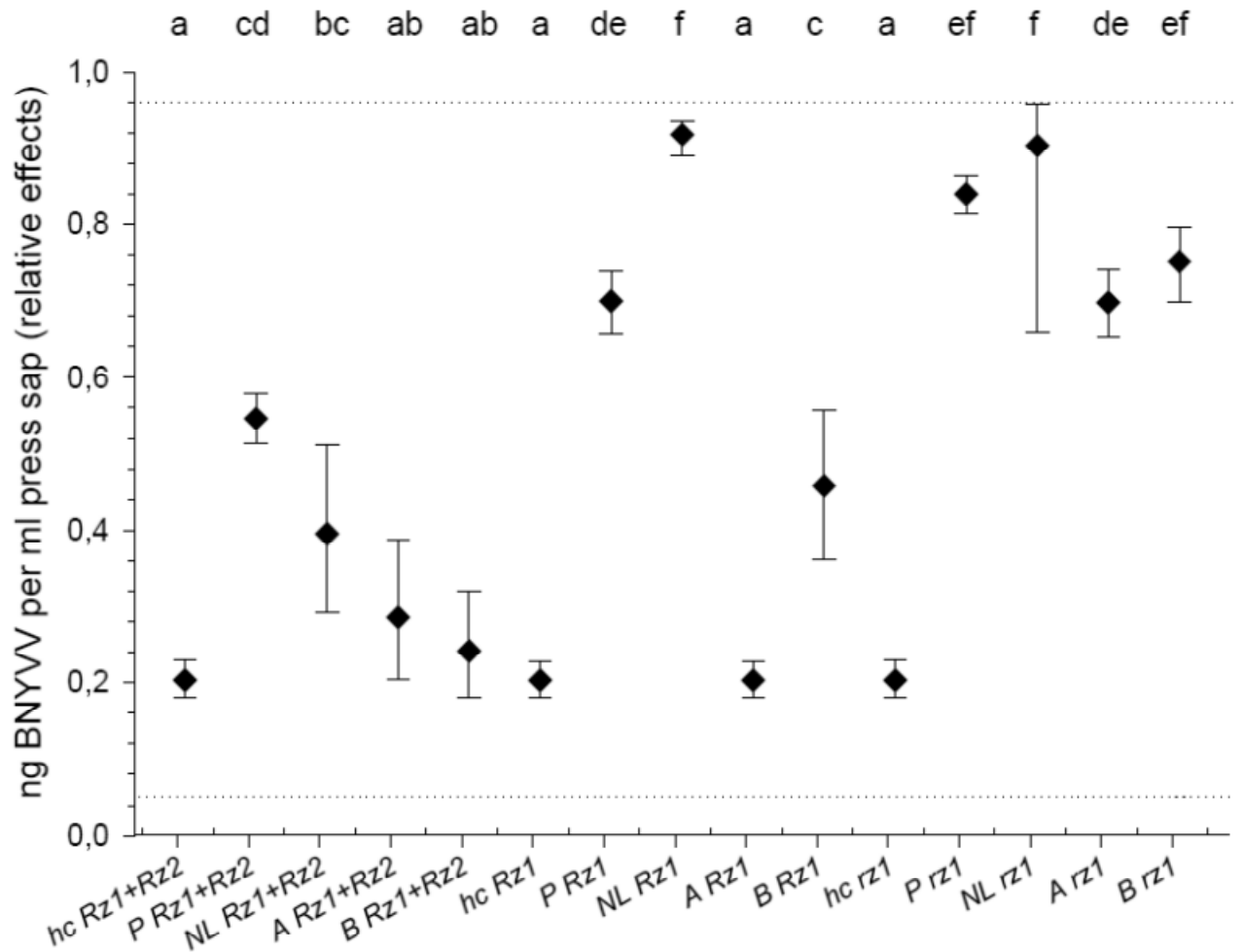
SB: sugar beet.

NomDF: nominator degrees of freedom.

DenDF: denominator degrees of freedom.

Levels of significance: \*\*\**P* < 0·001.

n.s.: not significant.



**Figure 1** Total virus titer induced by four BNYVV strains in different sugar beet genotypes shown as the range of relative effects; greenhouse resistance test with ten-week-old plants. Y-axis: BNYVV titer expressed as relative effects of replication per variant. X-axis: A, BNYVV A type (WT); NL, BNYVV A type (RB); P, BNYVV P type (RB); B, BNYVV B type (WT); hc, healthy control × sugar beet genotypes: *Rz1+Rz2*, *Rz1Rz2* double-resistant genotype; *Rz1rz1*, *Rz1* single-resistant genotype; and *rz1rz1*, susceptible genotype. Whiskers: 95% confidence interval. For relative effects with non-overlapping letters, ranges differ significantly ( $\alpha = 0.05$ , adjustment: Tukey). The upper and lower limits of the relative effects are displayed as dotted lines.

## 6. Manuskript 4

*published in Molecular Plant Pathology, 2013, DOI: 10.1111/mpp.12012*

### **Effect of sugar beet genotype on the *Beet necrotic yellow vein virus* P25 pathogenicity factor and evidence for a fitness penalty in resistance-breaking strains**

Kathrin Bornemann and Mark Varrelmann\*

Institute of Sugar Beet Research, Department of Phytopathology, Holtenser Landstr. 77, D-37079 Goettingen, Germany

\*Correspondence: E-mail: varrelmann@ifz-goettingen.de, phone: 0049 551 5056270  
fax: 0049 551 5056299

word count summary: 247

word count according to instructions for authors: 5713

#### **SUMMARY**

*Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), vectored by *Polymyxa betae*, causes rhizomania in sugar beet. For disease control cultivation of hybrids carrying *Rz1* resistance is crucial but compromised by resistance-breaking (RB) strains with specific mutations in the P25 protein at amino acid 67-70 (tetrad). To obtain evidence for P25 variability from soil-borne populations, where the virus persists for decades, populations with wild-type (WT) and RB properties were analyzed by P25 deep sequencing. The level of P25 variation in the populations analyzed did not correlate with RB properties. Remarkably, one WT population contained P25 with RB mutations at a frequency of 11%. To demonstrate selection by *Rz1* and influence of RB mutations on relative fitness, competition experiments between strains were performed. Following mixture of strains with four RNAs, a shift in tetrad variants was observed, suggesting that strains did not mix or transreplicate. The plant genotype exerted a clear influence on the frequency of RB tetrads. In *Rz1* plants, the RB variants out-competed the WT variants, and mostly *vice versa* in susceptible plants, demonstrating a relative

fitness penalty of RB mutations. The strong genotype effect supports the hypothesized *Rz1* RB strain selection with four RNAs suggesting a certain tetrad needs to become dominant in a population to influence its properties. Tetrad selection was not observed when a RB strain, with an additional P26 protein encoded by a fifth RNA, competed with a WT strain supporting its role as second BNYVV pathogenicity factor and suggesting reassortment of both types.

key words: resistance durability, *Rz1*, rhizomania, P25 variability, resistance-breaking

## INTRODUCTION

*Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), the causal agent of the virus disease rhizomania, leads to devastating effects on sugar beet production. *In vivo* transmission by the soil-borne plasmodiophoromycete *Polymyxa betae* enables the virus population to survive for decades in contaminated soils (Abe and Tamada, 1986). Following the first description in Northern Italy in the late 1950s (Canova, 1959), a world-wide spread of the disease was noted within a few decades, now involving almost all sugar beet growing areas (Asher, 1993; McGrann *et al.*, 2009). Due to the high yield losses that threatened economic sugar production, resistance screening started as early as the mid-1960s (Biancardi *et al.*, 2002). In California, the single dominant resistance gene *Rz1* was selected (Lewellen *et al.*, 1987). *Rz1* plants display a phenotype of quantitative resistance (Heijbroek *et al.*, 1999; Scholten *et al.*, 1994). Resistant plants are characterized by a reduction of virus accumulation in small rootlets, the inhibition of virus spread to the taproot, and the lack of rootlet proliferation and other rhizomania-associated symptoms. As *Rz1* has been used in most of the commercial varieties since its identification (Biancardi *et al.*, 2002), it had to be anticipated that, sooner or later, resistance-breaking BNYVV variants with would be selected. Other resistance genes like *Rz2* and *Rz3* as well as additional minor genes are known (Biancardi *et al.*, 2002; Gidner *et al.*, 2005), however, due to the observed yield penalty, currently only *Rz1* together with *Rz2* are used in a few genotypes.

The virus consists of four to five plus-sense ssRNA components, depending on strain origin (Tamada *et al.*, 1989). RNA1 and 2, encoding for viral house-keeping genes which are responsible for replication, assembly, and cell-to-cell movement (reviewed in Peltier *et al.*, 2008), show high sequence homology between different strains (Saito *et al.*, 1996). The

RNA4-encoded P31 protein is responsible for vector transmission and suppression of RNA-silencing (Peltier *et al.*, 2008). The protein P25, encoded by RNA3 and well-known for its role as a pathogenicity factor and control of disease symptoms, is supposed to be an avirulence factor in *Rz1* genotypes (Chiba *et al.*, 2008). Four consecutive amino acids (tetrad) at position 67-70 of P25, which is subjected to strong positive selection, were identified (Schirmer *et al.*, 2005). Comparison of the selective constraints on this P25 tetrad to other viral avirulence factors found the highest ratio between synonymous and non-synonymous substitution rates ( $\omega$ ) encountered so far in plant viruses (Janzac *et al.*, 2009; Schirmer *et al.*, 2005).

Prediction of BNYVV resistance durability is of great importance due to several factors: (i) the huge impact on crop profitability, (ii) the limited number of natural resistance genes, and (iii) the long persistence of the virus population in soil. It was suggested that resistance durability to viruses could be at least in part a consequence of the number of mutations in the virus genome required for shifts in virulence (Harrison, 2002). However, mutations associated with resistance breaking (RB) may have negative fitness effects in susceptible genotypes (Aramburo *et al.*, 2010; Carasco *et al.*, 2007; Desbiez *et al.*, 2003; Janzac *et al.*, 2010; Jenner *et al.*, 2002). Fitness is defined as the ability of a viral variant to reproduce and propagate infectious progeny under certain environmental conditions within a viral quasispecies (Holland *et al.*, 1991). It was hypothesized that resistance genes that impose a high penalty to pathogen fitness will be likely more durable than those that select variants with lower loss of fitness (Leach *et al.*, 2001). Knowledge of fitness costs not only gives insight into host-pathogen interactions, but can also be useful to help predict resistance gene durability for resistance management. For example, counter-selection for RB strains was shown by Vera Cruz *et al.* (2000) by using susceptible crops grown in rotation. Experimental approaches were suggested which might allow to compare fitness penalty of RB mutations with WT strains for prediction of resistance durability (Leach *et al.*, 2001). Following analysis of 20 virus host resistance gene combinations, Janzac *et al.* (2009) identified that the selective constraints applied on the corresponding avirulence factor correlate with the observed resistance durability and proposed a model for its prediction.

BNYVV can be distinguished by RNA1 and 2 marker mutations into four strain groups (Koenig *et al.*, 1995; Schirmer *et al.*, 2005). BNYVV A and B type contain four RNAs and

are most wide-spread. Their origin is unknown but mixture of both types in nature can rarely be observed (Koenig *et al.*, 1995). The P and J type possess a fifth RNA encoding protein P26, which is thought to represent an additional pathogenicity factor (Tamada *et al.*, 1996). The P type only occurs in a few small areas in France, England and Kazakhstan (Harju *et al.*, 2002; Koenig *et al.*, 1997; Koenig and Lennefors, 2000) and the J type mainly in Japan and at a single field site in Germany (Koenig *et al.*, 2008). Strains with five RNA components show increased aggressiveness even in *Rz1* plants (Heijbroek *et al.*, 1999; Tamada *et al.*, 1989), which is suggested to be mainly caused by a possible synergism between P25 and P26 (Pferdmenges *et al.*, 2008). As RNA5 containing strains were identified long before the large-scale cultivation of *Rz1*-genotypes, an evolutionary inter-relation or selection by *Rz1* has never been speculated. Moreover, these strains do not spread rapidly, but mix with A and B type at the border of infected areas, suggesting reassortment of both strain types (Koenig *et al.*, 2009a). The occurrence of the more widely distributed strains carrying four RNA components with resistance-breaking (RB) properties in different geographic regions has been connected to specific P25 tetrad compositions VCHG, VLHG and AYPR (Liu *et al.*, 2005; Liu and Lewellen, 2007; Pferdmenges *et al.*, 2008 and unpublished observations). A positive selection on amino acid (aa) 67 and 70 in RB strains by *Rz1* was reported by Acosta-Leal *et al.*, 2008. By use of pseudorecombinants and reverse genetics, it was demonstrated that an alanine (A) 67 substitution to valine (V) induces RB abilities in a wild-type (WT) BNYVV A type strain possessing P25 with ACHG tetrad (Koenig *et al.*, 2009). However, attempts to select RB variants from natural soil-borne BNYVV populations failed, although an increased P25 tetrad variation was found after serial planting experiments in *Rz1* genotype (unpublished observations, Acosta-Leal *et al.*, 2010).

In the past, P25 tetrad analysis was mainly based on consensus Sanger-sequencing of viral PCR amplicons or clones from single plants grown in field soil samples (Schirmer *et al.*, 2005). P25 tetrad diversity in a certain soil (sample) was never analyzed, although it is widely accepted that virus populations are continuously subjected to genetic variation, competition, and selection, thereby forming a genetic structure known as quasispecies (Domingo and Holland, 1997; Domingo *et al.*, 1998; Eigen *et al.*, 1988). The introduction of deep sequencing (DS) technology (Mardis, 2008) now offers the possibility to overcome



these limitations. The increased number of reads allows also the detection of low frequency mutations and supplies information about the population structure, e.g. avirulence factor variability.

In this study, the P25 tetrad variability of several BNYVV WT and RB strains of different geographic origin was analyzed by means of DS to find evidence if resistance-breaking P25 tetrads are present already at lower concentration in WT populations. To explain (i) spatial separation of A and B type (ii) possible reassortment of four and five RNA carrying strains (iii) to estimate the relative fitness of RB variants and to find more evidence for their selection by *Rz1*, competition experiments of different BNYVV populations with WT and RB abilities in *Rz1*-resistant and susceptible genotypes were performed. This work represents the first high density analysis of pathogenicity factor variability in the field of plant virology for the study of several soil-borne BNYVV populations.

## RESULTS

**Inoculum production of BNYVV populations for competition experiments.** Soils with BNYVV populations of varying aggressiveness and different geographic origins were selected and used for initial determination of the RNA3-encoded P25 (consensus) sequence and encoded tetrad aa composition (Tab. 1). In order to obtain homogenous virus inoculum in vector zoospores from natural soil, bait plants of a susceptible sugar beet genotype were grown in each soil sample for six weeks. BNYVV infection was confirmed by means of ELISA. The consensus sequence of the P25 tetrad in the BNYVV populations of the soils used as determined by Sanger-sequencing (Tab. 1) confirmed the consensus tetrad composition of previous findings (unpublished data, Bornemann and Varrelmann, 2011). However, DS showed that the different populations contained considerable P25 tetrad variability (see below). The presence of RNA 5 in the P type soil, as well as absence in all other soil samples, was verified by means of RT-PCR.

**Deep sequencing control experiment.** To determine possible bias during emulsion-PCR (Tsibris *et al.*, 2009) and to allow calculation of the sequencing error (Gilles

*et al.*, 2011), an additional PCR sub-pool was produced and sequenced in parallel. BNYVV RNA3 cDNAs with VCHG, SYHG and ACHG, were each PCR amplified and added to the DS at an input ratio of 85:14:1 (VCHG/SYHG/ACHG). DS of this control PCR sub-pool resulted in a total of 14,194 reads containing 82.47% reads of the VCHG, 15.11% SYHG, and 0.91% ACHG tetrad, respectively. This demonstrates that the initial ratio was well preserved throughout amplification and indicated that no relevant PCR bias had influenced the depth of DS assay. The total sequencing error for all three plasmids was calculated to be 0.229% on nucleotide level.

**P25 tetrad deep sequencing analysis of inoculum BNYVV populations.** The amplicon pools were MID-sorted (Multiplex Identifier) and clustered on the basis of the different P25 tetrad coding sequences, translated and counted. Tetrad variants on nucleotide level with a frequency of occurrence below the sequencing error rate of 0.229% were not considered for tetrad frequency evaluation. Total read number of P25 tetrad coding sequence DS of the source strains varied between 13,104 and 15,473 reads (Tab. S1, see Supporting Information). At first, the results of the tetrad proportion evaluation confirmed the dominant tetrad of each BNYVV population as determined by initial consensus sequencing. However, additional variants were detected in significant frequencies (Tab.2). The WT A type population from Italy showed the highest tetrad variability in the inoculum of all populations studied. In addition to the dominant ACHG tetrad with 45.1% of all reads, 32.05% of the tetrads were composed of ALHG. Remarkably, although *RzI* resistance-breaking was not observed (Bornemann and Varrelmann, 2011), 11.7 % of the Italian A type population contained the VCHG tetrad, well-known for its resistance-breaking abilities (Liu *et al.*, 2005, Koenig *et al.*, 2009). Two other tetrad variants (TCHG and AHHG) were detected in frequencies of about 1%. In the analyzed A type sequences, only aa 67 and 68 showed polymorphisms. In contrast, only two tetrad variants AYHR (96.51%) and AYHK (0.86%) were detected in the German B type soil population, displaying variation only in aa position 70. The RB A types originating from the Netherlands (consensus tetrad AYPR) and USA (VCHG) showed unexpected low variability as only one single RB tetrad composition was detected above the threshold. Three different tetrad compositions were found in the P type population. However, the

consensus SYHG composition dominated (95.1% of all reads). Only tetrad aas 68 and 70 displayed variation.

**Competition experiments with different BNYVV populations.** The influence of the plant genotype on the P25 tetrad frequencies was analyzed in susceptible and *Rz1* genetic background to analyze relative fitness of the different populations and tetrads present. The combinations applied are displayed in Table 3. A high percentage of susceptible plants displayed infection in all treatments (Tab. 3). The combination of WT A type ACHG + RB strain VCHG showed unexpectedly low infection rates in all plants treated. Therefore, only infested plants were used for further processing. The infection rate for susceptible plants infected in combination with the P type was 100% and 93.3% for the resistant variants. Competition experiments were followed by DS analyses of the P25 gene. A total number of 148,626 reads over all variants of the competition experiments was obtained. The sequencing depth showed some variation as between 9,133 and 16,252 reads were obtained (Tab. S1).

**Competition between WT strains.** WT A and B type are widely spread and known to occur in most cases as separate populations as well in neighboring sugar beet growing areas, i.e. in the Netherlands and Belgium, with high probability to mix and compete according to their relative fitness (Schirmer *et al.*, 2005). The combination of A and B type WT populations was assayed to understand the missing observation of mixed infection under natural conditions. In susceptible plants, the most frequent AYHR tetrad of the B type inoculum dominated the others with 78.65% of all reads (Tab. 4). In *Rz1*-resistant plants, A type tetrads were found most frequently. The P25 VCHG variant with known RB properties increased from 11.7% in the inoculum to 68.49% and the consensus tetrad ACHG attenuated from 45.1% to 20.97%.

***Rz1*-resistant sugar beet plants select P25 tetrad compositions associated with *Rz1* resistance-breaking and RB variants suffer from fitness penalty in the susceptible genotype.** Mixtures of WT and RB populations with four RNAs should supply evidence for *Rz1* selection of RB tetrads and fitness penalty of RB isolates in susceptible plants. Both WT populations were combined in competition experiments with all three RB populations possessing either four or five RNA components. Expectedly, in *Rz1* plants the RB tetrad variants (AYPR and VCHG) out-competed all other P25 variants. In mixed infections of

the RB strains from the Netherlands with WT B and A type, the AYPR tetrad reached 82.18% and 95.93% of all reads, respectively. In comparison to the frequencies detected in the Italian A type inoculum, the VCHG tetrad, however, did not accumulate to increased density, when mixed with the AYPR soil from the Netherlands. Similar frequencies of the RB tetrad were obtained when the RB A type from Minnesota was used for competition with the Italian A type. In susceptible plants, a contrasting situation was observed. The most frequent tetrads of the WT populations, A type ACHG or B type AYHR clearly out-competed the RB tetrad AYPR reaching 59.26% or 96.21%. The RB P25 variant AYPR showed much lower densities, 22.94% or 1.54% depending on the competitor. A slightly different situation was observed when WT A type was mixed with the RB population with dominant VCHG tetrad in susceptible plants. Here, the ACHG tetrad attained 35% of all reads, which was nearly twice as much as in *Rz1* plants, but was, nevertheless, unable to out-compete the RB tetrad VCHG. In most combinations, in which the WT A type was applied, it more or less lost the ALHG tetrad which was present at a density of 32.05% reads in the initial inoculum. Only in combination with the P type it retained nearly 11% of the ALHG tetrad.

**Mixed infection of WT isolates with RB BNYVV P type does not result in clear competition phenotypes between P25 variants.** Competition of A and B type with the RNA5 containing P type should supply information about the hypothesized and above-described reassortment phenomenon. Remarkably, a different scenario of P25 tetrad proportions was always observed when the fifth RNA containing P type was co-infected with the B type (Tab. 4). No clear dominance of a single tetrad in both resistant and susceptible plants was detectable. In WT A type plus P type mixed infection a balance of P25 reads with WT and RB tetrads were observed in susceptible plants, suggesting similar fitness and/or transreplication. In *Rz1* plants, however, SYHG nearly out-competed A type tetrads except VCHG that shifted from 3.69 to 12.16 %.

## DISCUSSION

This was the first study applying DS for high resolution BNYVV population analysis. DS proved to be a valuable tool for the detection of P25 variability. The results shows, in most cases, that the sugar beet genotype has a strong selective effect on the accumulation of different P25 tetrads and that RB tetrad mutations were selected with a loss of relative fitness, except for the P type. To our knowledge, this was also the first application of DS in the field of virus-plant interactions to compare relative viral fitness of several populations with different properties. In mammalian virological studies, DS is already known as a well-suited method to detect the effect of certain kinds of selection pressure on virus populations, i.e. low-frequency mutations of drug resistance in *Human immunodeficiency virus-1* (HIV-1) (Wang *et al.*, 2007), bottlenecks of *Hepatitis C virus* (HCV) transmission (Wang *et al.*, 2010) as well as *Hepatitis B virus* (HBV) diversity (Solmone *et al.*, 2009).

In the current study, by using 454 DS technology, and ca. 9,000-16,000 reads per base pair as well as by consideration of the PCR amplification and sequencing error, mutations on nucleotide level above a frequency of 0.229% were detectable. Compared to conventional Sanger-sequencing, which can only detect mutants that reach approximately 10% of the template and DS of small RNAs which results in ca. 500x coverage (Kreuze *et al.*, 2009), DS read depth is several orders of magnitude higher. DS therefore enabled us to study P25 tetrad diversity, the key for BNYVV population aggressiveness towards *Rz1* resistance with high sensitivity.

Remarkably, the different populations applied as inoculum showed considerable P25 tetrad variability in DS analysis. No link between RB properties and diversity was detected as all RB populations displayed relative few P25 variants, the two WT soil samples showed high (A type) and low (B type) P25 variability, respectively. When these findings are regarded in relation to the strong genotype effect on P25 tetrad accumulation that we detected in competition experiments, it can be proposed that the high tetrad variability found in the Italian A type soil can be explained by the cultivation of diverse sugar beet genotypes with different BNYVV resistance genetics in the past. All other populations analyzed displayed less tetrad variability. This might be regarded as an indication for fitness differences between the populations. A homogenous population can be an indication

for a recent infection of the soil or a uniform selection pressure exerted during previous sugar beet rotations. The finding that different tetrad aa positions displayed variation, depending on population origin and virus type, remains unexplained. If this reflects type-specific interactions between virus and host plant genotype or if this is due to epistatic effects between different viral gene mutations (Sanjuán *et al.*, 2004), needs to be analyzed in further experiments.

In competition experiments, a shift in P25 variants was observed, indicating that competition between inoculum sources had occurred by use of mixed infections, in dependence of combinations of populations and plant genotype. At first, the huge genotype influence on P25 variant frequency supports the finding that this protein acts as the main pathogenicity and avirulence factor (Chiba *et al.*, 2008), and the hypothesis that RB variants (VCHG and AYPR) have been selected by *Rz1* (Acosta-Leal *et al.*, 2008; Bornemann and Varrelmann, 2011). The P25 variant shift suggests as well that strains possessing four RNAs with different P25 variants do not transreplicate and that the *Rz1* resistance does not seem to act via a systemic signal but more likely on the cellular level. This indicates either spatial separation or incompatibility of virus variants. Spatial separation of two populations from the same species seems to be more probable as it was already demonstrated for two other plant virus species (Dietrich and Maiss, 2003; Takahashi *et al.*, 2007). By means of labeling the virus with two different markers, it was shown that two populations of the same virus species (*Plum pox virus* and *Apple latent spherical virus*) distribute separately during colonization of the host plant. However, experimental evidence is missing whether two slightly different BNYVV populations perform a similar host colonization strategy. It can be assumed that transreplication with RNA4 and RNA5 strains takes place and the presence of P26 as a second pathogenicity factor, acting independently of P25 leads to a more balanced proportion of tetrads.

The changes in the tetrad frequency in dependence of the genotype allow an estimation of RB properties and relative fitness of the pathogen. The variant shift observed in different treatments suggests a ranking of relative fitness of P25 tetrad compositions depending on the plant genotype. The fitness of the main tetrads of each population in susceptible plants, as deduced from the competition experiments, is AYHR>SYHG>VCHG>ACHG>AYPR>ALHG. The relative fitness of RB mutations as determined in competition

experiments might represent a good estimation for resistance durability. Obviously, in *Rz1* plants, all RB P25 tetrads from strains with four genome components had a huge selective advantage over WT ones. Because no clear competition effects were observed between WT strains and RNA5 containing P type, it is supposed that RB populations with four RNAs might have gained higher relative fitness in resistant plants compared to P type strains as a consequence of direct *Rz1* selection. However, in order to receive a good estimation for the relative RB properties in *Rz1* plants of different populations, competition experiments between RB strains with different P25 compositions are required.

The transferability of the population analysis to natural field conditions needs to be evaluated, too. The inoculation in greenhouse experiments was performed with minute amounts of lateral roots and cannot be directly compared with the situation in field soils. Although the number of primary infection sites from independently penetrating *P. betae* zoospores loaded with BNYVV is unknown, the tetrad shift occurred quite fast during only six weeks of cultivation. Therefore, it can be deduced that each sugar beet growth period in the field with a certain genotype might considerably influence the genetics of the BNYVV soil-population. Selectively propagated P25 variants become a part of the vector population as *P. betae* cystosori and will infect one of the next sugar beet plants grown in the rotation until the spores die. In a specific field soil, the proportion of tetrads with different properties, therefore, might reflect the genotype history. We conclude that the P25 tetrad composition of a certain population is a genetic footprint of the sugar beet genotypes grown in the past in a certain soil. Possibly, even small changes in the ratio of different sequence variants might be used to predict resistance durability of other natural resistance sources like *Rz2* and *Rz3* in the future, a proactive approach already suggested by Leach *et al.*, 2001 for fungal and bacterial pathogens.

Connecting this population analysis to previously performed resistance tests (Bornemann and Varrelmann, 2011), it can be concluded that 11.7% of the VCHG tetrad in the Italian A type soil are not sufficient to enable the population to overcome *Rz1*. The A and B type competition experiment in *Rz1* plants clearly showed increase of P25 with VCHG composition, although both populations are unable to overcome *Rz1* in single infections (Pferdmenges *et al.*, 2008). We therefore suggest that a specific tetrad has to become dominant in a population to determine its RB properties and fitness. However,

future mixed infection experiments with WT isolates are required to show, if synergistic effects can be found. Additionally, comparison of diverse virus isolates most suitable in serial planting experiments followed by population DS analysis is important to prove this hypothesis. The variable fitness of WT A and B types during host plant colonization observed in this study might explain why both types do not rapidly mix under natural conditions in field soils. A spatial separation of strains that was speculated here, would support this conclusion. In extensive monitoring studies as performed by Schirmer *et al.*, 2005, no A and B type mixed infections in natural soils were detected. The observation of no clear WT tetrad dominance in susceptible plants when WT isolates competed with RNA5 containing P type supports co-replication of RNA5 by both isolates in mixed infections, although it has to be confirmed in more detailed analysis.

One important question was raised by the observation that to date, in addition to RNA5 strains only A type populations carrying four RNAs have been observed to overcome *Rz1*. The results obtained in this study clearly showed that the B type BNYVV population compared to the A type (WT) analyzed here did not only possess another P25 tetrad including different variable aas but, in addition, displayed a relatively higher fitness in susceptible plants. If the rarely detected B type P25 variants in the population analyzed possess RB properties, needs to be shown experimentally, following their isolation on local lesion hosts.

Especially in case of extremely persistent soil-borne viruses, the DS approach is an excellent possibility to identify and enrich newly selected variants under experimental conditions or in the field, functionally characterize them, and start search and introgression of alternative resistance sources, before RB strains spread widely. The use of different resistance sources is necessary to control the disease and to inhibit selection and accumulation of RB strains. Moreover, DS technology allows monitoring selection pressure. Further studies need to be addressed in order to show the influence of the *Rz2* resistance gene on the virus variability. As it is still unclear if the *Rz2* gene possesses the same target as *Rz1*, the BNYVV *Rz2* avirulence gene has to be identified first.

Host plant resistance genes from natural resources are available but their number is finite. Large-scale cultivation of crop plants with uniform resistance genetics might currently be the way of choice for profitable production, but exerts selection pressure on the



pathogen population. DS in association with experiments that determine relative fitness of the virus proved to be a valuable tool for the analysis of rapid changes in the avirulence gene of a plant pathogen adapting to resistance genes. If resistance factors and corresponding avirulence genes are known, this method can be easily adapted to other host-pathogen combinations in order to increase the lifetime of resistance sources when implemented into resistant management strategies.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Preparation of inoculum.** To obtain sugar beet lateral roots infected with divergent BNYVV strains, a bait plant test with five different field soils containing different BNYVV types (Tab. 1) was conducted in the greenhouse. A susceptible sugar beet genotype (see below) was cultivated in these soils for a six week period. Roots were harvested separately, washed out gently under running tap water, and air-dried.

The soil sample from Rovigo (Italy) was collected in an area with history of 40 years of sugar beet breeding activities, including the selection of rhizomania resistance (Biancardi *et al.*, 2002). This soil, as well as the German B type soil, has so far been unable to overcome *Rz1* (Pferdmenges *et al.*, 2008; Bornemann and Varrelmann, 2011). The P type soil was collected in the Pithiviers area from a patch with strong rhizomania symptoms in *Rz1* plants and has the ability to overcome *Rz1* (Pferdmenges *et al.*, 2008; Bornemann and Varrelmann, 2011). The two RB soils containing BNYVV populations with four RNA components were collected in Zeewolde (the Netherlands) (unpublished data), and Dilworth (MN, USA), respectively. The Minnesota-derived BNYVV with P25 VCHG tetrad composition was shown to overcome *Rz1* in previous experiments (B.-L. Lennefors, personal communication). The Dutch soil with AYPR as the consensus P25 tetrad sequence possesses similar aggressiveness (unpublished data).

**Competition experiments in the greenhouse with different sugar beet genotypes.** The different BNYVV infected lateral roots were used as inoculum of sterilized soil in different combinations (Tab. 3). Equal minute amounts (50 mg/pot) of the different treatments were crumbled on the sterile soil in half-full 700 ml plastic pots. After pots were

filled to capacity with sterile soil, 10-day-old sugar beet plants were transplanted. A susceptible sugar beet genotype (*rzlrz1*) and an *Rz1*-resistant genotype (*Rz1rz1*) were used each with seven plants per pot. Both genotypes have been described previously (Liu *et al.*, 2005; Bornemann and Varrelmann, 2011). A number of 15 replications for each combination resulted in a total of 240 pots. Plants were kept in the greenhouse at 24°C (day)/18°C (night) with a 10-h photoperiod of additional light. To control damping-off diseases, plants were sprayed with the fungicide Tachigaren 70 WP (Sumitomo) with 90g per 100,000 plants. After six weeks, plants were harvested as described above. One part of the harvested roots was stored at -80°C until nucleic acid preparation. The other part served to determine the concentration of BNYVV by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), performed as described previously (Saito *et al.*, 1996).

**Detection of BNYVV.** Five root samples of each variant, which were considered positive by ELISA were selected for RNA preparation. Total RNA was extracted using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) in accordance to the manufacturer's protocol. Detection of BNYVV presence was performed by means of reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) partial amplification of RNA 3 and RNA 5 encoded P25 and P26 gene, respectively, as described in Bornemann and Varrelmann (2011). RT-PCR chemicals and conditions were the same as described in Pferdmenges *et al.*, 2008. The presence of BNYVV RNA 5 was detected with primers that amplified the entire P26 ORF (nt 447–1103 of GenBank Acc. No. U78293). To determine the consensus P25 tetrad composition before starting DS (see below), one PCR sample per variant was purified using SureClean reagent (Bioline) and sequenced by commercial capillary Sanger-sequencing (Eurofins MWG Operon) with specific primers.

**Sample preparation for deep sequencing.** Five RNA samples of each treatment were chosen for DS analysis. For RT-PCR amplification and DS of partial P25, containing the tetrad coding sequence (nt 465-824, 360 bp product length, Acc. No. M36894), specific primers were designed (Upper-465: 5'-GCAGTTTATGATTTAGGGCA-3', Lower-824: 5'-ACGATCATAGTGGATGACGA-3'). Oligonucleotides were supplied with 25 3'-adaptor nucleotides for on-bead amplification and DS (Roche, see below) and a unique MID of 10 nt in length (provided by the sequencing company). The whole cDNA reaction mixture of 10 µl was divided to obtain three PCR samples per RNA (15 RT-PCR reactions per variant) and the following PCR program was performed: 96°C for 2 min, 36 cycles of

96°C for 45 s, 52°C for 1 min, 72°C for 1 min, and final synthesis for 10 min at 72°C. PCR products were visualized on agarose gels and subsequently pooled. An amount of 150 ng of DNA was applied for DS. The pooled PCR products were cleaned up with QiaExII (Qiagen) following the manufacturer's instructions to remove primer-dimers. Fluorometric quantification and adjustment to equal concentrations was performed before all different RT-PCR sub-pools were finally pooled for sequencing. To determine the deep sequencing error, plasmids (pBluescript, Stratagene) containing full-length BNYVV RNA3 cDNAs from isolates with known tetrad compositions (VCHG, SYHG, and ACHG) were used as templates for PCR amplification with specific primers with one MID for all three variants. For DS PCR, products of all three variants were quantified and adjusted to an input ratio of 85:14:1 (VCHG/SYHG/ACHG) by the sequencing company. DS was conducted using 454 GS FLX sequencing platforms (Roche) at Eurofins MWG Operon. The 454 libraries were amplified on beads with emulsion-PCR according to the Roche standard protocols and deep sequenced in both, sense and antisense orientation as described in Margulies *et al.*, 2005.

The emulsion-PCR and sequencing induced error was calculated as follows. Nucleotide sequences of the control reaction initially were aligned with the program MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) and visualized with the program Jalview (<http://www.jalview.org/>). Furthermore, scripts were developed to perform clustering of the three tetrad variants and counting of mutations, insertions as well as deletions. The percentage of insertions and deletions (total DS error) was determined by calculating the ratio of total number of read nucleotides (including incomplete reads) and the total number of errors (both per variant) (data not shown). Bioinformatic evaluation of the sequencing results of the amplicon pools including MID-sorting and clustering according to P25 tetrad coding sequences, translation and counting was performed by the sequencing company.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Ministry for Science and Culture of Lower Saxony, Germany, as a part of the KLIFF project (climate impact and adaptation research in Lower Saxony).

We thank Annette Walter, Manfred Jordan, and Helmut Korf for excellent technical assistance in the greenhouse and lab. Layal al Ait (Department of Bioinformatics, Georg-August University of Göttingen) is kindly acknowledged for running the bioinformatics program and data evaluation.

## REFERENCES

1. Abe, H. and Tamada, T. (1986) Association of *beet necrotic yellow vein virus* with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. *Ann. Phytopath. Soc. Jap.* 52, 235–247.
2. Acosta-Leal, R., Fawley, M.W. and Rush, C.M. (2008) Changes in the intra-isolate genetic structure of *Beet necrotic yellow vein virus* populations associated with plant resistance breakdown. *Virology* 376, 60–68.
3. Acosta-Leal, R., Bryan, B.K. and Rush, C.M. (2010) Host effect on the genetic diversification of *Beet necrotic yellow vein virus* single-plant populations. *Phytopathology* 100, 1204–1212.
4. Aramburo, J., Galipienso, L., Soler, S. and López, C. (2010) Characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates that overcome the *Sw-5* resistance gene in tomato and fitness assays. *Phytopath. Mediterran.* 49, 342–351.
5. Asher, M.J.C. (1993) Rhizomania. In Cook DA, Scott RK (ed.), *The Sugar Beet Crop*. Chapman & Hall/CRC Press, London, UK.
6. Biancardi, E., Lewellen, R.T., De Biaggi, M., Erichsen, A.W. and Stevanato, P. (2002) The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica* 127, 383–397.
7. Bornemann, K. and Varrelmann, M. (2011) Analysis of the resistance-breaking ability of different *Beet necrotic yellow vein virus* isolates loaded into a single *Polymyxa betae* population in soil. *Phytopathology* 101, 718–724.
8. Canova, A. (1959) Appunti di patologia della barbabietola. *Inf. Fitopat.* 20, 390–396.
9. Carrasco, P., de la Iglesia, F. and Elena, S.F. (2007) Distribution of fitness and virulence effects caused by single-nucleotide substitutions in *Tobacco etch virus*. *J. Virol.* 81, 12979–12984.

10. Chiba, S., Miyanishi, M., Andika, I.B., Kondo, H. and Tamada, T. (2008) Identification of amino acids of the *beet necrotic yellow vein virus* p25 protein required for induction of the resistance response in leaves of *Beta vulgaris* plants. *J. Gen. Virol.* 89, 1314–1323.
11. Desbiez, C., Gal-On, A., Girard, M., Wipf-Scheibel, C. and Lecoq, H. (2003) Increase in *Zucchini yellow mosaic virus* symptom severity in tolerant zucchini cultivars is related to a point mutation in P3 protein and is associated with a loss of relative fitness on susceptible plants. *Phytopathology* 93, 1478–1484.
12. Dietrich, C. and Maiss, E. (2003) Fluorescent labeling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *J. Gen. Virol.* 84, 2871–2876.
13. Domingo, E. and Holland, J.J. (1997) RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 151–178.
14. Domingo, E., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Martín-Hernández, A.M., Sáiz, J.C. and Escarmís, C. (1998) Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Em. Inf. Dis.* 4, 521–527.
15. Eigen, M., McCaskill, J. and Schuster, P. (1988) Molecular Quasispecies. *J. Phys. Chem.* 92, 6881–6891.
16. Gidner, S., Lennefors, B.-L., Nilsson, N.-O., Bensefelt, J., Johansson, E., Gyllenspetz, U. and Kraft, T. (2005) QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. *Genome* 48, 279–285.
17. Gilles, A., Megléc, E., Pech, N., Ferreira S., Malausa, F. and Martin, J.-F. (2011) Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics* 12, 245.
18. Harju, V.A., Mumford, R.A., Bockley, A., Boonham, N. and Clover, G.R.G. (2002) Occurrence in the United Kingdom of *beet necrotic yellow vein virus* isolates which contain RNA5. *Plant Pathol.* 51, 811.
19. Harrison, B.D. (2002) Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica* 124, 181–192.

20. Heijbroek, W., Musters, P.M.S and Schoone, A.H.L. (1999) Variation in pathogenicity and multiplication of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in relation to the resistance of sugar-beet cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 397–405.
21. Holland, J.J., de la Torre, J.C., Clarke, D. and Duarte, E. (1991) Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J. Virol.* 65, 2960–2967.
22. Janzac, B., Fabre, F., Palloix, A. and Moury, B. (2009) Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. *Mol. Plant Pathol.* 10, 599–610.
23. Janzac, B., Montarry, J., Palloix, A., Navaud, O. and Moury B. (2010) A point mutation in the polymerase of *Potato virus Y* confers virulence toward the *pvr4* resistance of pepper and a high competitiveness cost in susceptible cultivar. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 823–830.
24. Jenner, C.E., Wang, X., Ponz, F. and Walsh J.A. (2002) A fitness cost for *Turnip mosaic virus* to overcome host resistance. *Virus Res.* 86, 1–6.
25. Koenig, R., Lüddecke, P. and Haeberlé, A.M. (1995) Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-stranded conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *J. Gen. Virol.* 76, 2051–2055.
26. Koenig, R., Haeberlé, A.M. and Commandeur, U. (1997) Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugar beet growing area in Europe. *Arch. Virol.* 142, 1499–1504.
27. Koenig, R. and Lennefors, B.L. (2000) Molecular analyses of European A, B and P type sources of *Beet necrotic yellow vein virus* and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Arch. Virol.* 145, 1561–1570.
28. Koenig, R., Kastirr, U., Holtschulte, B., Deml, G. and Varrelmann, M. (2008) Distribution of various types and P25 subtypes of *Beet necrotic yellow vein virus* in Germany and other European countries. *Arch. Virol.* 153, 2139–2144.
29. Koenig, R., Loss, S., Specht, J., Varrelmann, M., Lüddecke, P. and Deml., G. (2009) A single U/C nucleotide substitution changing alanine to valine in the *Beet necrotic yellow vein virus* P25 protein promotes increased virus accumulation in

- roots of mechanically inoculated, partially resistant sugar beet seedlings. *J. Gen. Virol.* 90, 759–763.
30. Koenig, R., Holtschulte, B., Deml, G., Lueddecke, P., Schuhmann, S., Maass, C., Richert-Poggeler, K. (2009a). *Beet necrotic yellow vein virus* genome reassortments in a resistant sugar beet variety showing - in a small area in France - strong rhizomania symptoms. *Journal of Plant Diseases and Protection* 116, 7-9.
  31. Kreuze, J.F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I. and Simon, R. (2009) Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology* 388, 1–7.
  33. Leach, J.E., Vera Cruz, C.M., Bai, J. and Leung, H. (2001) Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 187–224.
  34. Lewellen, R.T., Skoyen, I.O. and Erichsen, A.W. (1987) Breeding sugar beet for resistance to rhizomania: Evaluation of host-plant reactions and selection for and inheritance. *Proceedings of the 50<sup>th</sup> IIRB Congress*, Brussels, Belgium, 139–156.
  35. Liu, H.Y., Sears, J.L. and Lewellen, R.T. (2005) Occurrence of resistance-breaking *Beet necrotic yellow vein virus* of sugar beet. *Plant Dis.* 89, 464–468.
  36. Liu H.Y. and Lewellen, R.T. (2007) Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* in the United States. *Plant Dis.* 91, 847–851.
  37. Mardis, E.R. (2008) Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9, 387–402.
  38. Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P, Jando, S.C., Alenquer, M.L.I, Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J.,

- Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F. and Rothberg, J.M. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376–380.
39. McGrann, G.R.D., Grimmer, M.K., Mutasa-Göttgens, E.S. and Stevens M. (2009) Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. *Mol. Plant Pathol.* 10, 129–141.
40. Peltier, C., Hleibieh, K., Thiel, H., Klein, E., Bragard, C., Gilmer, D. (2008) Molecular biology of the *Beet necrotic yellow vein virus*. *Plant Vir.* 2, 14–24.
41. Pferdenges, F., Korf, H. and Varrelmann, M. (2008) Identification of rhizomania-infected soil in Europe able to overcome *Rz1* resistance in sugar beet and comparison with other resistance-breaking soils from different geographic origins. *Eur. J. Plant Pathol.* 124, 31–43.
42. Saito, M., Kiguchi, T., Kusume, T. and Tamada, T. (1996) Complete nucleotide sequence of the Japanese isolate S of beet necrotic yellow vein virus RNA and comparison with European isolates. *Arch. Virol.* 141, 2163–2175.
43. Sanjuán, R., Moya, A. and Elena, S.F. (2004) The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8396–8401.
44. Schirmer, A., Link, D., Cognat, V., Moury, B., Beuve, M., Meunier, A., Bragard C., Gilmer, D. and Lemaire, O. (2005) Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. *J. Gen. Virol.* 86, 2897–2911.
45. Scholten, O.E., Paul, H., Peters, D., Van Lent, J.W. and Goldbach, R.W. (1994) In situ localisation of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in rootlets of susceptible and resistant beet plants. *Arch. Virol.* 136, 349–361.
46. Solmone, M., Vicenti, D., Prospero, M.C.F., Bruselle, A., Ippolito, G. and Capobianchi, M.R. (2009) Use of massively parallel ultradeep pyrosequencing to characterize the genetic diversity of hepatitis B virus in drug-resistant and drug-naive patients and to detect minor variants in reverse transcriptase and hepatitis B S antigen. *J. Virol.* 83, 1718–1726.



47. Takahashi, T., Sugawara, T., Yamatsuta, T., Isogai, M., Natsuaki, M. and Yoshikawa, N. (2007) Analysis of the spatial distribution of identical and two distinct virus populations differently labeled with cyan and yellow fluorescent proteins in coinfecting plants. *Phytopathology* 97, 1200–1206.
48. Tamada, T., Abe, H., Saito, M., Kiguchi, T. and Harada, T. (1989) Production and pathogenicity of isolates of Beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *J. Gen. Virol.* 70, 3399–3409.
49. Tamada T., Kusume T., Uchino H., Kiguchi T., Saito M. (1996). Evidence that Beet necrotic yellow vein virus RNA-5 is involved in symptom development of sugar-beet roots. In J. L. Sherwood & C. M. Rush (Eds.). *Proceedings of the 3rd Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, Dundee, Scotland, 49-52.
50. Tsibris, A.M.N., Korber, B., Arnaout, R., Russ, C., Lo, C.-C., Leitner, T., Gaschen, B., Theiler, J., Paredes, R., Su, Z., Hughes, M.D., Gulick, R.M., Greaves, W., Coakley, E., Flexner, C., Nusbaum, C. and Kuritzkes, D.R. (2009) Quantitative deep sequencing reveals dynamic HIV-1 escape and large population shifts during CCR5 antagonist therapy in vivo. *PLoS One.* 4, e5683v.
51. Vera Cruz, C.M., Bai, J., Oña, I., Leung, H., Nelson, R.-J., Mew, T.-W. and Leach J.E. (2000) Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13500–13505.
52. Wang, C., Mitsuya, Y., Gharizadeh, B., Ronaghi, M. and Shafer, R.W. (2007) Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res.* 17, 1195–1201.
53. Wang, G.P., Sherrill-Mix, S.A., Chang, K.-M., Quince, C. and Bushman, F.D. (2010) Hepatitis C virus transmission bottlenecks analyzed by deep sequencing. *J. Virol.* 84, 6218–6228.

---

Supporting Information:

**Table S1** Deep sequencing analysis read numbers obtained in competition experiments with different BNYVV strains and sugar beet genotypes.

**Table 1** BNYVV-infested field soils applied for bait plant test in the greenhouse to produce virus infected roots of a BNYVV susceptible sugar beet genotype for use as inoculum.

Soil origin	BNYVV type	Consensus P25 tetrad	<i>Rz1</i> phenotype <sup>a</sup>
Rovigo (Italy)	A	ACHG	WT
Harting (Bavaria, Germany)	B	AYHR	WT
Pithiviers (France)	P	SYHG	RB
Zeewolde (Netherlands)	A	AYPR	RB
Dilworth (Minnesota, USA)	A	VCHG	RB

<sup>a</sup> WT = wild type (a non-resistance-breaking soil used as a reference soil); RB = resistance-breaking (Liu *et al.*, 2005; Liu and Lewellen, 2007; Pferdenges *et al.*, 2008; Bornemann & Varrelmann, 2011 and unpublished observations)

**Table 2** Frequencies of P25 tetrad compositions in the BNYVV inoculum used in competition experiments, obtained from lateral roots of a susceptible (*rz1rz1*) sugar beet genotype following deep sequencing analysis. Tetrad variants with frequencies below the calculated sequencing error of 0.229% are not displayed.

BNYVV strains (type, consensus sequence, <i>Rz1</i> -aggressiveness)	Tetrads	%
A ACHG (WT)	ACHG	45.1
	ALHG	32.05
	VCHG	11.7
	TCHG	1.02
	AHGG	0.72
B AYHR (WT)	AYHR	96.51
	AYHK	0.86
P SYHG (RB)	SYHG	95.10
	SYHR	1.83
	SFHG	0.78
A AYPR (RB)	AYPR	97.26
A VCHG (RB)	VCHG	97.34
Control <sup>a</sup>	VCHG	82.47
	SYHG	15.11
	ACHG	0.91

<sup>a</sup>Read frequencies of P25 plasmid amplicons applied to estimate a possible PCR bias of the deep sequencing process.

**Table 3** BNYVV inoculum combinations used for infection and in competition experiments in the greenhouse in susceptible and *Rz1* resistant sugar beet plants: Mean BNYVV ELISA absorption values measured in small rootlets of sugar beet genotypes after six weeks of cultivation and infection rate.

BNYVV competitor strains (type, consensus sequence, <i>Rz1</i> -aggressiveness)		Genotype	Mean $A_{405}^a$	MSD	No. of replications	% infected plants
A ACHG (WT)	B AYHR (WT)	<i>rz1rz1</i>	1.16	0.87	15	80
A ACHG (WT)	B AYHR (WT)	<i>Rz1rz1</i>	0.3	0.41	15	40
A ACHG (WT)	A AYPR (RB)	<i>rz1rz1</i>	0.91	0.28	15	100
A ACHG (WT)	A AYPR (RB)	<i>Rz1rz1</i>	0.34	0.42	15	46.7
B AYHR (WT)	A AYPR (RB)	<i>rz1rz1</i>	0.71	0.29	15	93.3
B AYHR (WT)	A AYPR (RB)	<i>Rz1rz1</i>	0.66	0.53	15	80
A ACHG (WT)	A VCHG (RB)	<i>rz1rz1</i>	0.42	0.49	15	66.7
A ACHG (WT)	A VCHG (RB)	<i>Rz1rz1</i>	0.45	0.62	15	60
A ACHG (WT)	P SYHG (RB)	<i>rz1rz1</i>	1.13	0.41	15	100
A ACHG (WT)	P SYHG (RB)	<i>Rz1rz1</i>	0.67	0.33	15	93.3
B AYHR (WT)	P SYHG (RB)	<i>rz1rz1</i>	1.38	0.37	15	100
B AYHR (WT)	P SYHG (RB)	<i>Rz1rz1</i>	0.59	0.28	15	93.3
A ACHG (WT) <sup>b</sup>		<i>rz1rz1</i>	0.65	n.a. <sup>c</sup>	5	n.a. <sup>c</sup>
B AYHR (WT) <sup>b</sup>		<i>rz1rz1</i>	1.02	n.a. <sup>c</sup>	5	n.a. <sup>c</sup>
P SYHG (RB) <sup>b</sup>		<i>rz1rz1</i>	1.77	n.a. <sup>c</sup>	5	n.a. <sup>c</sup>
A AYPR (RB) <sup>b</sup>		<i>rz1rz1</i>	1.14	n.a. <sup>c</sup>	5	n.a. <sup>c</sup>
A VCHG (RB) <sup>b</sup>		<i>rz1rz1</i>	1.24	n.a. <sup>c</sup>	5	n.a. <sup>c</sup>

<sup>a</sup> calculated from number of infected plants

<sup>b</sup> infected roots served as inoculum for competition experiments

MSD, mean standard deviation of absorption

<sup>c</sup> n.a. = not applicable as sample was taken as a mixture out of five pots

**Table 4** BNYVV P25 tetrad compositions following competition of different BNYVV populations in susceptible (*rzlrzI*) and resistant (*RzlrzI*) sugar beet genotypes obtained by means of deep sequencing<sup>a</sup>.

BNYVV competitor strains (type, consensus sequence, aggressiveness)	Tetrads	<i>rzlrzI</i> %	<i>RzlrzI</i> %
A ACHG (WT) + B AYHR (WT)	AYHR	78.65	0.43
	VCHG	7.88	68.49
	ACHG	6.51	20.97
	ALHG	4.52	7.6
A ACHG (WT) + A AYPR (RB)	ACHG	59.26	0.54
	AYPR	22.94	82.18
	VCHG	14.00	13.32
	ALHG	1.02	1.24
B AYHR (WT) + A AYPR (RB)	AYHR	96.21	1.23
	AYPR	1.54	95.93
A ACHG (WT) + A VCHG (RB)	VCHG	56.45	69.23
	ACHG	35.73	17.72
	AHHG	4.06	-
A ACHG (WT) + P SYHG (RB)	SYHG	40.59	78.44
	ACHG	36.20	6.11
	ALHG	10.88	0.29
	VCHG	3.69	12.16
	AHHG	2.16	-
	SFHG	1.67	-
	SYHR	1.09	-
B AYHR (WT) + P SYHG (RB)	AYHR	58.16	49.35
	SYHG	36.84	47.21
	SFHG	1.38	-
	SYHR	0.86	0.34
	AYHG	0.53	0.39

<sup>a</sup> an error rate of 0.229% was calculated to determine the error occurring during amplification. For detailed explanations see text.

**Table S1** Deep sequencing analysis read numbers obtained in competition experiments with different BNYVV strains and sugar beet genotypes.

BNYVV competitor strains (type, consensus sequence, <i>Rz1</i> -aggressiveness)	Genotype	sense	antisense	total
		number of reads	number of reads	number of reads
A ACHG (WT) + B AYHR (WT)	<i>rz1rz1</i>	5,601	5,484	11,085
A ACHG (WT) + B AYHR (WT)	<i>Rz1rz1</i>	8,378	6,982	15,360
A ACHG (WT) + A AYPR (RB)	<i>rz1rz1</i>	5,941	5,914	11,855
A ACHG (WT) + A AYPR (RB)	<i>Rz1rz1</i>	6,239	6,129	12,368
B AYHR (WT) + A AYPR (RB)	<i>rz1rz1</i>	5,787	5,153	10,940
B AYHR (WT) + A AYPR (RB)	<i>Rz1rz1</i>	4,050	5,182	9,232
A ACHG (WT) + A VCHG (RB)	<i>rz1rz1</i>	8,986	7,266	16,252
A ACHG (WT) + A VCHG (RB)	<i>Rz1rz1</i>	7,409	6,563	13,972
A ACHG (WT) + P SYHG (RB)	<i>rz1rz1</i>	3,819	5,645	9,464
A ACHG (WT) + P SYHG (RB)	<i>Rz1rz1</i>	7,447	6,845	14,292
B AYHR (WT) + P SYHG (RB)	<i>rz1rz1</i>	3,398	5,735	9,133
B AYHR (WT) + P SYHG (RB)	<i>Rz1rz1</i>	7,681	6,992	14,673
A ACHG (WT) <sup>a</sup>	<i>rz1rz1</i>	6,838	6,266	13,104
B AYHR (WT) <sup>a</sup>	<i>rz1rz1</i>	6,757	6,325	13,082
P SYHG (RB) <sup>a</sup>	<i>rz1rz1</i>	7,354	6,247	13,601
A AYPR (RB) <sup>a</sup>	<i>rz1rz1</i>	7,744	7,156	14,900
A VCHG (RB) <sup>a</sup>	<i>rz1rz1</i>	8,382	7,091	15,473
control <sup>b</sup>	n.a. <sup>c</sup>	7,715	6,479	14,194

<sup>a</sup> infected roots served as inoculum; <sup>b</sup> mixed sample (85:14:1) obtained from plasmids with defined tetrad compositions; <sup>c</sup> n.a. = not applicable

## 7. Diskussion

### 7.1 Die Beladung von *Polymyxa betae* als Methode zur Identifizierung von resistenzüberwindenden Isolaten

Die Methode der BNYVV Beladung von *P. betae* wurde im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt, um resistenzüberwindende Eigenschaften verschiedener BNYVV-Isolate untereinander vergleichen bzw. charakterisieren zu können. Weiterhin sollten Beobachtungen, die zur Aggressivität eines Virus-Isolats im Feld gemacht wurden, unter standardisierten Gewächshausbedingungen unter Verwendung einer natürlichen, jedoch uncharakterisierten Vektorpopulation überprüft werden können, sowie in Resistenztests gemachte Beobachtungen bestätigt werden. Als Grundlage des Versuchs dient die von KOENIG und STEIN (1990) entwickelte künstliche Infektion von Zuckerrüben-Jungpflanzen durch mechanische Inokulation. Die wichtigsten Aussagen, die im Rahmen dieser Untersuchung getroffen wurden, sind folgende: Eine nachweislich Virus-freie *P. betae* Population konnte effizient mit verschiedenen BNYVV-Isolaten beladen werden. Die Unterschiede in der Aggressivität verschiedener BNYVV-Isolate sind unabhängig von der Vektorpopulation, aber werden möglicherweise von anderen biotischen und abiotischen Faktoren im Boden beeinflusst. Die im Feld gemachten Beobachtungen der Resistenzüberwindung vom BNYVV P- und IV-Typ (LIU et al., 2005; PFERDMENGES et al., 2008) konnten nach der Beladung einer identischen Vektorpopulation anderer Herkunft bestätigt werden. KOENIG et al. (2009) konnten in Experimenten mit Pseudorekombinanten von BNYVV und mittels Reverser Genetik zeigen, dass der Austausch an der Aminosäureposition 67 innerhalb der Tetrade von Alanin zu Valin eines schwedischen A-Typ Isolates zu erhöhten Virusgehalten in resistent (*Rz1rz1*) und doppelt-resistenten (*Rz1Rz2*) Zuckerrüben-Genotypen nach mechanischer Wurzelinokulation führt. Diese Ergebnisse konnten im oben beschriebenen Versuch nicht vollständig bestätigt werden. Es wurden lediglich erhöhte Virusgehalte in *Rz1*-resistenten Zuckerrüben-Genotypen nachgewiesen, eine Infektion von *Rz1+Rz2*-resistenten Pflanzen konnte nur in einzelnen Pflanzen detektiert werden.

Diese Punkte werden in diesem Kapitel nicht weiter diskutiert, daher wird an dieser Stelle auf die Diskussion im Manuskript 1 (Kapitel 3) hingewiesen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse mit anderen BNYVV-Isolaten reproduziert werden können und resistenzüberwindende Eigenschaften nach Übertragung durch eine andere Vektorpopulation erhalten bleiben (siehe Kapitel 7.1.1). Weiterhin bietet die Methode der *P. betae*-Beladung die Möglichkeit, vergleichende Aussagen zur Fitness unterschiedlicher BNYVV-Isolate zu treffen. Dies war nach einem Resistenztest mit verschiedenen Feldböden auch unter sonst standardisierten Bedingungen bisher nicht möglich, da unbekannt war, ob bodenbürtige Pathogene einen Einfluss nehmen. Darüber kann nur spekuliert werden, da der experimentelle Nachweis zum Einfluss z.B. pilzlicher Pathogene auf die Virusinfektion und pflanzliche Resistenzeigenschaften bislang fehlt. Ein Einfluss von BSBV und BVQ auf das Auftreten von BNYVV ist bislang unklar. „Cross protection“, wie es bei einer Mischinfektion mit BOLV oder BSBMV auftritt (MAHMOOD und RUSH, 1999) kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. RUSH (2003) weist in einem Übersichtsartikel auf Faktoren im Boden hin, die Einfluss auf *P. betae* nehmen können. Dazu zählen u.a. der pH-Wert, die Bodenfeuchte, die Bodentemperatur, sowie die Bodenstruktur. Bei einer Erhöhung des CaCO<sub>3</sub>-Gehaltes im Boden, erhöht sich auch signifikant die Infektionsrate von BNYVV (KUTLUK-YILMAZ et al., 2010). BLUNT et al. (1991) und WEBB et al. (2000) beschreiben ein Temperaturoptimum von *P. betae* von 25°C für höchste Übertragungsraten von BNYVV auf die Wurzeln von Zuckerrüben. Natürliche Antagonisten von *P. betae* im Boden konnten bisher nicht identifiziert werden. Es ist lediglich eine Arbeit bekannt, in der die Kontrolle von *P. betae* mittels *Trichoderma* überprüft wurde, sich jedoch für die praktische Anwendung im Feld als zu wenig effizient erwies (JAKUBIKOVA et al., 2006). Um einflussnehmende Faktoren im Boden auszuschließen, könnte eine hydroponische Kultur verwendet werden, zu der eine definierte Menge an *P. betae* Cystosori hinzugegeben wird. Die Effizienz der Übertragbarkeit von BNYVV auf die Seitenwurzeln von Zuckerrüben scheint jedoch sehr gering zu sein bzw. scheint der Vektor das Virus zu verlieren. Möglicherweise ist die Vermehrungsrate von *P. betae* ohne Viruspartikel höher (Pferdmenges, unveröffentlichte Ergebnisse). Es gibt daher wenige Möglichkeiten, die Methode der BNYVV Vektorübertragung weiter zu standardisieren ohne dabei die Praktikabilität eines Resistenzprüfverfahrens zu verlieren.



Bisher konnte eine Beladung an zwei *P. betae*-Populationen gezeigt werden, die aus Feldbodenproben stammen, die frei von Zuckerrüben-infizierenden Viren waren. Solche Bodenproben sind schwer zu finden, da BNYVV inzwischen weit verbreitet ist und BSBV sowie BVQ häufig zusammen mit BNYVV auftreten (MEUNIER et al., 2003). Es ist bekannt, dass *P. betae* in Sandstrandböden an der Küste von Dänemark gefunden wurde (Kopisch-Obuch, pers. Mitteilung; eigene Beobachtungen). Diese Böden könnten für weitere Versuche verwendet werden, sofern ein Vorkommen von BNYVV und anderen Viren ausgeschlossen werden kann. Es besteht daneben die Möglichkeit, dass *P. betae* in einem sterilen Boden vermehrt wird, wodurch große Mengen *Polymyxa*-infizierten Bodens produziert werden könnten. Weiterhin gibt es keine Angaben aus der Literatur zu einer möglichen genetischen Variabilität von *P. betae*. Diese müsste untersucht werden, um Aussagen zu eventuell unterschiedlichen Populationen bzw. dessen Eigenschaften zur Übertragbarkeit von BNYVV im Hinblick auf eine künstliche Beladung treffen zu können. Der Versuchsaufwand ist mit 20 Wochen Versuchsdauer und zwei Zwischenernten sowie hoher Wiederholungszahl sehr hoch. Durch eine mehrfache Passage von BNYVV auf dem Lokalläsionenwirt *C. quinoa* kann es außerdem zu einem Verlust von RNAs bzw. dem Auftreten von verkürzten Formen kommen (KOENIG et al., 1986; BOUZOUBAA et al., 1991). Die dadurch verminderte Virulenz beschreibt AGRIOS (2005) als “attenuation” für Pathogene, die im Labor verwendet werden.

### 7.1.1 Nutzung der Beladung von *P. betae* für weitere Fragestellungen

Neben den in Manuskript 1 dargestellten BNYVV-Isolaten wurden in weiteren Beladungsversuchen *P. betae*-Populationen mit unterschiedlichen BNYVV-Isolaten beladen. Zunächst wurden BNYVV-Isolate durch *in vitro* Mutagenese hergestellt, um die Hypothese von KOENIG et al. (2009) zu überprüfen, dass ein einzelner Nukleotidaustausch (U/C) und dem damit verbundenen Aminosäurewechsel von Alanin zu Valin an Aminosäureposition 67 des P25 verantwortlich für die Resistenzüberwindung ist. *C. quinoa* Pflanzen wurden mechanisch mit einem RNA1+2 “helperstrain” und *in vitro* Transkripten der RNA3 und RNA4 unter Kontrolle des Promotors T7 (aus dem Bakteriophagen T7) infiziert. Es wurden unterschiedliche BNYVV-Isolate (ACHG, VCHG) hergestellt und für eine Beladung im Vergleich mit einem natürlichen B-Typ als Referenz verwendet. Die im

Anschluss an den kreuzklassifizierten Resistenztest bestimmten Virusgehalte in Seitenwurzeln zeigten jedoch keine Unterschiede zwischen dem ACHG- und VCHG-Isolat. Im Vergleich zum Referenz-Isolat waren die Virusgehalte im anfälligen Genotyp gering. Der resistente Genotyp zeigte nahezu keine Infektion, trotz der beobachteten Symptome auf *C. quinoa* und der Kontrolle auf Vollständigkeit der Tetrade durch anschließende Sequenzierung. Somit wurde keine Resistenzüberwindung durch *in vitro* Mutagenese erzeugte BNYVV-Isolate in Beladungsversuchen nachgewiesen. Dies könnte darauf hindeuten, dass solche künstlich hergestellten Isolate eine andere Fitness als die natürlichen Isolate besitzen und nur in der Lage sind, anfällige Genotypen zu infizieren. Weitere Diskussionspunkte zur Untersuchung der Fitness von BNYVV-Isolaten finden sich in Manuskript 1. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass es weitere Bereiche im Virusgenom gibt, die für die Resistenzüberwindung verantwortlich sind und eine veränderte Aggressivität nicht auf den Austausch nur eines Nukleotids zurückzuführen ist. Dies zeigten SCHIRMER et al. (2005) durch die Berechnung des „ $\omega$ -value“ für weitere P25 Aminosäuren außerhalb der Tetrade, welche auf der RNA3 lokalisiert sind. Aufgrund der hohen berechneten Werte ( $> 1$ ) kann von einer starken positiven Selektion ausgegangen werden. Die Voraussetzung einer Infektion ist jedoch die Interaktion der viralen Proteine innerhalb einer Zelle. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die RNAs der verwendeten Isolate nicht zueinander passen. Weiterhin können eine zu geringe Konzentration vorhandener Viruspartikel, sowie eine geringe Stabilität der durch *in vitro* Mutagenese erzeugten Isolate als weitere Ursachen für die geringen Virusgehalte in Betracht gezogen werden.

In einem weiteren Beladungsversuch wurden die resistenzüberwindenden Eigenschaften einer Mischung des B- und P-Typs überprüft, wie sie auch unter Bedingungen im Feld zu finden sind. Dabei kann es zu einem „reassortment“ kommen, sobald die Isolate eine Zelle gemeinsam infizieren (HULL, 2009). Durch PCR-Nachweis konnten B-Typ Isolate identifiziert werden, die eine fünfte RNA besitzen, welche sonst nur beim P-Typ und einigen J-Typen auftritt (Bornemann und Varrelmann, unveröffentlichte Ergebnisse). In diesem Zusammenhang wurde nicht überprüft, ob sich eines der beiden Isolate gegenüber dem anderen durchsetzt und ob es tatsächlich zu einem Austausch genetischer Information kommt.

BSBV sowie BVQ werden wie BNYVV durch *P. betae* auf den Wirt übertragen, sie zählen jedoch anders als BNYVV zu den Pomoviren. In einem weiteren Beladungsversuch sollte gezeigt werden, ob auch diese Viren sich auf eine natürliche *P. betae*-Population übertragen lassen. Als Kontrolle dienten BNYVV-infizierte Pflanzen, sowie Pflanzen, die mit BNYVV und BSBV oder BVQ infiziert worden waren. Nach dem kreuzklassifizierten Resistenztest konnten keine Virusgehalte in den Seitenwurzeln gemessen werden. Die Kontrollen zeigten die erwarteten Ergebnisse, wobei in Mischinfektion nur BNYVV nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise erfordert eine Infektion mit BSBV oder BVQ andere Inokulationsbedingungen als eine BNYVV-Infektion, weshalb eine Infektion ausblieb. Als eine Ursache könnte darüber hinaus eine zu geringe Langlebigkeit des Virus im Ausgangsinokulum in Betracht gezogen werden, da bereits nach der mechanischen Inokulation keine Infektion nachgewiesen werden konnte. Bisher können keine Aussagen darüber getroffen werden, ob sich andere Viren auf eine *P. betae*-Population übertragen lassen, die diesen als Vektor besitzen. Dazu zählen BOLV und BSBMV, von denen eine Interaktion mit BNYVV bekannt ist (MAHMOOD und RUSH, 1999; LIU und LEWELLEN, 2008). Dies müsste in weiteren Arbeiten überprüft werden. Es bleibt zu überprüfen, ob sich eine Vektorbeladung auch auf *P. graminis* anwenden lässt, der wichtige Getreideviren wie das BaYMV oder das *Rice necrosis mosaic virus* (RNMV) überträgt, um unterschiedliche Virusisolate unter gleichen Bedingungen im Hinblick auf deren Aggressivität miteinander vergleichen zu können.

Die Methode der *P. betae*-Beladung wurde weiterhin dazu verwendet, die Ausbreitung von BNYVV in Zuckerrüben mittels einer Markierung mit fluoreszierendem Markerprotein zu verfolgen und mögliche Aussagen zur Replikation von BNYVV innerhalb des Vektors treffen zu können. Durch den Versuch sollten mögliche Erklärungsansätze zum *Rz*-Resistenzmechanismus aufgezeigt werden, wenn die Ausbreitung von BNYVV innerhalb der Wurzel besser verstanden wird. Dazu wurde das Gen des P26 auf der RNA5 eines P-Typ Isolates durch Klonierung durch das Gen des rot fluoreszierende Proteins DsRed ersetzt (CAMPBELL et al., 2002). Dies sollte die Verfolgung der Verbreitung nach Infektion von Seitenwurzeln mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie erleichtern. Die Wurzeln von Zuckerrüben zeigten jedoch unter dem Mikroskop eine starke Autofluoreszenz, so dass

eine Unterscheidung von den Viruspartikel-tragenden *P. betae*-Zoosporen nicht möglich war.

### **7.2 Standardisierung des Rizomania-Resistenztests im Gewächshaus**

BNYVV-Resistenztests werden im Gewächshaus bisher mit infizierten Feldböden durchgeführt. Je nach Umfang des Tests sind große Mengen einer möglichst homogenen Bodenmischung notwendig. Bei der Arbeit mit Böden, die durch unterschiedliche BNYVV-Typen infiziert sind, kann es zu Kontaminationen kommen. Mögliche Fehlerquellen sind beispielsweise unterschiedliche Umwelten in Gewächshäusern, wenn der Versuch an unterschiedlichen Standorten durchgeführt wird. Unter Umständen zeigen sich trotz homogener Bodenprobe Unterschiede in den Ergebnissen, wenn der Boden in mehreren Gewächshäusern/Umwelten verwendet wird. Dies konnte bei der Durchführung der in Kapitel 5 vorgestellten Versuche zur Identifizierung eines neuen resistenzüberwindenden BNYVV-Isolates in Europa beobachtet werden und stellt möglicherweise auch die Wiederholbarkeit der Versuche in Frage. Durch das Vorhandensein weiterer bodenbürtiger Pathogene kann es zu einer Einflussnahme auf *P. betae* oder BNYVV kommen. Nachteile zeigen sich weiterhin bei der Auswertung, da die Ergebnisse verschiedener Resistenztests sich nicht miteinander vergleichen lassen. Beispielsweise führt die Durchführung des ELISAs nach einem identischen Protokoll trotz der Verwendung der gleichen Virusreinigung und des gleichen Antiserums zu unterschiedlich hohen Absorptionen, so dass ein Vergleich der Ergebnisse nur relativ möglich ist (eigene Beobachtungen). Eine Standardisierung eines solchen Tests ist schwierig, wenn man Ergebnisse vergleichen oder wiederholen möchte, da die Verteilung der Viruspartikel-tragenden *P. betae*-Dauersporen im Boden sehr unterschiedlich sein kann. Dies gilt auch für Standorte von Feldversuchen, bei denen die ungleichmäßige Verteilung weitaus größer sein kann. Der in Manuskript 4 vorgestellte Resistenztest mit BNYVV-infizierten Haarwurzeln vereinfacht die Durchführung erheblich, da nur geringe Mengen definierten infizierten Wurzelmaterials notwendig sind, um einen Test mit vielen Wiederholungen durchzuführen. Das getrocknete Wurzelmaterial kann über längere Zeit bei kühlen Temperaturen aufbewahrt werden, um Tests zu wiederholen (die Überlebensfähigkeit von *P. betae* Cystosori liegt im Boden laut

ABE und TAMADA, 1986, bei bis zu 15 Jahren). Weiterhin lässt es sich gut per Post verschicken, wenn Versuche in Kooperation durchgeführt werden sollen. Zudem ist ein solcher Resistenztest leichter durchzuführen als eine Vektorbeladung (s.o.), die sehr zeitaufwändig ist und ebenfalls große Mengen an (virusfreiem) *P. betae*-infiziertem Feldboden benötigt. Das Auftreten bodenbürtiger Pathogene kann zwar nicht ausgeschlossen werden, wird jedoch deutlich durch die geringe eingesetzte Menge von Inokulum reduziert (eigene Beobachtungen). Bei der Durchführung von Resistenztests mit Haarwurzel-Inokulum führt die Wahl der Zuckerrüben-Genotypen gegebenenfalls zu anderen Ergebnissen, da zwar das Inokulum definiert wird, jedoch bei der Herstellung eine Selektion aus der vorhandenen Population im Boden stattfindet. Die Zuckerrüben-Genotypen müssen daher mit Bedacht, und an die jeweilige Versuchs-Fragestellung angepasst, ausgewählt werden. Die Problematik der unterschiedlichen Umweltbedingungen an unterschiedlichen Standorten und der Auswertbarkeit der ELISA-Ergebnisse bleibt jedoch auch hier bestehen.

### **7.3. Einfluss der Temperatur auf die BNYVV-Gehalte in Blatt und Wurzeln von Zuckerrüben**

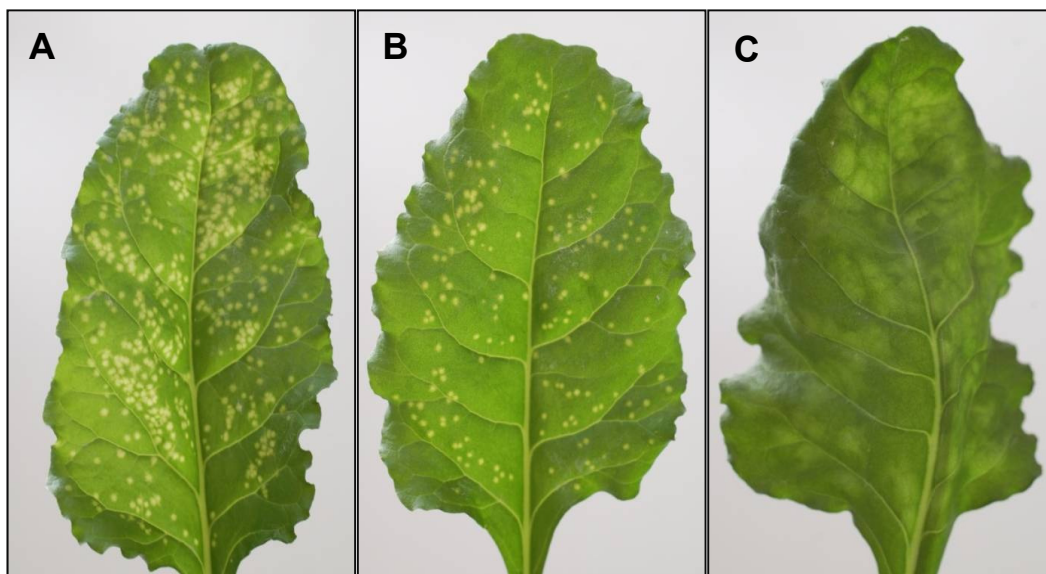
Das Auftreten von resistenzüberwindenden BNYVV-Isolaten wurde bisher an klimatisch wärmeren Standorten in den USA und Spanien beobachtet. Um den Einfluss der Temperatur auf das Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten sowie einer Vermehrung und Ausbreitung von BNYVV innerhalb der Pflanze zu untersuchen, wurden Blätter anfälliger und resistenter Zuckerrüben-Genotypen mechanisch inokuliert und die Pflanzen bei unterschiedlichen Temperaturen (18, 24, 30°C) kultiviert. Der Versuch zeigte, dass eine Temperaturabhängigkeit bei der Ausprägung von Lokalläsionen besteht (Abb. 6). Bei 18°C und 24°C kam es zur Ausbildung von Lokalläsionen (Abb. 6A und 6B). Diese waren bei 18°C deutlich kleiner und in ihrer Ausbreitung begrenzt. Bei 30°C konnte sich BNYVV systemisch verbreiten und eine Ausbildung von Lokalläsionen war stark unterdrückt (Abb. 6C). Die höchsten Virusgehalte konnten sowohl beim anfälligen, als auch beim resistenten Genotyp bei 24°C nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der Einfluss des Genotyps konnte daher nicht beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass

die *Rz*-vermittelte BNYVV-Resistenz wurzelspezifisch ist. Durch die Ausbildung von Lokalläsionen im Blatt wird das Virus an seiner Ausbreitung gehindert, durch die (*Rz*-) unabhängige HR kommt es zur Pathogenabwehr (HAMMOND-KOSACK und JONES, 1997; CHIBA et al., 2008). Es bleibt jedoch bisher ungeklärt, ob es in den Wurzeln zu einer HR kommt.

Es gibt jedoch einen Einfluss unterschiedlicher Temperaturbedingungen auf die pflanzliche Resistenz innerhalb der Wurzeln gegenüber Rizomania. In Gewächshausversuchen konnte gezeigt werden, dass die Virusgehalte in Seitenwurzeln von anfälligen Zuckerrüben-Jungpflanzen nach mechanischer Wurzelinokulation und nach natürlicher Infektion im Feldboden bei 18°C am höchsten waren und mit zunehmender Temperatur abnahmen. In Wurzeln resistenter Zuckerrüben-Jungpflanzen wurden bei 24°C die höchsten Virusgehalte nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Es konnte demnach keinen Zusammenhang zwischen einer Blattresistenz und einer Wurzelresistenz in unterschiedlichen Zuckerrüben-Genotypen nachgewiesen werden. Unklar ist bisher ebenso die Form der Resistenz. Es wurde ein Temperatureffekt beobachtet, wodurch jedoch nicht auf den *Rz1*-Resistenzmechanismus geschlossen werden kann, da für verschiedenste Resistenzen eine Temperaturabhängigkeit gezeigt werden konnte (siehe auch Kapitel 1.4.3). Es sind mehrere Resistenzmechanismen bekannt (SOOSAAR et al., 2005), von denen der Mechanismus des „RNA silencing“ als temperaturabhängig beschrieben wurde. Es konnte weiterhin kein Zusammenhang zwischen erhöhten Virusgehalten und der Temperatur in einem resistenten Zuckerrüben-Genotyp gezeigt werden (Manuskript 2).

SOOSAAR et al. (2005) beschrieben in einem Übersichtsartikel die Mechanismen der pflanzlichen Resistenz gegenüber Viren. Dazu zählt neben der Resistenzgen-vermittelten Pathogenabwehr (HR) das „RNA silencing“. Für Pflanzen wurde das „post-transcriptional gene silencing“ (PTGS) als Abwehrmechanismus beschrieben (VAN DER KROL et al., 1990). Das Ziel dieses Mechanismus ist es, virale Nukleinsäure gezielt zu degradieren, um Replikation und Translation des Virus zu verhindern (WATERHOUSE et al., 2001). DUNOYER et al. (2002) konnten zeigen, dass auf der RNA2 des BNYVV das Protein P14 lokalisiert ist, welches das „RNA silencing“ unterdrücken kann. Dies wurde auch für das Protein P31 auf der RNA4 von RAHIM et al. (2007) gezeigt. SZITTYA et al. (2003) zeigten durch ihre Arbeiten an *N. benthamiana*, dass eine Infektion mit dem *Cymbidium ringspot*

*virus* (CymRSV) in Abhängigkeit von der Temperatur unterschiedliche Symptome an den Pflanzen verursacht, die bei Temperaturen von 27°C am geringsten ausgeprägt sind. Zudem wurde die größte Menge siRNAs mittels Northern Blot Hybridisierung bei 27°C-kultivierten Pflanzen nachgewiesen, was auf eine pflanzliche Abwehrreaktion durch „RNA silencing“ hindeutet. Die phänotypischen Beobachtungen konnten auch an anderen Kulturpflanzen beobachtet werden. Für das *Citrus psorosis virus* (CPSV) an Orange konnten VELÁSQUEZ et al. (2010) die in Abb. 6 gezeigten Beobachtungen an Zuckerrübe bestätigen. Dabei kommt es nach einer Virus-Infektion bei steigenden Temperaturen zu einer verbesserten Wirkung des „RNA silencing“ und demzufolge zur geringeren Symptommexpression an Blättern von Orangenbäumen. Ein Nachweis von siRNAs in Blättern und Wurzeln infizierter Zuckerrüben ist bisher nicht gelungen. Dies würde die phänotypischen Beobachtungen am Genotyp vermutlich belegen.



**Abb. 6:** Läsionsausbreitung zehn Tage nach mechanischer Blatt-Inokulation einer anfälligen Zuckerrüben-Sorte; Kultivierung bei unterschiedlichen Temperaturen (A = 18°C, B = 24°C, C = 30°C) unter standardisierten Gewächshausbedingungen. (Fotos: K. Bornemann)

### **7.4 Auftreten, Ausbreitung und Charakterisierung von resistenzüberwindenden BNYVV-Isolaten**

KIYOSAWA (1982) nennt im Allgemeinen für das Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten die folgenden Ursachen: (i) das Auftreten von Mutationen, (ii) Rekombinationsereignisse (iii) den großflächigen Anbau genetisch uniformen Materials und (iv) die Resistenz im Feld unter Einwirkung von Umweltbedingungen. Für das Auftreten von resistenzüberwindenden BNYVV-Isolaten sind besonders die Punkte (i), (iii) und (iv) zu berücksichtigen. Der Punkt (ii) wurde bisher nicht experimentell bewiesen. Nach der Erstbeschreibung von resistenzüberwindenden BNYVV-Isolaten in den USA durch LIU et al. (2005) und wenig später in Spanien (PFERDMENGES und VARRELMANN, 2008), wurden weitere Arbeiten zur Untersuchung der Verbreitung von BNYVV durchgeführt (SCHIRMER et al., 2005; KOENIG et al., 2008; PFERDMENGES et al., 2008; CHIBA et al. 2011). Es gibt mehrere Möglichkeiten der Verbreitung pflanzlicher Viren. Da in den Anbaugebieten der USA die Flächen überwiegend bewässert werden, ist davon auszugehen, dass sich die begeißelten *P. betae*-Zoosporen mit den Viruspartikeln über größere Distanzen verbreiten können (TUITERT und HOFMEESTER, 1992). Auch Erdanhang an landwirtschaftlichen Maschinen oder Tieren können als mögliche Verbreitungsquelle in Betracht gezogen werden. Der Einfluss der Winderosion und der damit verbundenen Verbreitung von virusinfizierten Bodenpartikeln, beispielsweise in den Wüsten Chinas, sollte nicht unterschätzt werden. In den Konkurrenzexperimenten, die in Manuskript 4 beschrieben sind, wird gezeigt, dass geringe Mengen infizierter Wurzeln ausreichen, um hohe Virusgehalte in den Wurzeln der Zuckerrüben zu verursachen. Vermutlich erfolgte eine Verbreitung ebenfalls über kontaminiertes Pflanzenmaterial (KOENIG et al., 2008). Über weitere Verbreitungsmöglichkeiten kann nur spekuliert werden. Der Fitness eines BNYVV-Isolates kommt dabei gewisse Bedeutung zu, da bisher unklar ist, wie eine Verbreitung erfolgt, wenn ein Feld bereits mit einem anderen Isolat infiziert ist. Wie in Manuskript 4 gezeigt, hängt dies auch vom Zuckerrüben-Genotyp ab.

Durch die Vermehrung und Ausbreitung von BNYVV in allen Zuckerrübenanbaugebieten weltweit und der damit verbundenen Anpassung des Pathogens an neue Umweltbedingungen, treten Neuselektionen an geographisch unabhängigen Orten



mit variabler Zusammensetzung des P25 auf. Durch den Anbau von Zuckerrüben-Genotypen, die das monogen dominant vererbte *RzI*-Resistenzgen tragen, kommt es zu einem erhöhten Selektionsdruck nach einer Infektion mit BNYVV. Dies beschrieben JANZAC et al. (2009) allgemein für alle Kulturen und teilten Pflanzenviren in Klassen ein, die nach der Dauerhaftigkeit der Resistenz geordnet sind. BNYVV wird dabei in die Klasse 1 eingeteilt, welche dem höchsten Risiko der Resistenzüberwindung entspricht. Dies führten JANZAC et al. (2009) auf die Korrelation zwischen Aminosäure-Austauschen und die Dauerhaftigkeit der Resistenz zurück. Die Dauerhaftigkeit kann jedoch aufgrund fehlender experimenteller Nachweise nur geschätzt werden. Durch die mehrfache Kultivierung von Zuckerrüben-Genotypen unter standardisierten Gewächshaus-Bedingungen können resistenzüberwindende Virus-Isolate möglicherweise selektiert werden, um den Selektionsdruck auf eine BNYVV-Population abschätzen zu können. Die Methode des „deep sequencing“, die in Manuskript 4 beschrieben ist, vereinfacht dies maßgeblich, da sich anreichernde Mutationen während einer Rotation nachgewiesen und funktionell charakterisiert werden können. Aussagen zur Dauerhaftigkeit der Resistenz unter natürlichen Bedingungen sind jedoch auch somit nicht möglich.

Mit Hilfe des „deep sequencing“ (Manuskript 4) konnte weiterhin gezeigt werden, dass der A-Typ die höchste Variabilität besitzt. Bereits CHIBA et al. (2011) haben durch die Berechnung des „ $\omega$ -value“ die hohe Diversität des A-Typs innerhalb des Pathogenitätsfaktors P25 belegt. Zum B-Typ konnten bisher keine resistenzüberwindenden Isolate zugeordnet werden. Der P-Typ tritt in der Region um Pithiviers südlich von Paris teilweise in Mischinfektionen auf. TAMADA et al. (1996b) und LINK et al. (2005) vermuteten dabei einen Synergismus zwischen P25 und P26. Zwischen beiden Proteinen konnten KOENIG et al. (1997) eine Sequenzhomologie mehrerer Aminosäuren („FRGPGN“) feststellen, die auf eine funktionelle Ähnlichkeit hindeutet. Obwohl der P-Typ deutlich höhere Virusgehalte in anfälligen Zuckerrüben-Genotypen verursachen kann (HEIJBROEK et al., 1999; PFERDMENGES et al., 2008), konnte er sich bisher nicht außerhalb der Region um Pithiviers verbreiten. Das Auftreten in England (HARJU et al., 2002; WARD et al., 2007) und Kasachstan (KOENIG und LENNEFORS, 2000) ist dabei vermutlich auf eine Verschleppung zurückzuführen, wie es auch für das Auftreten des A-Typs in Deutschland vermutet wird (siehe Manuskript 3). Der japanische J-Typ besitzt zwar wie der P-Typ eine fünfte RNA

(MIYANISHI et al., 1999), Beobachtungen über mögliche resistenzüberwindende Eigenschaften in Feldbeständen oder Gewächshausversuchen fehlen jedoch bisher trotz den gezeigten Eigenschaften des P-Typs (BORNEMANN und VARRELMANN, 2011). Bisher ist nicht davon auszugehen, dass der P-Typ durch *Rz1* selektiert wurde. Die Fitness einzelner Virus-Populationen kann durch Konkurrenzexperimente miteinander verglichen werden, jedoch nur in Abhängigkeit des Zuckerrüben-Genotyps. Weitere Faktoren wie die Vektorübertragung und Umweltbedingungen bleiben dabei unberücksichtigt.

ACOSTA-LEAL et al. (2010a) beschreiben einen Effekt des Wirtes auf die genetische Diversifizierung von Virus-Populationen. Es wurden Zuckerrüben-Genotypen mit unterschiedlichen Resistenzen gegenüber BNYVV verwendet und drei Mal hintereinander kultiviert. Sequenzuntersuchungen des P25 zeigten, dass die Diversität nach einer Infektion der *Rz2*-resistenten Pflanzen am höchsten ist und die Virusgehalte am niedrigsten. In anfälligen Pflanzen konnte das Gegenteil gezeigt werden. Es konnten hohe Virusgehalte nachgewiesen werden, die Diversität war jedoch im Vergleich zu anderen Genotypen gering. Es konnte gezeigt werden, dass in *Rz1*-resistenten Genotypen ein Valin an der Aminosäureposition 67 häufiger nachgewiesen wurde im Gegensatz zu anfälligen und *Rz2*-resistenten Genotypen, die ein Alanin an gleicher Position selektieren.

Um resistenzüberwindende Eigenschaften zu charakterisieren und resistenzüberwindende Isolate selektieren zu können, wurden in einem Gewächshausversuch Zuckerrüben-Genotypen unterschiedlicher Anfälligkeit gegenüber Rizomania, in infizierten Feldböden unterschiedlicher Herkunft für zwölf Wochen fünf Mal hintereinander kultiviert (insgesamt 60 Wochen). Es sollte gezeigt werden, dass unter experimentellen Bedingungen *Rz1*-resistente Genotypen ein Valin an der Aminosäure-Position 67 in einer Wildtyp-Population selektieren. Der Versuch wurde in Kooperation mit den Züchtern KWS Saat AG (Einbeck), Syngenta Seeds AB (Landskrona, Schweden), SESVanderHave (Tienen, Belgien), dem US Department of Agriculture in Fargo, North Dakota, sowie dem niederländischen Zuckerrübeninstitut (IRS) (Bergen op Zoom) und dem englischen Zuckerrüben-Forschungsinstitut in Broom's Barn durchgeführt. Der Versuchsaufbau war bei allen Kooperationspartnern identisch, die infizierten Feldböden wurden jedoch selbst ausgewählt. Als Referenzboden diente für jeden Versuch ein B-Typ infizierter Feldboden aus Bayern. Vom IfZ wurde ein A-Typ infizierter Feldboden aus

Rovigo (Italien) gewählt. In Vorversuchen zeigte BNYVV im Bereich der Tetrade eine hohe Variabilität, weshalb dieser Boden für den Versuch geeignet schien. Es wurden Zuckerrüben-Genotypen verwendet, die keine Resistenzen gegenüber Rizomania besitzen (*rz1rz1*), resistent (*Rz1rz1*) sind und hohe bzw. niedrige Virusgehalte nach einer Infektion aufweisen oder doppelt resistent sind (*Rz1+Rz2*). Die Ergebnisse entsprachen nach dem ersten Durchgang den Erwartungen (Daten nicht gezeigt). In den folgenden Durchgängen zeigte sich jedoch ein Rückgang der Virusgehalte in allen infizierten Varianten bei allen Versuchsteilnehmern. Es konnten zum Teil keine Virusgehalte im anfälligen Genotyp mehr nachgewiesen werden, sodass der Versuch beendet wurde. Aus dem A-Typ infizierten Feldboden aus Rovigo konnten nach dem fünften Durchgang wenige infizierte Wurzeln für weitere Sequenzuntersuchungen nach RNA-Extraktion und RT-PCR verwendet werden. Die Ergebnisse zeigten keine Selektion resistenzüberwindender Isolate. Es wurden lediglich die bereits in Vorversuchen identifizierten Tetradenzusammensetzungen erneut nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Ursache für die zurückgehenden Virusgehalte in allen Varianten könnte auf eine Vermehrung von *P. betae* zurückzuführen sein. Vermutlich kommt es zu einer Anreicherung der Population im Feldboden durch optimale Umweltbedingungen, die WEBB et al. (2000) in ihrer Arbeit beschreiben (s.o.), und dem erneuten Anbau von Zuckerrüben-Jungpflanzen und vermutlich im Folgenden zu einer Hemmung, weshalb keine Übertragung von Viruspartikeln auf die Seitenwurzeln mehr stattfindet. Der Versuch wird zukünftig erneut von zwei Projektpartnern durchgeführt, der Versuchsaufbau wird jedoch dahingehend geändert, dass die Wurzeln infizierter Pflanzen als Inokulum für Pflanzen in der folgenden Rotation dienen, Das Auftreten von bodenbürtigen Pathogenen soll somit reduziert werden und die Anreicherung von *P. betae* im Boden minimiert werden.

### **7.5 Zukünftige Bedeutung von Rizomania und mögliche Kontrollstrategien**

Vor dem Hintergrund immer häufiger auftretender resistenzüberwindender Isolate an verschiedenen geografischen Orten, stellt sich die Frage nach der Dauerhaftigkeit der *Rz*-Resistenz. Resistenzüberwindende Isolate reichern sich beim Anbau *Rz1*-resistenter Zuckerrüben-Genotypen an (siehe Manuskript 4), sofern sie in der Ausgangspopulation

vorhanden bzw. durch zufällige Mutationen entstanden sind, und könnten die vorhandene Population in *Rz1*-resistenten Genotypen verdrängen. Bisher konnten lediglich Varianten mittels „deep sequencing“ in einer Probe nachgewiesen werden, die mit einer Häufigkeit von weniger als einem Prozent auftraten. Da der Mechanismus der Resistenz bis zu diesem Zeitpunkt nicht verstanden wurde, scheint es für die Züchter schwierig, die bisherige Resistenz zu verbessern. Sorten mit einer Kombination aus zwei Resistenzgenen (*Rz1+Rz2*) scheinen derzeit eine Kontrolle der Resistenz darzustellen (siehe Manuskript 1). Das „target“ der *Rz2*-Resistenz ist bislang unbekannt. Ein möglicher Einfluss der *Rz2*-Resistenz auf die Zusammensetzung von P25 und insbesondere der Aminosäure-Positionen 67-70, sowie weiterer Gene, wurde noch nicht überprüft. Dies könnte jedoch mit Hilfe des „deep sequencing“ untersucht werden. Die *Rz1*-Resistenz blieb über einen Zeitraum von etwa 20 Jahren stabil. Sollte die *Rz2*-Resistenz ein abweichendes „target“ besitzen, müsste BNYVV an zwei unterschiedlichen Aminosäure-Positionen mutieren, um doppelte Resistenzen (*Rz1+Rz2*) zu überwinden. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen Ereignisses scheint jedoch relativ gering, zumal Mutationen mit Fitnessverlusten verbunden sein können (BORNEMANN und VARRELMANN, 2013). Ziel der Züchtungsunternehmen sollte es sein, weitere Resistenzgene zu identifizieren, die einen Anbau von leistungsfähigen Zuckerrüben-Genotypen dauerhaft garantieren, da eine auf gentechnischer Veränderung basierende Resistenz bisher keine Akzeptanz seitens der Verbraucher findet. Die von LENNEFORS et al. (2006, 2008) hergestellten transgenen Zuckerrüben besitzen eine dsRNA-vermittelte Resistenz, die auf dem Mechanismus des „RNA silencing“ beruht. Im Vergleich zu *Rz1rz1+Rz2rz2* doppelt-resistenten Zuckerrüben-Genotypen zeigten diese Pflanzen sowohl in Feld-, wie auch in Gewächshausversuchen geringere Virusgehalte in den Seitenwurzeln. Eine frühere Arbeit zeigte, dass eine Hüllprotein-vermittelte transgene Resistenz ebenso zu geringeren Virusgehalten in Zuckerrüben führt (MANNERLÖF et al., 1996). Die Frage nach der Dauerhaftigkeit dieser Resistenz bleibt unbeantwortet. Es wird ein anderer Selektionsdruck auf das Virus ausgeübt, so dass eine erneute Anpassung an den Wirt nicht ausgeschlossen werden kann. MARTÍNEZ et al. (2012) konnten zeigen, dass die Dauerhaftigkeit von „hairpin“-vermittelter Resistenz an *Arabidopsis thaliana* gegenüber dem *Tulip mosaic virus* (TuMV) eingeschränkt sein kann, da die „target“-Sequenz des „RNA-silencing“ unter Selektionsdruck steht. Die Sequenz wurde mittels „deep

sequencing” an infizierten resistenten und anfälligen Pflanzen analysiert und eine hohe Variation an Sequenzvarianten identifiziert.

Es bleiben weitere offene Fragen, die bei der Sortenzulassung bisher nicht berücksichtigt wurden. Unter standardisierten Gewächshausbedingungen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die für den Landwirt verfügbaren Zuckerrüben-Sorten BNYVV unterschiedlich vermehren (Varrelmann, unveröffentlichte Ergebnisse). Dies wurde bisher unter den Bedingungen im Feld nicht geprüft. Es können keine Aussagen darüber getroffen werden, ob bei den Sorten, die das Virus stark vermehren, von einer kürzeren Dauer der Resistenz in Zusammenhang mit hohen Populationsdichten im Boden ausgegangen werden muss. Für eine Sortenzulassung durch das Bundessortenamt wird nur der Ertrag unter Befall überprüft, jedoch nicht das Potential einer Sorte, das Virus zu vermehren.

Neben einer Resistenz gegenüber der Infektion mit BNYVV wurde auch eine Resistenzzüchtung gegenüber *P. betae* experimentell untersucht (PAUL et al., 1992; BARR et al., 1995). Auf diese Weise könnte eine Infektion mit anderen Viren wie BVQ, BSBV und BSBMV verhindert und möglicherweise die Dauerhaftigkeit der Rizomania-Resistenz in Kombination mit der Rz-Resistenz verlängert werden (MCGRANN et al., 2009). BARR et al. (1995) konnten durch mikroskopische Untersuchungen zeigen, dass *P. betae*-Zoosporen nicht in die Wurzeln von *B. patellaris* oder *B. procumbens* eindringen konnten. Die Autoren spekulierten, dass der Resistenzmechanismus auf einer HR basiert, welche die Entwicklung des Plasmodiums hemmt. PAUL et al. (1992) zeigten anhand von Viruskonzentrationen in Seitenwurzeln die Resistenz von *Beta*-Arten gegenüber *P. betae* auf. Da eine natürliche Resistenz gegenüber *P. betae* vor allem in Wild-Typen der Gattung *Beta* zu finden ist (VAN GEYT et al., 1988), verhindern jedoch bisher Rückkreuzungsbarrieren in *B. procumbens*, wie sie bereits von SAVITSKY (1975) für die Resistenz gegenüber *Heterodera schachtii* beschrieben wurden, eine wirtschaftlich sinnvolle Nutzung der *P. betae*-Resistenz (VAN GEYT et al., 1990).

ROOSSINCK (1997) geht davon aus, dass die Verbreitung und das Auftreten pflanzlicher Viren in Zukunft, bedingt durch den Klimawandel, sowie eine fortschreitende Globalisierung, in den nächsten Jahren zunehmen werden. Zukünftig sollte weiterhin als Ziel ein besseres Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktion verfolgt werden, um die Zusammenhänge der Mechanismen der Resistenz sowie der Dauerhaftigkeit der Resistenz

## 7. Diskussion

---

besser verstehen zu können. Weitere Untersuchungen zur Populationsdynamik, auch in Kombination mit anderen Viren, sind hierzu notwendig. Ein vermehrtes Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten muss weiterhin beobachtet werden, um mögliche Rückschlüsse auf die Auswirkungen auf den gesamten Zuckerrübenanbau ziehen zu können und hohe Erträge zu sichern.

### 8. Zusammenfassung

Das *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) verursacht die Viröse Wurzelbärtigkeit (Rizomania) an Zuckerrüben und tritt weltweit in allen Anbauregionen auf. Die Übertragung des Virus auf die Seitenwurzeln von Zuckerrüben erfolgt durch den bodenbürtigen Protisten *Polymyxa betae*. Typische Symptome sind die Ausprägung eines Wurzelbartes, eine Verbräunung der Leitbündel sowie eine aufrechte Stellung der Blätter. Eine Infektion kann zu hohen Ertrags- und Zuckerverlusten führen. Eine Kontrolle der Krankheit ist zurzeit nur durch eine Verwendung von Zuckerrüben-Genotypen möglich, die das monogen vererbte *Rz1*-Resistenzgen tragen. Dabei wird die Virusreplikation an den Seitenwurzeln reduziert und eine Ausbreitung in die Pfahlwurzel verhindert. Das Virus kann unter anderem aufgrund geringer Sequenzunterschiede im Bereich des Hüllproteins auf der RNA2 des Virus in verschiedene Typen (A, B, P und J) eingeteilt werden. Als Pathogenitätsfaktor wurde das 25kDa große Protein P25 auf der RNA3 identifiziert.

In den letzten Jahren traten vermehrt aggressive Virus-Isolate auf, die neben den bekannten Symptomen hohe Virusgehalte in den Wurzeln resistenter Zuckerrüben-Genotypen verursachen können. Durch die damit verbundenen Ertragsverluste hat die Krankheit seitdem wieder an Bedeutung gewonnen. Vermutlich kam es zu einem erhöhten Selektionsdruck und dem vermehrten Auftreten von Punktmutationen im Bereich des Pathogenitätsfaktors P25. Diese Mutationen führten besonders im Bereich der Aminosäuretetrade aa67-70 zu hoher Variabilität. Bestimmte Aminosäureaustausche sind demnach verantwortlich für eine erhöhte Aggressivität des Virus.

Bisher blieb die Frage ungeklärt, ob der Vektor *P. betae* einen Einfluss auf das Auftreten resistenzüberwindender Isolate nimmt. In einem Gewächshausversuch wurde eine natürliche *P. betae*-Population in einem virusfreien Feldboden mit verschiedenen resistenzüberwindenden Isolaten künstlich beladen und deren Eigenschaften in einem sich anschließenden kreuzklassifizierten Resistenztest verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass der Vektor keinen Einfluss auf die resistenzüberwindenden Eigenschaften von BNYVV-Isolaten nimmt.

## 8. Zusammenfassung

---

Durch die globale Erwärmung ist zukünftig zu erwarten, dass sich die Infektionsbedingungen für den Vektor durch steigende Bodentemperaturen und ausreichendem Niederschlag verbessern werden. Um die Auswirkungen einer globalen Erwärmung im Zusammenhang mit dem Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten in Deutschland zu untersuchen, wurde ein Gefäßversuch unter Freilandbedingungen mit einem in Deutschland vorkommenden B-Typ infizierten Feldboden durchgeführt. Der Boden in den Gefäßen wurde über eine Heizmatte erwärmt und die Temperatur im Vergleich zum unbeheizten Referenzboden variabel eingestellt. In mehreren Durchgängen wurden anfällige und *Rz1*-resistente Zuckerrüben-Genotypen bei gleicher Versuchsdauer, jedoch unterschiedlicher Bodentemperatur bzw. Temperaturdifferenzen zum Referenzboden getestet. Dabei konnten keine erhöhten Virusgehalte in Wurzeln resistenter Zuckerrüben festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei einer geringen Erhöhung der Bodentemperatur nicht von einem Auftreten resistenzüberwindender Isolate in Deutschland auszugehen ist.

Die bislang aufgetretenen resistenzüberwindenden A-Typ Isolate zeigten ein Valin an der ersten Stelle der hypervariablen Aminosäure-Tetrad aa67-70 des Pathogenitätsfaktors P25. In England, den Niederlanden und Deutschland wurde aus Feldern mit Rizomania-Symptomen in *Rz1*-Sorten ein A-Typ mit einer abweichenden Tetradenzusammensetzung identifiziert. Dieses Isolat wurde in Resistenztests unter Gewächshausbedingungen als resistenzüberwindend charakterisiert und zeigte auch nach einer Vektorbeladung resistenzüberwindende Eigenschaften. In Feldversuchen in den Niederlanden und Deutschland traten die typischen Rizomania-Symptome auf.

Es wurde beobachtet, dass *Rz1*-resistente Zuckerrüben nach der Beladung von *P. betae* mit resistenzüberwindenden Isolaten höhere Virusgehalte aufwiesen als anfällige Zuckerrüben. Diese Isolate unterliegen demnach einem Fitness- bzw. Selektionsnachteil. Aufgrund dessen sollte anhand von Konkurrenzexperimenten im Gewächshaus gezeigt werden, dass sich resistenzüberwindende Isolate gegenüber gewöhnlichen A- und B-Typ Isolaten in resistenten Zuckerrüben-Genotypen durchsetzen. Mit Hilfe der Hochdurchsatzsequenzierung konnte dies belegt werden.



## 8. Zusammenfassung

---

Ungeklärt bleibt weiterhin der Einfluss weiterer Pathogene. Der Einfluss des Zuckerrüben-Genotyps auf das Auftreten resistenzüberwindender Virus-Isolate sollte in Zukunft, besonders aus der Sicht der Züchtung, stärker berücksichtigt werden.

## 9. Literaturverzeichnis

1. Abe H., Tamada T. (1986). Association of *beet necrotic yellow vein virus* with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. *Annual Phytopathological Society Japan* 52, 235-247.
2. Acosta-Leal R., Fawley M.W., Rush C.M. (2008). Changes in the inraisolate genetic structure of *Beet necrotic yellow vein virus* populations associated with plant resistance breakdown. *Virology* 376, 60-68.
3. Acosta-Leal R., Bryan K.B., Smith J.T., Rush C.M. (2010a). Breakdown of host resistance by independent evolutionary lineages of *Beet necrotic yellow vein virus* involves a parallel C/U mutation in its p25 gene. *Phytopathology* 100, 127-133.
4. Acosta-Leal R., Bryan B.K., Rush C.M. (2010b). Host effect on the genetic diversification of *Beet necrotic yellow vein virus* single-plant populations. *Phytopathology* 100, 1204-1212.
5. Adams M.J., Antoniw J.F., Mullins J.G.L. (2001). Plant virus transmission by plasmodiophorid fungi is associated with distinctive transmembrane regions of virus-encoded proteins. *Archives of Virology* 146, 1139-1153.
6. Agrios G.N. (2005). *Plant Pathology*. 5th edition, Elsevier Academic Press, San Diego.
7. Ali M.A. (1950). Genetics of resistance to the common bean mosaic virus (bean virus 1) in the bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Phytopathology* 40, 69-79.
8. Allen M.R., Gillett N.P., Kettleborough J.A., Hegerl G., Schnur R., Stott P.A., Boer G., Covey C., Delworth T.L., Jones G.S., Mitchell J.F.B., Barnett T.P. (2006). Quantifying anthropogenic influence on recent near-surface temperature change. *Surveys in Geophysics* 27, 491-544.
9. Allison I., Bindoff N.L., Bindschadler R.A., Cox P.M., de Noblet N., England M.H., Francis J.E., Gruber N., Haywood A.M., Karoly D.J., Kaser G., Le Quéré C., Lenton T.M., Mann M.E., McNeil B.I., Pitman A.J., Rahmstorf S., Rignot E., Schellnhuber H.J., Schneider S.H., Sherwood S.C., Somerville R.C.J., Steffen K.,

- Steig E.J., Visbeck M., Weaver, A.J. (2009). The Copenhagen Diagnosis. Updating the world on the latest climate science. The University of New South Wales Climate Change Research Centre (CCRC), Sydney, Australia.
10. Amiri R., Moghaddam M., Mesbah M., Sadeghian S.Y., Ghannadha M.R., Izadpanah K. (2003). The inheritance of resistance to Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *B. vulgaris* subsp. *maritima*, accession WB42: Statistical comparisons with Holly-1-4. *Euphytica* 132, 363-373.
  11. Andika I.B., Kondo H., Nishiguchi M., Tamada T. (2012). The cysteine-rich proteins of beet necrotic yellow vein virus and tobacco rattle virus contribute to efficient suppression of silencing in roots. *Journal of General Virology*, 1841-1850.
  12. Aramburo J., Galipienso L., Soler S., López C. (2010). Characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates that overcome the Sw-5 resistance gene in tomato and fitness assays. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 342-351.
  13. Balmori E., Gilmer D., Richards K., Guilley H., Jonard G. (1993). Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on beet necrotic yellow vein virus RNA3. *Biochimie* 75, 517-521.
  14. Barbarossa L., Vetten H.J., Kaufmann A., Lesemann D.-E., Koenig R. (1992). Monoclonal antibodies to beet soil-borne virus. *Annals of Applied Biology* 121, 143-150.
  15. Barker H., Dale M.F.B. (2006). Resistance to viruses in potato. In: Loebenstein G., Carr J.P. (2006). Natural resistance mechanisms of plants to viruses. Springer Verlag, Dordrecht, NL.
  16. Barr, K.J., Asher M.J.C., Lewis B.G. (1995). Resistance to *Polymyxa betae* in wild *Beta* species. *Plant Pathology* 44, 301-307.
  17. Baulcombe D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
  18. Baulcombe D. (2005). RNA silencing. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 290-293.
  19. Bergstrom C.T., McElhany P., Real L.A. (1999). Transmission bottlenecks as determinants of virulence in rapidly evolving pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 5095-5100.
  20. Biancardi E., Lewellen R.T., De Biaggi M., Erichsen A.W., Stevanato P. (2002). The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica* 127, 383-397.

21. Blunt S.J., Asher M.J.C., Gilligan C.A. (1991). Infection of sugar beet by *Polymyxa betae* in relation to soil temperature. *Plant Pathology* 40, 257-267.
22. Boland G.J., Melzer M.S., Hopkin A., Higgins V., Nassuth A. (2004). Climate change and plant diseases in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26, 335-350.
23. Bornemann K., Varrelmann M. (2011). Analysis of the resistance-breaking ability of different *Beet necrotic yellow vein virus* isolates loaded into a single *Polymyxa betae* population in soil. *Phytopathology* 101, 718-724.
24. Bouzoubaa S., Quillet L., Guilley H., Jonard G., Richards K. (1987). Nucleotide sequence of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA1. *Journal of General Virology* 68, 615-626.
25. Bouzoubaa S., Niesbach-Klösgen U., Jupin I., Guilley H., Richards K., Jonard G. (1991). Shortened forms of beet necrotic yellow vein virus RNA-3 and -4: internal deletions and a subgenomic RNA. *Journal of General Virology* 72, 259-266.
26. Bruening G. (2006). Resistance to infection. In: Loebenstein G., Carr J.P. (2006). Natural resistance mechanisms of plants to viruses. Springer Verlag, Dordrecht, NL.
27. Bundessortenamt (2011). Beschreibende Sortenliste.  
<http://www.bundessortenamt.de/internet30/index.php?id=164>, abgerufen am 17.4.12.
28. Campbell R.E., Tour O., Palmer A.E., Steinbach P.A., Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 7877-7882.
29. Canova A. (1959). Appunti di patologia della barbabietola. *Informatore Fitopatologico* 20, 390-396.
30. Carrasco P., de la Iglesia F., Elena S.F. (2007). Distribution of fitness and virulence effects caused by single-nucleotide substitutions in *Tobacco etch virus*. *Journal of Virology* 81, 12979-12984.
31. Chao L. (1990). Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* 348, 454-455.

32. Chellappan P., Vanitharani R., Ogbe F., Fauquet C. M. (2005). Effect of temperature on Geminivirus-induced RNA silencing in plants. *Plant Physiology* 138, 1828-1841.
33. Chiba S., Miyanishi M., Andika I.B., Kondo H., Tamada T. (2008). Identification of amino acids of the *beet necrotic yellow vein virus* p25 protein required for induction of the resistance response in leaves of *Beta vulgaris* plants. *Journal of General Virology* 89, 1314-1323.
34. Chiba S., Kondo H., Miyanishi M., Andika I. B., Han C., Tamada T. (2011). The evolutionary history of *Beet necrotic yellow vein virus* deduced from genetic variation, geographical origin and spread, and the breaking of host resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24, 207-218.
35. Clarke D.K., Duarte E.A., Moya A., Elena S.F., Domingo E., Holland J. (1993). Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. *Journal of Virology* 67, 222-228.
36. Clarke D.K., Duarte E.A., Elena S.F., Moya A., Domingo E., Holland J. (1994). The red queen reigns in the kingdom of RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91, 4821-4824.
37. Cline W.R. (2007). Global warming and agriculture: Impact estimates by country. Peterson Institute for International Economics. <http://www.iie.com>, abgerufen am 16.1.2012
38. Coakley S.M., Scherm H., Chakraborty S. (1999). Climate change and plant disease management. *Annual Review of Phytopathology* 37, 399-426.
39. Collmer C.W., Fisher Marston M., Taylor J.C., Jahn M. (2000). The I gene of bean: A dosage-dependent allele conferring extreme resistance, hypersensitive resistance, or spreading vascular necrosis in response to the Potyvirus Bean common mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 1266-1270.
40. Cooper J.I., Jones A.T. (1983). Responses of plants to viruses: Proposals for the use of terms. *Phytopathology* 73, 127-128.
41. Crutzen C., Mehrvar M., Gilmer D., Bragard C. (2009). A full-length infectious clone of beet soil-borne virus indicates the dispensability of the RNA-2 for virus

- survival *in planta* and symptom expression on *Chenopodium quinoa* leaves. *Journal of General Virology* 90, 3051-3056.
42. Desbiez C., Gal-On A., Girard M., Wipf-Scheibel C., Lecoq H. (2003). Increase in *Zucchini yellow mosaic virus* symptom severity in tolerant zucchini cultivars is related to a point mutation in P3 protein and is associated with a loss of relative fitness on susceptible plants. *Phytopathology* 93, 1478-1484.
  43. Díaz J., Nieto C., Moriones E., Truniger V., Aranda M. (2004). Molecular characterization of a *Melon necrotic spot virus* strain that overcomes the resistance in melon and nonhost plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 668-675.
  44. Domingo E., Holland J.J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology* 51, 151-78.
  45. Drake J.W., Charlesworth B., Charlesworth D., Crow J.F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148, 1667-1686.
  46. Drake J.W., Holland J.J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 13910-13913.
  47. Dubois F., Sangwan R.S., Sangwan-Norreel B.S. (1994). Spread of beet necrotic yellow vein virus infected seedlings and plants of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Protoplasma* 179, 72-82.
  48. Duffy S., Shackelton L.A., Holmes E.C. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews* 9, 267-276.
  49. Dunoyer P., Pfeffer S., Fritsch C., Hemmer O., Voinnet O., Richards K.E. (2002). Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by *Peanut clump virus*. *The Plant Journal* 29, 555-567.
  50. Eigen M., Schuster P. (1977). The Hypercycle: a principle of natural selforganization. Part A: emergence of the hypercycle. *Die Naturwissenschaften* 64, 541-565.
  51. Eigen M., Schuster P. (1978). The hypercycle: a principle of natural selforganization. Part B: the abstract hypercycle. *Die Naturwissenschaften* 65, 7-41.

52. Elena S.F. (2002). Restrictions to RNA virus adaptation: An experimental approach. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 135-142.
53. Eurostat (2012). Agrarstatistiken. <http://epp.eurostat.ec.europa.eu>, abgerufen am 19.1.12
54. Fabre F., Rousseau E., Mailleret L., Moury B. (2012). Durable strategies to deploy plant resistance in agricultural landscapes. *New Phytologist* 193, 1064-1075.
55. Filipowicz W., Jaskiewicz L., Kolb F.A., Pillai R.S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology* 15, 331-341.
56. Fraser R.S.S. (1990). The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 28, 179-200.
57. Fraser R.S.S. (1992). The genetics of plant-virus interactions: implications for plant breeding. *Euphytica* 63, 175-185.
58. Garcia-Arenal F., Fraile A., Malpica J.M. (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* 39, 157-186.
59. Garcia-Arenal F., Fraile A., Malpica J.M. (2003). Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology* 6, 225-232.
60. García-Arenal F., McDonald B.A. (2003). An analysis of durability of resistance to plant viruses. *Phytopathology* 93, 941-952.
61. Gidner S., Lennefors B.L., Nilsson N.O., Bensefelt J., Johansson E., Gyllenspetz U., Kraft T. (2005). QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. *Genome* 48, 279-285.
62. Gilmer D., Bouzoubaa S., Hehn A., Guilley H., Richards K., Jonard G. (1992). Efficient cell-to-cell movement of *Beet necrotic yellow vein virus* requires 3' proximal genes located on RNA2. *Virology* 189, 40-47.
63. Giunchedi L., Poggi-Pollini C. (1988). Immunogold-silver localization of *beet necrotic yellow vein virus* antigen in susceptible and moderately resistant sugar beets. *Phytopathologia Mediterranea* 27, 1-6.
64. González-Vázquez M., Ayala J., García-Arenal F., Fraile A. (2009). Occurrence of *Beet black scorch virus* infecting sugar beet in Europe. *Plant Disease* 93, 21-24.

65. Grimmer M.K., Trybush S., Hanley S., Francis S.A., Karp A., Asher M.J.C. (2007). An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus*. *Theoretical and Applied Genetics* 114, 1151-1160.
66. Haeberlé A.M., Stussi-Garaud C., Schmitt C., Garaud J.C., Richards K.E., Guilley H., Jonard G. (1994). Detection by immunogold labelling of P75 readthrough protein near an extremity of *Beet necrotic yellow vein virus* particles. *Archives of Virology* 134, 195-203.
67. Hamilton A.J., Baulcombe D.C. (1999). A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
68. Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G. (1997). Plant disease resistance genes. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 575-607.
69. Harju V.A., Mumford R.A., Bockley A., Boonham N., Clover G.R.G. (2002). Occurrence in the United Kingdom of beet necrotic yellow vein virus isolates which contain RNA5. *Plant Pathology* 51, 811.
70. Harrison B.D. (2002). Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica* 124, 181-192.
71. Heidel G.B., Rush C.M., Kendall T.L., Lommel S.A., French R.C. (1997). Characteristics of beet soilborne mosaic virus, a furo-like virus infecting sugar beet. *Plant Disease* 81, 1070-1076.
72. Heijbroek W., Musters P.M.S., Schoone A.H.L. (1999). Variation in pathogenicity and multiplication of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in relation to the resistance of sugar-beet cultivars. *European Journal of Plant Pathology* 105, 397-405.
73. Hoffmann G.M., Nienhaus F., Poehling H.-M., Schönbeck F., Weltzien H.C., Wilbert H. (1994). Lehrbuch der Phytomedizin. 3. Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH, Berlin.
74. Holland J.J., de la Torre, J.C., Clarke D.K., Duarte E. (1991). Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *Journal of Virology* 65, 2960-2967.



75. Holland J.J., Domingo E. (1998). Origin and evolution of viruses. *Virus Genes* 16, 13-21.
76. Hull R. (2002). *Matthews' Plant Virology*. 4th edition, Elsevier Academic Press, San Diego, London u.a..
77. Hull R. (2009). *Comparative Plant Virology*. 2nd edition, Elsevier Academic Press, San Diego, London u.a..
78. IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (2000). Special Report on Emissions Scenarios. Cambridge University Press, Cambridge. <http://www.grida.no/climate/ipcc/emission/>, abgerufen am 23.1.12
79. IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (2007). Fourth Assessment Report of the IPCC. IPCC, Geneva, Switzerland.
80. Jacob D., Podzun R. (1997). Sensitivity studies with the regional climate model REMO. *Meteorology and Atmospheric Physics* 63, 119-129.
81. Jakubikova L., Subikova V., Nemcovic M., Farkas, V. (2006). Selection of natural isolates of *Trichoderma* spp. for biocontrol of *Polymyxa betae* as a vector of virus causing rhizomania in sugar beet. *Biologia* 61, 347-351.
82. Janzac B., Fabre F., Palloix A., Moury B. (2009). Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. *Molecular Plant Pathology* 10, 599-610.
83. Janzac B., Montarry J., Palloix A., Navaud O., Moury B. (2010). A point mutation in the polymerase of *Potato virus Y* confers virulence toward the *pvr4* resistance of pepper and a high competitiveness cost in susceptible cultivar. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 823-830.
84. Jenner C.E., Wang X., Ponz F., Walsh J.A. (2002). A fitness cost for *Turnip mosaic virus* to overcome host resistance. *Virus Research* 86, 1-6.
85. Johansson E. (1985). Rhizomania in sugar beet - a threat to beet growing that can be overcome by plant breeding. *Sveriges Utsädesförenings Tidskrift* 95, 115-121.
86. Johnson R. (1981). Durable resistance: Definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology* 71, 567-568.
87. Johnson R. (1984). A critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 22, 309-30.

88. Jones P. D., Lister D.H., Jaggard K.W., Pidgeon J.D. (2003). Future climate impact on the productivity of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) in Europe. *Climatic Change* 58, 93-108.
89. Jones R.A.C. (2009). Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Research* 141, 113-130.
90. Jupin I., Guilley H., Richards K.E., Jonard G. (1992). Two proteins encoded by *Beet necrotic yellow vein virus* RNA3 influence symptom phenotype on leaves. *The EMBO Journal* 11, 479-488.
91. Juroszek P., von Tiedemann A. (2011). Potential strategies and future requirements for plant disease management under a changing climate. *Plant Pathology* 60, 100-112.
92. Kalantidis K., Psaradakis S., Tabler M., Tsagris M. (2002). The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 826-833.
93. Keskin B. (1964). *Polymyxa betae* n.sp., ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. *Archiv für Mikrobiologie* 49, 218-226.
94. Kiguchi T., Saito M., Tamada T. (1996). Nucleotide sequence analysis of RNA5 of five isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* and the identity of a deletion mutant. *Journal of General Virology* 77, 575-580.
95. Kimura M. (1983). The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, New York.
96. Kiyosawa S. (1982). Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 20, 93-117.
97. Koenig, R., Burgermeister, W., Weich, H., Sebald, W., Kothe, C. (1986). Uniform RNA patterns of beet necrotic yellow vein virus in sugarbeet roots, but not in leaves from several plant species. *Journal of General Virology* 67, 2043-2046.
98. Koenig R., Stein B. (1990). Distribution of Beet necrotic yellow vein virus in mechanically inoculated sugarbeet plantlets of cultivars with different degrees of

- rhizomania resistance. Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, 1. Auflage. *Proceedings of the First Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, Braunschweig, Germany, 87-90.
101. Koenig R., Jarausch W., Li Y., Commandeur U., Burgermeister W., Gehrke M., Lüddecke P. (1991). Effect of recombinant Beet necrotic yellow vein virus with different RNA compositions on mechanically inoculated sugar beets. *Journal of General Virology* 72, 2243-2246.
102. Koenig R., Lüddecke P., Haeblerlé A.M. (1995). Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-stranded conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *Journal of General Virology* 76, 2051-2055.
103. Koenig R., Haeblerlé A.M., Commandeur U. (1997). Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA5 in a sugar beet growing area in Europe. *Archives of Virology* 142, 1499-1504.
104. Koenig R., Lennefors B.L. (2000). Molecular analyses of European A, B and P type sources of *Beet necrotic yellow vein virus* and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Archives of Virology* 145, 1561-1570.
105. Koenig R. (2000). Deletions in the KTER-encoding domain, which is needed for *Polymyxa* transmission, in manually transmitted isolates of *Beet necrotic yellow vein benyvirus*. *Archives of Virology* 145, 165-170.
106. Koenig R., Valizadeh J. (2008). Molecular and serological characterization of an Iranian isolate of *Beet black scorch virus*. *Archives of Virology* 153, 1397-1400.
107. Koenig R., Kastirr U., Holtschulte B., Deml G., Varrelmann M. (2008). Distribution of various types and P25 subtypes of *Beet necrotic yellow vein virus* in Germany and other European countries. *Archives of Virology* 153, 2139-2144.
108. Koenig R., Loss S., Specht J., Varrelmann M., Lüddecke P., Deml G. (2009). A single U/C nucleotide substitution changing alanine to valine in the *Beet necrotic yellow vein virus* P25 protein promotes increased virus accumulation in roots of mechanically inoculated, partially resistant sugar beet seedlings. *Journal of General Virology* 90, 759-763.

109. Kralovic J., Kralovic V. (1996). Relations among rhizomania disease, root content of potassium, sodium, amino nitrogen and crop yield of sugar beet. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 103, 561-570.
110. Kruse M., Koenig R., Hoffmann A., Kaufmann A., Commandeur U. (1994). Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of Beet necrotic yellow vein virus. *Journal of General Virology* 75, 1835-1842.
111. Kutluk Yilmaz N.D., Meunier A., Schmit J.F., Stas A., Bragard C. (2007). Partial nucleotide sequence analysis of Turkish isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) RNA-3. *Plant Pathology* 56, 311-316.
112. Kutluk Yilmaz N.D., Sokmen M., Gulser C., Saracoglu S., Yilmaz D. (2010). Relationships between soil properties and soilborne viruses transmitted by *Polymyxa betae* Keskin in sugar beet fields. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8, 766-769.
113. Lai M.M.C. (1992). RNA Recombination in animal and plant viruses. *Microbiological Reviews* 56, 61-79.
114. Lauber E., Guilley H., Tamada T., Richards K.E., Jonard G. (1998). Vascular movement of *Beet necrotic yellow vein virus* in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA3 sequence domain rather than a gene product. *Journal of General Virology* 79, 385-393.
115. Leach J.E., Vera Cruz C.M., Bai J., Leung H. (2001). Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* 39, 187-224.
116. Lean J.L., Rind D.H. (2008). How natural and anthropogenic influences alter global and regional surface temperatures: 1889 to 2006. *Geophysical Research Letters* 35, L18701.
117. Lee L., Telford E.B., Batten J.S., Scholtkof K.-B.G., Rush C.M. (2001). Complete nucleotide sequence and genome organization of *Beet soilborne mosaic virus*, a proposed member of the genus Benyvirus. *Archives of Virology* 146, 2443-2453.
118. Legg J.P., Thresh J.M. (2000). Cassava mosaic virus disease in East Africa: a dynamic disease in a changing environment. *Virus Research* 71, 135-149.

119. Lennefors B.L., Lindsten K., Koenig R. (2000). First record of A and B type *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beets in Sweden. *European Journal of Plant Pathology* 106, 199-201.
120. Lennefors B.L., Savenkov E.I., Bensefelt J., Wremmerth-Weich E., van Roggen P., Tuveesson S., Valkonen J.P.T., Gielen J. (2006). dsRNA-mediated resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*). *Molecular Breeding* 18, 313-325.
121. Lennefors B.L., van Roggen P.M., Yndgaard F., Savenkov E.I., Valkonen J.P. (2008). Efficient dsRNA-mediated transgenic resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beets is not affected by other soilborne and aphid-transmitted viruses. *Transgenic Research* 17, 219-228.
122. Lesemann D.-E., Koenig R., Lindsten K., Henry C. (1989). Serotypes of beet soilborne furovirus from FRG and Sweden. *EPPO Bulletin* 19, 539-540.
123. Lewellen R.T., Skoyen I.O., Erichsen A.W. (1987). Breeding sugar beet for resistance to rhizomania: Evaluation of host-plant reactions and selection for and inheritance. *Proceedings of the 50<sup>th</sup> IIRB Congress*, Brussels, Belgium, 139-156.
124. Link D., Schmidlin L., Schirmer A., Klein E., Erhardt M., Geldreich A., Lemaire O., Gilmer D. (2005). Functional characterization of the *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-5-encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants. *Journal of General Virology* 86, 2115-2125.
125. Liu H.-Y., Sears J.L., Lewellen R.T. (2005). Occurrence of resistance-breaking *Beet necrotic yellow vein virus* of sugar beet. *Plant Disease* 89, 464-468.
126. Liu H.-Y., Lewellen R.T. (2007). Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* in the United States. *Plant Disease* 91, 847-851.
127. Liu H.-Y., Lewellen R.T. (2008). Suppression of resistance-breaking *Beet necrotic yellow vein virus* isolates by Beet oak-leaf virus in sugar beet. *Plant Disease* 92, 1043-1047.
128. Mahmood T., Rush C.M. (1999). Evidence of cross-protection between beet soilborne virus and beet necrotic yellow vein virus in sugar beet. *Plant Disease* 83, 521-526.

129. Mannerlöf M., Lennefors B.L., Tenning P. (1996). Reduced titer of BNYVV in transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein. *Euphytica* 90, 293-299.
130. Maracchi G., Sirotenko O., Bindi M. (2005). Impacts of present and future climate variability on agriculture and forestry in the temperate regions: Europe. *Climatic Change* 70, 117-135.
131. Martínez F., Lafforgue G., Morelli M.J., Gonzáles-Candelas F., Chua N.-H., Darós, J.-A., Elena S.F. (2012) Ultradeep sequencing analysis of population dynamics of virus escape mutants in RNAi-mediated resistant plants. *Molecular Biology and Evolution* 29, 3297-3307.
132. McDonald B.A., Linde C. (2002). The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* 124, 163-180.
133. McGrann G.R.D., Grimmer M.K., Mutasa-Göttgens E.S., Stevens M. (2009). Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. *Molecular Plant Pathology* 10, 129-141.
134. Meinshausen M., Meinshausen N., Hare W., Raper S.C.B., Frieler K., Knutti R., Frame D.J., Allen M.R. (2009). Greenhouse-gas emission targets for limiting global warming to 2°C. *Nature* 458, 1158-1163.
135. Menzel A., Estrella N., Fabian P. (2001). Spatial and temporal variability of the phenological seasons in Germany from 1951 to 1996. *Global Change Biology* 7, 657-666.
136. Meshi T., Motoyoshi F., Maeda T., Yoshiwoka S., Watanabe H., Okada Y. (1989). Mutations in the tobacco mosaic virus 30-kD protein gene overcome *Tm-2* resistance in tomato. *Plant Cell* 1, 515-522.
137. Meunier A., Schmit J.F., Stas A., Kutluk N., Bragard C. (2003). Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet soilborne virus*, and *Beet virus Q* and their vector *Polymyxa betae* Keskin on sugar beet. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2356-2360.
138. Miranda G.J., Azzam O., Shirako Y. (2000). Comparison of nucleotide sequences between northern and southern Philippine isolates of Rice grassy stunt virus indicates occurrence of natural genetic reassortment. *Virology* 266, 26-32.

139. Miyanishi M., Kusume T., Saito M., Tamada T. (1999). Evidence for three groups of sequence variants of beet necrotic yellow vein virus RNA 5. *Archives of Virology* 144, 879-892.
140. Mouhanna A.M., Langen G., Schlösser E. (2008). Weeds as alternative hosts for BSBV, BNYVV, and the vector *Polymyxa betae* (German isolates). *Journal of Plant Diseases and Protection* 115, 193-198.
141. Muller H.J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research* 1, 2-9.
142. Nagy P.D., Simon A.E. (1997). New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* 235, 1-9.
143. Nielsen S.L., Nicolaisen M., Scheel C., Dinesen I.G. (2001). First record of beet necrotic yellow vein virus in Denmark. *Plant Disease* 85, 559.
144. Niesbach-Klosgen U., Guilley H., Jonard G., Richards K. (1990). Immunodetection in vivo of Beet necrotic yellow vein virus encoded proteins. *Virology* 178, 52-61.
145. Novella I.S., Elena S.F., Moya A., Domingo E., Holland J.J. (1995). Size of genetic bottlenecks leading to virus fitness loss is determined by mean initial population fitness. *Journal of Virology* 69, 2869-2872.
146. Oerke E.-C., Dehne H.-W. (2004). Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection* 23, 275-285.
147. Palloix A., Ayme V., Moury B. (2009). Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist* 183, 190-199.
148. Parry M.L., Rosenzweig C., Iglesias A., Livermore M., Fischer G. (2004). Effects of climate change on global food production under SRES emissions and socio-economic scenarios. *Global Environmental Change* 14, 53-67.
149. Paul H., Henken B., De Bock T.S.M., Lange W. (1992). Resistance to *Polymyxa betae* in *Beta* species of the section *Procumbentes*, in hybrids with *B. vulgaris* and in monosomic chromosome additions of *B. procumbens* in *B. vulgaris*. *Plant Breeding* 109, 265-273.

150. Paul H., Henken B., Scholten O.E., Lange W. (1993). Use of zoospores of *Polymyxa betae* in screening beet seedlings for resistance to beet necrotic yellow vein virus. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 99, Supplement 3, 151-160.
151. Pelham J., Fletcher J.T., Hawkins J.H. (1970). The establishment of a new strain of tobacco mosaic virus resulting from the use of resistant varieties of tomato. *Annals of Applied Biology* 65, 293-297.
152. Peltier C., Hleibieh K., Thiel H., Klein E., Bragard C., Gilmer D. (2008). Molecular biology of the *Beet necrotic yellow vein virus*. *Plant Viruses* 2, 14-24.
153. Peltier C., Klein E., Hleibieh K., D'Alonzo M., Hammann, P., Bouzoubaa, S., Ratti, C., Gilmer, D. (2012). Beet necrotic yellow vein virus subgenomic RNA3 is a cleavage product leading to stable non-coding RNA required for long-distance movement. *Journal of General Virology* 93, 1093-1102.
154. Pitesky M.E., Stackhouse K.R., Mitloehner F.M. (2009). Clearing the air: Livestock's contribution to climate change. *Advances in Agronomy* 103, 1-40.
155. Pferdmenges F., Korf H., Varrelmann M. (2008). Identification of rhizomania-infected soil in Europe able to overcome *Rz1* resistance in sugar beet and comparison with other resistance-breaking soils from different geographic origins. *European Journal of Plant Pathology* 124, 31-43.
156. Pferdmenges F., Varrelmann M. (2008). Breaking of *Beet necrotic yellow vein virus* resistance in sugar beet is independent of virus and vector inoculum densities. *European Journal of Plant Pathology* 124, 231-245.
157. Putz C. (1977). Composition and structure of Beet necrotic yellow vein virus. *Journal of General Virology* 35, 397-401.
158. Qu F., Ye X., Hou G., Sato S., Clemente T.E., Morris T. J. (2005). RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Virology* 79, 15209-15217.
159. Rahim M.D., Andika I.A., Han C., Kondo H., Tamada T. (2007). RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *Journal of General Virology* 88, 1611-1619.



160. Rahmstorf S., Schellnhuber H.J. (2006). Der Klimawandel. 2. Auflage. Verlag C.H. Beck, München.
161. Ratti C., Clover G.R.G., Autonell C.R., Harju V.A., Henry C.M. (2004). A multiplex RT-PCR assay capable of distinguishing beet necrotic yellow vein virus types A and B. *Journal of Virological Methods* 124, 41-47.
162. Redondo E., Krause-Sakate R., Yang S.-J., Lot H., Le Gall O., Candresse T. (2001). *Lettuce mosaic virus* pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 804-810.
163. Richard-Molard M. (1985). Beet rhizomania disease-the problem in Europe. *Report of the 1984 British Crop Protection Conference – Pests and Diseases*, 837-845.
164. Richards K., Tamada T. (1992). Mapping functions on the multipartite genome of Beet necrotic yellow vein virus. *Annual Review of Phytopathology* 30, 291-313.
165. Roossinck M.J. (1997). Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology* 35, 191-209.
166. Roossinck M.J. (2005). Symbiosis versus competition in plant virus evolution. *Nature Reviews* 3, 917-924.
167. Roossinck M.J. (2011). Changes in population dynamics in mutualistic *versus* pathogenic viruses. *Viruses* 3, 12-19.
168. Rush C.M., Heidel G. (1995). *Furovirus* diseases of sugar beets in the United States. *Plant Disease* 79, 868-875.
169. Rush C.M. (2003). Ecology and epidemiology of benyviruses and plasmodiophorid vectors. *Annual Reviews of Phytopathology* 41, 567-592.
170. Rush C.M., Liu H.-Y., Lewellen R.T., Acosta-Leal R. (2006). The continuing saga of Rhizomania of sugar beets in the United States. *Plant Disease* 90, 4-15.
171. Saito M., Kiguchi T., Kusume T., Tamada T. (1996). Complete nucleotide sequence of the Japanese isolate S of Beet necrotic yellow vein virus RNA and comparison with European isolates. *Archives of Virology* 141, 2163-2175.
172. Samuel G. (1931). Some experiments on inoculating methods with plant viruses and on local lesions. *Annals of Applied Biologists* 18, 494-507.

173. Savitsky H. (1975). Hybridization between *Beta vulgaris* and *Beta procumbens* and transmission of nematode (*Heterodera schachtii*) resistance to sugarbeet. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 17, 197-209.
174. Schaller M., Weigel H.-J. (2007). Analyse des Sachstands zu Auswirkungen von Klimaveränderungen auf die deutsche Landwirtschaft und Maßnahmen zur Anpassung. *Landbauforschung Völkenrode - FAL Agricultural Research*, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Sonderheft 316.
175. Schirmer A., Link D., Cognat V., Moury B., Beuve M., Meunier A., Bragard C., Gilmer D., Lemaire O. (2005). Phylogenetic analysis of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* collected worldwide. *Journal of General Virology* 86, 2897-2911.
176. Schneider W.L., Roossinck M. (2001). Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *Journal of Virology* 75, 6566-6571.
177. Scholten O.E., Paul H., Peters D., Van Lent J.W., Goldbach R.W. (1994). In situ localisation of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in rootlets of susceptible and resistant beet plants. *Archives of Virology* 136, 349-361.
178. Scholten O.E., Jansen R.C., Keizer L.C.P., De Bock T.S.M., Lange W. (1996). Major genes for resistance to Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta vulgaris*. *Euphytica* 91, 331-339.
179. Scholten O.E., De Bock T.S.M., Klein-Lankhorst R.M., Lange W. (1999). Inheritance of resistance to Beet necrotic yellow vein virus in *Beta vulgaris*, conferred by a second gene for resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 99, 740-746.
180. Schuster P. (1998). Künstliche Evolution - Von der Theorie zur Erzeugung neuer Biomoleküle mit vorherbestimmbaren Eigenschaften. Vortrag gehalten am 20.09.1998 vor der 120.Versammlung der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte.
181. Simon A.E., Bujarski J.J. (1994). RNA-RNA recombination and evolution in virus-infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 32, 337-362.
182. Soosaar J.L.M., Burch-Smith T.M, Dinesh-Kumar S.P. (2005). Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews* 3, 789-798.

183. Szittyá G., Silhavy D., Molnár A., Havelda Z., Lovas A., Lakatos L., Bánfalvi Z., Burgyán J. (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defense by the control of siRNA generation. *The EMBO Journal* 22, 633-640.
184. Tamada T., Baba T. (1973). Beet necrotic yellow vein virus from Rhizomania affected sugar beet in Japan. *Annual Phytopathological Society Japan* 39, 325-332.
185. Tamada T., Abe H. (1989). Evidence that Beet necrotic yellow vein virus RNA-4 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *Journal of General Virology* 70, 3391-3398.
186. Tamada T., Abe H., Saito M., Kiguchi T., Harada T. (1989). Production and pathogenicity of isolates of Beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *Journal of General Virology* 70, 3399-3409.
187. Tamada T., Kusume T. (1991). Evidence that the 75K readthrough protein of beet necrotic yellow vein virus RNA-2 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *Journal of General Virology* 72, 1497-1504.
188. Tamada T., Schmitt C., Saito M., Guilley H., Richards K. (1996a). High resolution analysis of the readthrough domain of Beet necrotic yellow vein virus readthrough protein: a KTER motif is important for efficient transmission of the virus by *Polymyxa betae*. *Journal of General Virology* 77, 1359-1367.
189. Tamada T., Kusume T., Uchino H., Kiguchi T., Saito M. (1996b). Evidence that Beet necrotic yellow vein virus RNA-5 is involved in symptom development of sugar-beet roots. In J. L. Sherwood & C. M. Rush (Eds.). *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, Dundee, Scotland, 49-52.
190. Tamada T. (1999). Benyvirus. In: Granoff A., Webster R. (1999). *Encyclopedia of Virology*. Academic Press, New York, 154-160.
191. Tamada T., Uchino H., Kusume T., Saito M. (1999). RNA 3 deletion mutants of Beet necrotic yellow vein virus do not cause Rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology* 89, 1000-1006.
192. Thiel H., Varrelmann M. (2009). Identification of *Beet necrotic yellow vein virus* P25 pathogenicity factor – interacting sugar beet proteins that represent putative

- virus targets or components of plant resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 999-1010.
193. Thiel H., Hleibieh K., Gilmer D., Varrelmann M. (2012). The P25 pathogenicity factor of *Beet necrotic yellow vein virus* targets the sugar beet 26S proteasome involved in the induction of a hypersensitive resistance response via interaction with an F-box protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 1058-1072.
194. Tuitert G. (1990). Assessment of the inoculum potential of *Polymyxa betae* and beet necrotic yellow vein virus in soil using the most probable number method. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 96, 331-341.
195. Tuitert G., Hofmeester Y., (1992). Epidemiology of beet necrotic yellow vein virus in sugar beet at different initial inoculum levels in the presence or absence of irrigation: Dynamics of inoculum. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98, 343-360.
196. Tuitert G., Bollen G.J. (1993). Recovery of resting spores of *Polymyxa betae* from soil and the influence of duration of the bioassay on the detection level of beet necrotic yellow vein virus in soil. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 99 (Suppl 3): 219-230.
197. UNFCCC (1998). Das Kyoto-Protokoll.  
<http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpger.pdf>, abgerufen am 26.1.12
198. Varrelmann M. (2007). Vorkommen, Ausbreitung und Pathogenität verschiedener Formen des Rizomaniavirus (BNYVV), *Sugar Industry/Zuckerindustrie* 132, 113-120.
199. Van den Bosch F., Gilligan C.A. (2003). Measures of durability of resistance. *Phytopathology* 93, 616-625.
200. Van der Krol A.R., Mur L.A., Beld M., Mol J.N.M., Stuitje A.R. (1990). Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant Cell* 2, 291-299.
201. Van Geyt J.P.C., Oleo M., Lange W., De Bock T.S.M. (1988). Monosomic additions in beet (*Beta vulgaris*) carrying extra chromosomes of *Beta procumbens*. *Theoretical and Applied Genetics* 76, 577-586.

202. Van Geyt J.P.C., Lange W., Oleo M., De Bock T.S.M. (1990). Natural variation within the genus *Beta* and its possible use for breeding sugar beet: A review. *Euphytica* 49, 57-76.
203. Verchot-Lubicz J., Rush C.M., Payton M., Colberg T. (2007). *Beet necrotic yellow vein virus* accumulates inside resting spores and zoosporangia of its vector *Polymyxa betae* BNYVV infects *P. betae*. *Virology Journal* 4, 37-46.
204. Velázquez K., Renovell A., Comellasa M., Serra P., García M. L., Pina J. A., Navarro L., Moreno P., Guerri J. (2010). Effect of temperature on RNA silencing of a negative-stranded RNA plant virus: *Citrus psorosis virus*. *Plant Pathology* 59, 982-990.
205. Vetter G., Hily J.-M., Klein E., Schmidlin L., Haas M., Merkle T., Gilmer D. (2004). Nucleo-cytoplasmatic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA3-encoded P25 protein. *Journal of General Virology* 85, 2459-2469.
206. Voinnet O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics* 6, 206-220.
207. Ward L., Koenig R., Budge G., Garrido C., McGrath C., Stubbley H., Boonham N. (2007). Occurrence of two different types of RNA-5-containing Beet necrotic yellow vein virus in the UK. *Archives of Virology* 152, 59-73.
208. Waterhouse P.M., Wang M.-B., Lough T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834-842.
209. Webb C.R., Gilligan C.A., Asher M.J.C. (2000). Modelling the effect of temperature on the development of *Polymyxa betae*. *Plant Pathology* 49, 600-607.
210. Whitney E.D. (1989). Identification, distribution, and testing for resistance to rhizomania in *Beta maritima*. *Plant Disease* 73, 287-290.
211. Wirtschaftliche Vereinigung Zucker (2012). Zuckermarkt – Anbau und Erzeugung. [www.zuckerwirtschaft.de](http://www.zuckerwirtschaft.de), abgerufen am 19.1.12
212. Wisler G.C., Liu H.-Y., Duffus J.E. (1994). Beet necrotic yellow vein virus and its relationship to eight sugar beet furo-like viruses from the United States. *Plant Disease* 78, 995-1001.

## 9. Literaturverzeichnis

---

213. Wisler G.C., Lewellen R.T., Sears J.L., Wasson J.W., Liu H.Y., Wintermantel W.M. (2003). Interactions between *Beet necrotic yellow vein virus* and *Beet soilborne mosaic virus* in sugar beet. *Plant Disease* 87, 1170-1175.
214. Yang Z., Nielsen R., Goldman N., Pedersen A.M.K. (2000). Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics* 155, 431-449.

## Publikationen und Vorträge

### Artikel in Tagungsbänden und Zeitschriften

1. Bornemann, K. and Varrelmann, M. (2011) Analysis of the resistance-breaking ability of different *Beet necrotic yellow vein virus* isolates loaded into a single *Polymyxa betae* population in soil. *Phytopathology* 101, pp. 718-724.  
DOI: 10.1094/PHYTO-06-10-0157
2. Behn, A., Bornemann, K., Varrelmann, M. (2011) Werden Rübenkrankheiten aggressiver? *DLZ Agrarmagazin* 3, pp. 78-81.
3. Bornemann, K. und Thiel, H. (2011) Faktoren der Stabilität von Rizomaniaresistenz in Zuckerrüben. *Zuckerindustrie*, Sonderheft zur 10. Göttinger Zuckerrübentagung, 136, pp. 21-30.
4. Bornemann, K., Hanse, B., Varrelmann, M., Stevens, M. (2012) Occurrence of resistance-breaking strains of *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet in Northern Europe and the identification of a new variant of the viral pathogenicity factor P25.  
*will be submitted to Plant Pathology*
5. Bornemann, K. and Varrelmann, M. (2012) Evidence for the Influence of the Sugar Beet Genotype on the Variability of *Beet necrotic yellow vein virus* Pathogenicity factor P25 and Fitness Penalty of Resistance-Breaking Mutations.  
*will be submitted to Journal of Virology*

### Vorträge

1. Bornemann, K. and Varrelmann, M. (2010) Variability of BNYVV in soils after growing sugar beet hybrids with different resistance traits. IIRB BNYVV variability meeting am 15. Januar 2010 am Institut für Zuckerrübenforschung, Göttingen.
2. Bornemann, K. und Varrelmann, M. (2010) Beladung von *Polymyxa betae* mit verschiedenen Isolaten des Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) und Analyse

- der resistenzüberwindenden Eigenschaften. 42. Jahrestagung des DPG-AK “Viruskrankheiten der Pflanzen” am 11. und 12. März 2010 in Göttingen.
3. Bornemann, K. und Varrelmann, M. (2010) Beladung von *Polymyxa betae* mit verschiedenen Isolaten des Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) und Analyse der resistenzüberwindenden Eigenschaften. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung vom 06. - 09. September 2010 in Berlin, Abstract: Julius-Kühn-Archiv 428, p. 335.
  4. Bornemann, K. und Varrelmann, M. (2011) Einfluss von Umweltfaktoren und pflanzlicher Resistenz auf die Rizomaniaresistenz in Zuckerrüben. 2. Wissenschaftliches Symposium „KLIFF Pflanzenproduktion” 2011 am 09. und 10. März in Göttingen.
  5. Bornemann, K. and Varrelmann, M. (2011) Analysis of the resistance-breaking ability of different *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) isolates loaded to a single *Polymyxa betae* population in soil. 8<sup>th</sup> Symposium of the International Working Group of Plant Viruses with ‘Fungal’ Vectors vom 06. - 08. Juli 2011 in Louvain-la-Neuve (B).
  6. Bornemann, K. (2011) Faktoren der Stabilität von Rizomaniaresistenz in Zuckerrüben. 10. Göttinger Zuckerrübentagung am 01. September 2011 in Göttingen.
  7. Bornemann, K. and Varrelmann, M. (2011) Analysis of the resistance breaking ability of different beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) isolates loaded to a single *Polymyxa betae* population in soil. IIRB joint study group meeting ‘Pests & Diseases’ and ‘Seed Quality & Testing’ vom 07. - 09. September in Broom’s Barn, Rothamsted (GB).
  8. Bornemann, K., Hanse, B., Varrelmann, M., Stevens M. (2012) Auftreten von resistenzüberwindenden Isolaten des *Beet necrotic yellow vein virus* in Zuckerrüben in Nordeuropa und die Identifizierung einer neuen Zusammensetzung des viralen Pathogenitätsfaktors P25. 44. Jahrestagung des DPG-AK “Viruskrankheiten der Pflanzen” am 08. und 09. März 2012 in Quedlinburg.
  9. Bornemann, K. und Varrelmann, M. (2012) Analyse der Variabilität der pathogenitätsbestimmenden P25-Tetrad des Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) mittels „deep sequencing” – Konkurrenz von Varianten in Abhängigkeit



von Resistenzeigenschaften. 44. Jahrestagung des DPG-AK "Viruskrankheiten der Pflanzen" am 08. und 09. März 2012 in Quedlinburg.

10. Bornemann, K. and Varrelmann, M. (2012) Occurrence of resistance-breaking strains of *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet in Northern Europe and the identification of a new variant of the viral pathogenicity factor. International Advances in Plant Virology, 28. - 30. März 2012 in Dublin (IRL).

### Poster

1. Bornemann, K. and Varrelmann, M. (2009) The variability of Beet necrotic yellow vein virus P25 pathogenicity factor previously allocated to geographically distinct isolates can be retrieved in single representative A- and B-type soils. 5<sup>th</sup> joint meeting of the DPG working group „Viruskrankheiten der Pflanzen“ and the “Nederlandse Kring voor Plantevirologie”, 08. - 09. April 2009 in Hamburg.
2. Bornemann, K. und Varrelmann, M. (2010) Stabilität der Rizomania-Resistenz in Abhängigkeit von Umweltbedingungen. Erstes KLIFF Statusseminar, 10. - 11. Mai 2010 in Göttingen.
3. Bornemann, K. and Varrelmann, M. (2010) Analysis of the resistance breaking ability of different beet necrotic yellow vein virus isolates loaded to a single *Polymyxa betae* population in soil. International Advances in Plant Virology, 05. - 07. September 2010 in Arnheim (NL).
4. Bornemann, K. und Varrelmann, M. (2011) Stabilität der Rizomania-Resistenz in Abhängigkeit von Umweltbedingungen. 43. Jahrestagung des DPG-AK "Viruskrankheiten der Pflanzen", 31. März - 01. April 2011 in Braunschweig.
5. Bornemann, K. und Varrelmann, M. (2011) Stabilität der Rizomania-Resistenz in Abhängigkeit von Umweltbedingungen. Zweites KLIFF Statusseminar, 10. - 11. Mai 2011 in Göttingen.

### **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Mark Varrelmann für die Betreuung während der gesamten Promotionszeit. Die niemals ausgehenden Ideen zu neuen Experimenten und die Suche nach neuen Lösungsansätzen für diverse Probleme haben die Arbeit maßgeblich nach vorn gebracht.

Prof. Heiko Becker danke ich für die Übernahme der Zweitprüferschaft.

Prof. Bernward Märländer danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Zuckerrübenforschung promovieren zu können, sowie für die Übernahme der Drittprüferschaft.

Auch drei weiteren Personen gilt mein besonderer Dank, die mich während der Zeit besonders tatkräftig unterstützt haben. Dr. Heike Thiel hatte immer ein offenes Ohr für Fragen und Diskussionen. Ohne die Hilfe von Annette Walter wären viele Arbeiten im Gewächshaus nicht machbar gewesen. Helmut Korf hat mich bei der Laborarbeit unterstützt, gemeinsam haben wir etliche ELISA-Tests durchgeführt.

Ein großes Dankeschön muss ich außerdem meinem Kollegen Manfred Jordan aussprechen, der besonders bei dem Aufbau des Außenversuchs mit guten Ideen mitgewirkt hat.

Den vielen Auszubildenden und Hiwis möchte ich an dieser Stelle für die Hilfe bei der Ernte und Aufbereitung unzähliger Wurzelproben danken.

Mein Dank richtet sich auch an die weiteren Kollegen aus der Abteilung PM, unter anderem Dr. Christine Dirks, die immer gern bereit war Fragen zu beantworten und auch Christina Jung, die immer eine helfende Hand war.

Nicht zu vergessen ist die Abteilung Technik, die für ein reibungslos funktionierendes Gewächshaus gesorgt hat.

In Erinnerung bleiben werden mir die Mittagspausen und die jährliche Exkursion mit meinen Mitdoktoranden. Vielen Dank für zahlreiche (Fach-)Gespräche (besonders Eike und Philipp) und jede Menge Spaß. An das ein oder andere Gespräch auf dem Flur oder im Gewächshaus besonders mit den Kollegen Willi Hübener, Fritz Evers, Fabian Napp und Cord Buhre denke ich gern zurück.

Ein ganz großer Dank gilt auch meinen Eltern, die sich bei der Beschriftung von Snapbeuteln und dem Vorbereiten von Faltschachteln engagiert haben und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Dem Verlag Dr. Albert Bartens KG danke ich für die freundliche Druckgenehmigung des Rizomania-Artikels in der Zeitschrift "Zuckerindustrie/Sugar Industrie".

Einen ganz besonderen Dank möchte ich abschließend an das Niedersächsische Ministerium für Wissenschaft und Kultur für die finanzielle Unterstützung richten.

---

## CURRICULUM VITAE

**Kathrin Bornemann**  
Wiesenstraße 21  
37073 Göttingen  
Tel.: 0049 17662369379  
Email: kathrin\_bornemann@web.de

---

### Studium

#### **Februar 2009 - Juli 2012**

Promotionsstudium an der Georg-August-Universität Göttingen, Dissertation am Institut für Zuckerrübenforschung in der Abteilung Phytomedizin

#### **September 2007 - Januar 2009**

Masterstudium der Agrarwissenschaften in der Fachrichtung Nutzpflanzenwissenschaften, Abschluss des Studiums mit der Masterarbeit zum Thema „Versuche zur Beladung von *Polymyxa betae* mit verschiedenen Isolaten des *Beet necrotic yellow vein virus* und Selektion von resistenzüberwindenden Isolaten“ am Institut für Zuckerrübenforschung, Abteilung Phytomedizin

#### **Juli 2006**

Abschluss des Bachelorstudiums in der Fachrichtung Nutzpflanzenwissenschaften mit der Bachelorarbeit zum Thema „Nährstoffwechselwirkungen und deren Einfluss auf Kartoffelkrankheiten“ am Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung Qualität pflanzlicher Erzeugnisse

#### **Oktober 2003**

Beginn des Studiums der Agrarwissenschaften an der Georg-August-Universität in Göttingen

### Berufsausbildung

#### **Juli 2006 - Juli 2007**

Ausbildung im 3. Lehrjahr auf dem Betrieb der Dommaschk-Andresen GbR in Handewitt (Kreis Schleswig-Flensburg), Abschluss mit der Prüfung zur Landwirtin

#### **August 2004 - August 2005**

Praktikantenjahr auf dem Betrieb von S. Herbst in Gelliehausen, Landkreis Göttingen, Abschluss mit der Praktikantenprüfung, parallel Fortführung des Studiums im 3. und 4. Semester

## **Schulische Bildung**

### **1996 - 2003**

Besuch des Otto-Hahn Gymnasiums in Göttingen, Schulabschluss im Juli 2003 mit dem Abitur

## **Praktika**

### **Februar - März 2006**

Vierwöchiger Aufenthalt in Süd-Brasilien, Praktika auf verschiedenen landwirtschaftlichen Betrieben

### **August 2005**

Einwöchiges Praktikum bei der Landwirtschaftskammer Hannover, Pflanzenschutzamt Northeim

### **Februar - April 2004**

landwirtschaftliches Praktikum auf dem Betrieb von S. Herbst, Gelliehausen

## **außeruniversitäre Aktivitäten**

### **Oktober 2011 - heute**

ehrenamtliche Tätigkeit im Helfer-Team der BG Göttingen in der 1. Basketball-Bundesliga

### **Juni 2000 – heute**

Badeaufsicht in den Göttinger Schwimmbädern sowie an der Ostsee

### **März 2008**

Ausbilder-Eignungsprüfung der Landwirtschaftskammer Niedersachsen

## **Zusatzqualifikationen**

- Sprachkenntnisse in Englisch, Latein und Spanisch
- Sprachkurs an der Embassy CES School New York, Erwerb eines Zertifikats



