Industrielle Gemeinschaftsforschung

Schlussbericht vom 31.12.2022

zu IGF-Vorhaben Nr. 20798 N/1

Thema

Entwicklung und Anwendung eines neuen Testverfahrens zur Verbesserung der Resistenzselektion und des Resistenzmanagements gegenüber Rizomania an Zuckerrüben

Berichtszeitraum

01.09.2019 - 31.12.2022

Forschungsvereinigung

Gemeinschaft zur Förderung von Pflanzeninnovation e.V. - GFPi

Kaufmannstraße 71-73

53115 Bonn

Forschungseinrichtung(en)

Institut für Zuckerrübenforschung

Holtenser Landstraße 77

37079 Göttingen

Forschungsnetzwerk Mittelstand

Gefördert durch:

Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

1. Einleitung

Die Wirtschaftlichkeit des Zuckerrübenanbaus hängt entscheidend vom Ertrag und der Rohstoffqualität ab. Ertragsverluste, hervorgerufen durch Krankheitserreger, haben deshalb eine besondere Bedeutung. Hierzu gehört vor allem die Rizomania-Krankheit, die durch das bodenbürtige beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) verursacht wird. Infolge einer Virusinfektion bleiben die Rüben im Wachstum zurück und es entstehen erhebliche Ertragsverluste. Die Virusübertragung erfolgt durch den bodenbürtigen Protisten *Polymyxa betae* (Keskin, 1964). Dieser ist in der Lage, sich durch Zoosporen im Bodenwasser zu verbreiten und durch die Ausbildung von stabilen Dauersporen bis zu 20 Jahre im Boden zu überdauern. Daher ist eine Bekämpfung der Rizomania-Krankheit nur durch Resistenzeigenschaften der Sorte möglich. Die Holly Sugar Company (USA) entdeckte in den 80er Jahren die erste Resistenzquelle, die auf dem dominanten Resistenzgen *Rz1* basiert (Lewellen *et al.*, 1987; Scholten *et al.*, 1996). Durch die großflächige Einführung von *Rz1* resistenten Zuckerrübensorten konnte die Wirtschaftlichkeit des Zuckerrübenanbaus nach dem Auftreten der Rizomania-Krankheit gesichert werden. Später wurde noch ein zweites Resistenzgen (*Rz2*) aus der Wildrübe *Beta maritima* in Zuckerrübensorten eingekreuzt, welches die BNYVV Vermehrung verglichen mit *Rz1* noch stärker reduziert. Daher beruht heute die Bekämpfung der Rizomania-Krankheit hauptsächlich auf den beiden Resistenzgenen *Rz1* und *Rz2*.

Die langjährige Nutzung von *Rz1* als einzige Resistenzquelle hat einen starken Selektionsdruck auf die Viruspopulation ausgeübt, d.h. es wurden Virusvarianten mit resistenzüberwindenden Eigenschaften gegenüber *Rz1* selektiert. Das Auftreten solcher resistenzüberwindenden Virusvarianten konnte bereits in verschiedenen Regionen Europas und den USA nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2005; Liu & Lewellen, 2007; Acosta-Leal *et al.*, 2010; Bornemann & Varrelmann, 2011; Chiba *et al.*, 2011). Die Resistenzüberwindung wird hierbei durch Mutationen an den Aminosäurepositionen 67-70 (Tetrade) des Pathogenitätsfaktors P25 vermittelt. Mittlerweile konnten mehr als 30 Tetraden-Varianten identifiziert werden, jedoch sind für die meisten Varianten die Resistenz brechenden Eigenschaften nicht bekannt. Des Weiteren besitzen einige Populationen eine zusätzliche RNA Komponente (RNA5), die ebenfalls bei der Resistenzüberwindung eine Rolle spielen soll (Tamada *et al.*, 2021). Generell muss davon ausgegangen werden, dass sich die Resistenz überwindenden Eigenschaften in den Viruspopulationen langsam anreichert und erst nach mehrmaligem Zuckerrübenanbau sichtbar wird. Daher kann nur durch eine gezielte Untersuchung der Viruspopulation eine Aussage darüber getroffen werden.

Die Sortenwahl ist die derzeit einzige wirkungsvolle Maßnahme, um auf einen Befall mit Rizomania zu reagieren. Auf Grund der begrenzten Verfügbarkeit von natürlichen Resistenzquellen, muss die Wirksamkeit der vorhandenen pflanzlichen Resistenzeigenschaften möglichst lange erhalten bleiben, um weiterhin ertragsstarke Zuckerrübensorten zur Verfügung zu haben und den züchterischen Fortschritt zu sichern. Für die Zuckerrübenzüchter ist eine Früherkennung der Anpassung der viralen Population notwendig, um Untersuchungen auf Resistenzstabilität und Screening von neuen Resistenzquellen durchführen zu können. Eine genaue Kenntnis über die Resistenzüberwindung bei Rizomania ist ebenso für den Landwirt entscheidend, um im Rahmen eines geeigneten Resistenzmanagements eine Standort angepasste Sortenwahl zu treffen. Dies erfordert ein Testsystem mit dessen Hilfe schnell und eindeutig eine Resistenztestung gegenüber Rizomania durchgeführt werden kann. Auf Grund der

Bodenbürtigkeit des Rizomaniavirus werden in bisherigen Resistenztestungen alle Arbeiten mit Feldpopulationen mit natürlichen Bodenproben durchgeführt. Pflanzliche Bioteste unter Gewächshausbedingungen sind sehr aufwändig und die dafür notwendigen Bodenproben sind endlich und benötigen umfangreiche Lagerkapazitäten. Die heterogene Verteilung des Vektors im Boden verschlechtert die Versuchs-Präzision, da die Viruspopulationen sehr heterogen sein können und dann eine Vielzahl an unterschiedlichen Virusvarianten aufweisen (Bornemann & Varrelmann, 2013). Hinzukommt, dass häufig Mischinfektionen mit anderen bodenbürtigen Viren und darüber hinaus mit anderen pilzlichen Krankheitserregern vorliegen, wodurch die Aussagekraft des Resistenztests weiter eingeschränkt wird.

Diese Probleme können durch die Verwendung von reversen genetischen Systemen, sogenannten infektiösen cDNA Volllängenklonen des Virus umgangen werden. Der Klon eines Virus lässt sich genetisch nicht vom Wildtyp-Virus unterscheiden und verursacht ebenso virustypische Krankheitssymptome. Im Falle der Rizomania-Krankheit wäre ein solches System dazu geeignet, die Arbeit mit Feldpopulationen mittelfristig zu ersetzen. Die Pflanzeninfektion wird unter Umgehung des natürlichen Vektors durchgeführt. Dadurch kann eine deutliche Reduzierung der Inkubationszeit erreicht werden und die vektorfreie Infektion vermindert die Heterogenität und das Auftreten von Mischinfektionen. Ebenso lassen sich die cDNA Klone leicht vermehren, so dass sie theoretisch in unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen und keine großen Lagerkapazitäten benötigen. Auf Grund dieser Vorteile ermöglicht das System eine präzisere und schnellere Bewertung der Rizomania-Resistenz. Ebenso ist es möglich, gezielt Veränderungen im viralen Genom der cDNA Klone hervorzurufen. Somit können Veränderungen im viralen Genom, die in Rizomania Feldpopulationen beobachtet werden, direkt und präzis auf ihre resistenzüberwindenden Eigenschaften geprüft werden. Dies ermöglicht eine schnelle Identifizierung von resistenzüberwindenden Viruspopulationen bevor eine weitere Ausbreitung im Feld erfolgt.

2. Projektziele

Das übergeordnete Forschungsziel des Projektes ist die Sicherung und Weiterentwicklung pflanzlicher Resistenzeigenschaften von Zuckerrüben gegenüber Rizomania durch die Etablierung eines neuen Verfahrens zur Resistenztestung. Dadurch soll der züchterische Fortschritt gesichert und gefördert werden, um weiterhin ertragsstarke Zuckerrübensorten zur Verfügung zu haben. Im Folgenden wird auf die einzelnen Forschungsziele und Arbeitshypothesen näher eingegangen.

Ein primäres Ziel des Projektvorhabens war die Etablierung eines neuen Rizomania-Resistenztests unter Nutzung eines infektiösen BNYVV Volllängenklons. Das bestehende Verfahren, basierend auf natürlichen Viruspopulationen im Boden, soll hierdurch langfristig ersetzt werden. Gegenüber den bisherigen Verfahren soll damit eine deutlichere und schnellere Unterscheidung von anfälligen und resistenten Genotypen erzielt werden. Die Arbeiten zur Etablierung des Verfahrens sind in Arbeitspaket 1 und 2 beschrieben.

Ein weiteres wichtiges Ziel des Projektes war es, die Verbreitung und Ursachen von *Rz1* Resistenzüberwindungen im europäischen Zuckerrübenanbaugebiet aufzuklären. Die Hypothese ist gewesen, dass durch die langjährige Nutzung von *Rz1* eine große genetische Variabilität in den BNYVV Feldpopulationen entstanden ist. Um dies zu bestätigen, sollten im Rahmen des

Projektes Feldpopulationen mit resistenzbrechenden Eigenschaften im Gewächshaus untersucht und später molekular charakterisiert werden (Arbeitspaket 3). Nach erfolgreicher Etablierung des neuen Resistenztests wurden die genetischen Veränderungen, die in den Feldpopulationen beobachtet wurden, gezielt auf ihre resistenzüberwindenden Eigenschaften geprüft werden (Arbeitspaket 4). Hierfür sollte das in AP1 entwickelte Verfahren angewendet werden.

Langfristig stellt die *Rz2* basierte Resistenz die einzige Möglichkeit zur Bekämpfung der Rizomania-Krankheit dar. Daher war es ein weiteres Ziel des Projektes, eine Aussage über die Stabilität dieses Resistenzgens zu tätigen. Da die beiden Resistenzgene *Rz1* und *Rz2* höchstwahrscheinlich auf unterschiedlichen Erkennungsmechanismen beruhen, war die Hypothese, dass Sorten mit beiden Resistenzgenen eine Kontrolle von *Rz1* resistenzüberwindenden Isolaten erlauben. Mit Hilfe des neuen Resistenztests sollten diese Arbeitshypothesen überprüft werden (Arbeitspaket 5). Dadurch leisten die Ergebnisse sowohl einen Beitrag zur Sicherung der Resistenzgene als auch einen Beitrag für ein verbessertes Resistenzmanagement.

3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Arbeitspaket 1: Entwicklung des Infektionsverfahrens

- Ziele und durchgeführte Arbeiten

Zu Beginn des Projektes war es zunächst das Ziel in Arbeitspaket 1 ein Infektionsverfahren zur Etablierung einer Infektion mit BNYVV in Zuckerrübe zu entwickeln. Hierbei sollte nicht mit einer natürlichen Viruspopulation gearbeitet werden, sondern mit einem sogenannten reversen genetischen System. Grundlage des Systems ist ein infektiöser Volllängenklon des BNYVV, welcher in der Arbeitsgruppe bereits entwickelt wurde (Laufer *et al.*, 2018). Der Klon wird über eine Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* (Agrobakterien) in die Zuckerrübenpflanzen eingebracht. Dafür müssen zunächst die vier RNA Komponenten (RNA1-4) in getrennte binäre Plasmide zur Pflanzenexpression kloniert werden. Anschließend werden die Plasmide mit den einzelnen RNA Komponenten in Agrobakterien transformiert, sodass vier unterschiedliche Bakterienkulturen vorliegen. Diese Kulturen bilden den Ausgangspunkt für die Herstellung des Inokulums (Abb. 1). Dabei werden die Kulturen in gleichen Verhältnissen gemischt und anschließend in die Pflanze inokuliert.

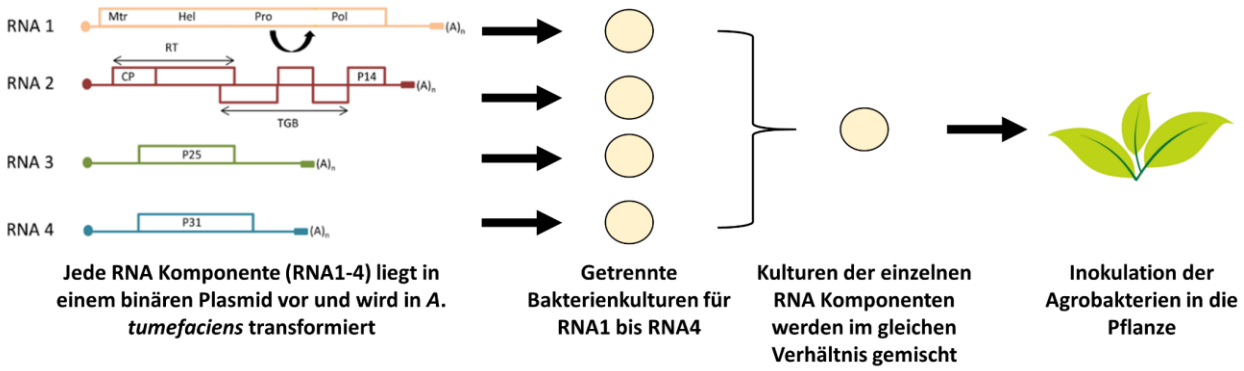

Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Herstellung des Inokulum zur Agrobakterien (*A. tumefaciens*) vermittelten Infektion von Pflanzenviren am Beispiel des BNYVV.

Dieses Prinzip ist bei allen Agrobakterien vermittelten Virusinokulationen gleich, jedoch bestimmt die Art und Weise der Inokulation den Infektionserfolg. Um die Zuckerrübensämlinge mit Agrobakterien zu infizieren, wurde die Inokulation mit einer handelsüblichen Insulinspritze durchgeführt. Diese Methode hat sich bereits bei anderen Viren und Pflanzenarten als besonders geeignet erwiesen, da hierdurch die Agrobakterien direkt in das beschädigte Pflanzengewebe gelangen und die viralen RNAs in den infizierten Zellen freisetzen können. Die Zuckerrübensämlinge werden hierfür entlang des Hypokotyls mit einer Nadel punktiert, um das Gewebe zu beschädigen (Abb. 2). Die Nadelspitze wird vorher in eine Bakterienkultur getaucht, sodass die Agrobakterien direkt in das beschädigte Gewebe gelangen.

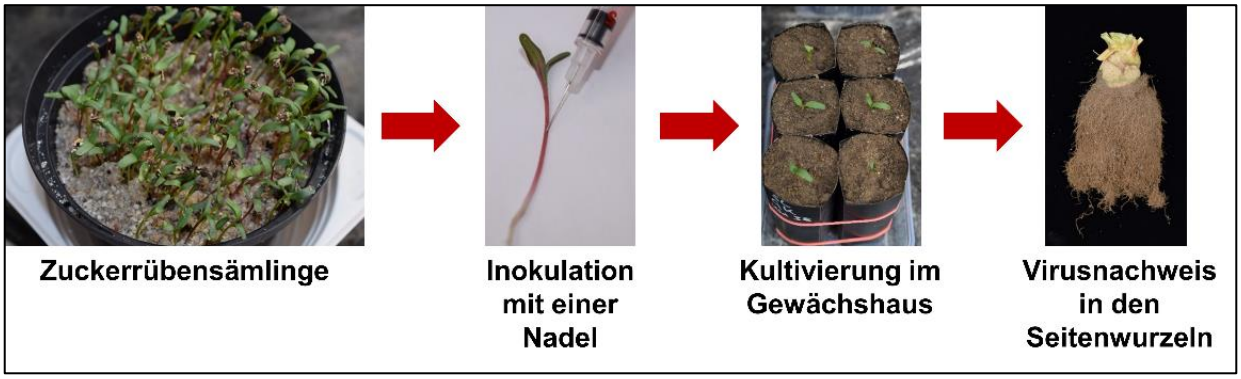

Abb. 2. Schematische Darstellung des Inokulationsverfahrens zur Infektion von Zuckerrübensämlingen mit einem Volllängenklon des BNYVV und anschließendem Virusnachweis.

In AP1 sollte vor allem dieses Inokulationsverfahren für Zuckerrüben weiter optimiert werden, um eine sichere und effiziente Virusinfektion zu erzielen. Dabei spielte auch eine Rolle, dass die Inokulationsmethode sich einfach in anderen Laboren etablieren lassen soll. Es wurde zum einen die Inokulumdichte (Bakteriendichte) variiert sowie das Entwicklungsstadium der Zuckerrüben, da dies bei der Etablierung einer Virusinfektion entscheidend ist. Sämtliche Versuche wurden unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus (24°C Tag/18°C Nacht mit 14 h Zusatzbelichtung) durchgeführt. Die Virusgehalte wurden nach 6 Wochen in den Seitenwurzeln der Pflanzen mittels ELISA bestimmt (Pferdmenges *et al.*, 2009). Die Analyse und Darstellung der Daten erfolgte mit der Statistiksoftware R (Core Team, 2017).

- Erzielte Ergebnisse

Die Inokulationsmethode wurde zunächst an 7 Tage alten Zuckerrübensämlingen (12 Wiederholungen) eines anfälligen Genotyps erprobt. Das Inokulum bestand entweder aus einer frischen Bakterienkultur vom Nährmedium (hohe Bakteriendichte) oder aus einer Infiltrationslösung, die auf eine niedrige Bakteriendichte (OD_{600}:1) eingestellt wurde. Der anschließende Virusnachweis im ELISA ergab für beide Methoden eine hohe Infektionsrate sowie vergleichbare Virusgehalte (Abb. 3). Ebenso waren die Schwankungen im Virusgehalt zwischen den Wiederholungen ähnlich stark ausgeprägt.

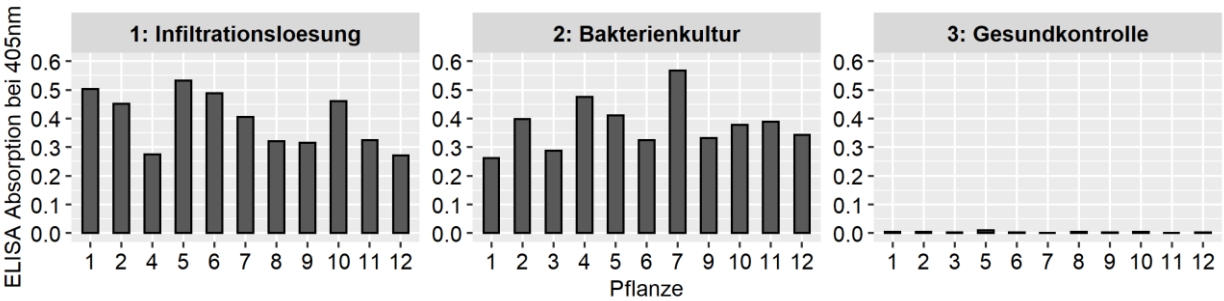

Abb. 3: Inokulation von Zuckerrüben eines anfälligen Genotyps (N=12) mit einem Volllängenklon des BNYVV. Die Inokulation erfolgte über eine Nadel in das Hypokotyl von Sämlingen (7 Tage alt), wobei entweder eine Infiltrationslösung (niedrige Bakteriendichte) oder eine Bakterienkultur (hohe Bakteriendichte) verwendet wurde. Nach 6 Wochen wurde der Virusgehalt mittels ELISA (Absorption bei 405nm) in den Seitenwurzeln bestimmt.

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob das Pflanzenalter angepasst werden kann, da die Inokulation von älteren Pflanzen das Verfahren vereinfachen würde. Dazu wurde der Versuch wiederholt, jedoch diesmal mit 3 Wochen alten Zuckerrübenpflanzen (18 Wiederholungen). Zwar konnte mit diesem Ansatz eine Virusinfektion hervorgerufen werden, jedoch war die Infektionsrate unabhängig von der Inokulationsdichte sehr gering (Abb. 3). Somit wurde geschlussfolgert, dass für den Inokulationserfolg ein sehr frühes Entwicklungsstadium entscheidend ist.

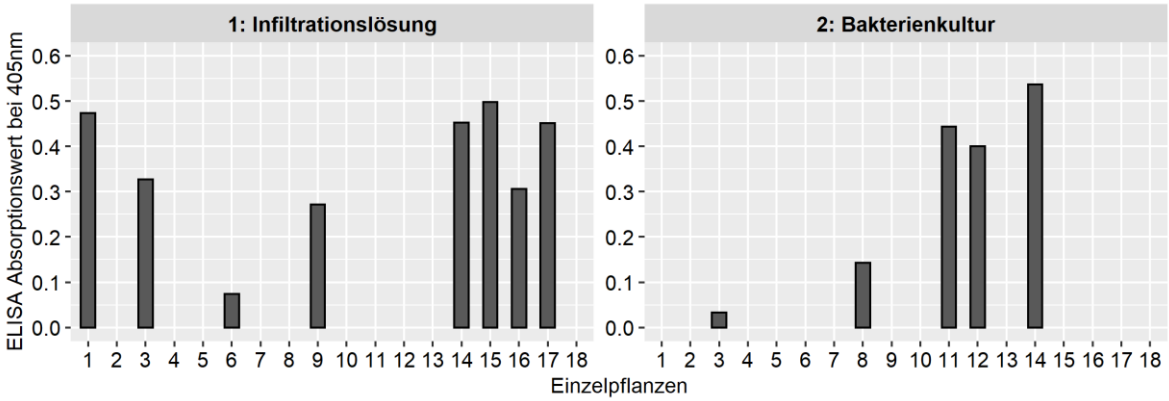

Abb. 4: Inokulation von Zuckerrüben eines anfälligen Genotyps (N=18) mit dem BNYVV Volllängenklon. Die Inokulation erfolgte über eine Nadel in das Hypokotyl von Zuckerrüben (3 Wochen alt), wobei entweder eine Infiltrationslösung (niedrige Bakteriendichte) oder eine Bakterienkultur (hohe Bakteriendichte) verwendet wurde. Nach 6 Wochen wurde der Virusgehalt mittels ELISA (Absorption bei 405nm) in den Seitenwurzeln bestimmt.

Da die beiden Inokulumarten keine Unterschiede zeigten, wurde in allen weiteren Versuchen mit einer frischen Bakterienkultur gearbeitet, da hierdurch der Arbeitsaufwand deutlich reduziert werden konnte. Ebenso wurden ausschließlich 7 Tage alte Zuckerrübensämlinge verwendet. Die Entwicklung des Infektionsverfahrens konnte damit erfolgreich abgeschlossen werden.

Arbeitspaket 2: Etablierung des Rizomania-Resistenztest

- Ziele und durchgeführte Arbeiten

Nachdem im ersten Arbeitspaket die optimalen Bedingungen für das Infektionsverfahren bestimmt wurden, sollte im nächsten Schritt der Resistenztest etabliert werden. Ziel der Etablierung war eine präzise und schnelle Differenzierung zwischen anfälligen und *Rz1*

resistenten Genotypen, sowie der Nachweis eines *Rz1* Resistenzbruchs. Zunächst wurde der optimale Erntezeitpunkt für eine Unterscheidung zwischen resistenten und anfälligen Genotypen mittels Zeitreihenanalyse (4, 5 und 6 Wochen) der Virusgehalte in den Wurzeln bestimmt. Anschließend wurde dieser Versuch mit dem *Rz1* resistenzüberwindenden Virusklon wiederholt, um die Eignung zum Nachweis von Resistenzbruch zu prüfen. In diesem Klon wurde die Tetrade ALHG (nicht-resistenzüberwindend) im Pathogenitätsfaktor P25 gegen die Tetrade AYPR ausgetauscht, welche bereits in früheren Versuchen Resistenzbruch verursachte (Liebe *et al.*, 2020). Danach wurde der Resistenztest mit beiden Klonvarianten (nicht-resistenzüberwindend und resistenzüberwindend) an einem größeren Genotypen-Sortiment validiert. Hierfür stellten die im Projekt beteiligten Züchter jeweils einen anfälligen sowie mehrere *Rz1* resistente Genotypen zur Verfügung. Die Nadelinokulation erfolgte, wie in AP1 beschrieben, an 7 Tage alten Sämlingen mit einer frischen Bakterienkultur direkt vom Nährmedium. Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit dem Softwarepaket R.

- Erzielte Ergebnisse

Im ersten Experiment wurde der nicht-resistenzüberwindende Virusklon mit der Tetrade ALHG in einen anfälligen und resistenten Genotyp inokuliert und der Virusgehalt nach 4, 5 und 6 Wochen bestimmt (Abb. 5A).

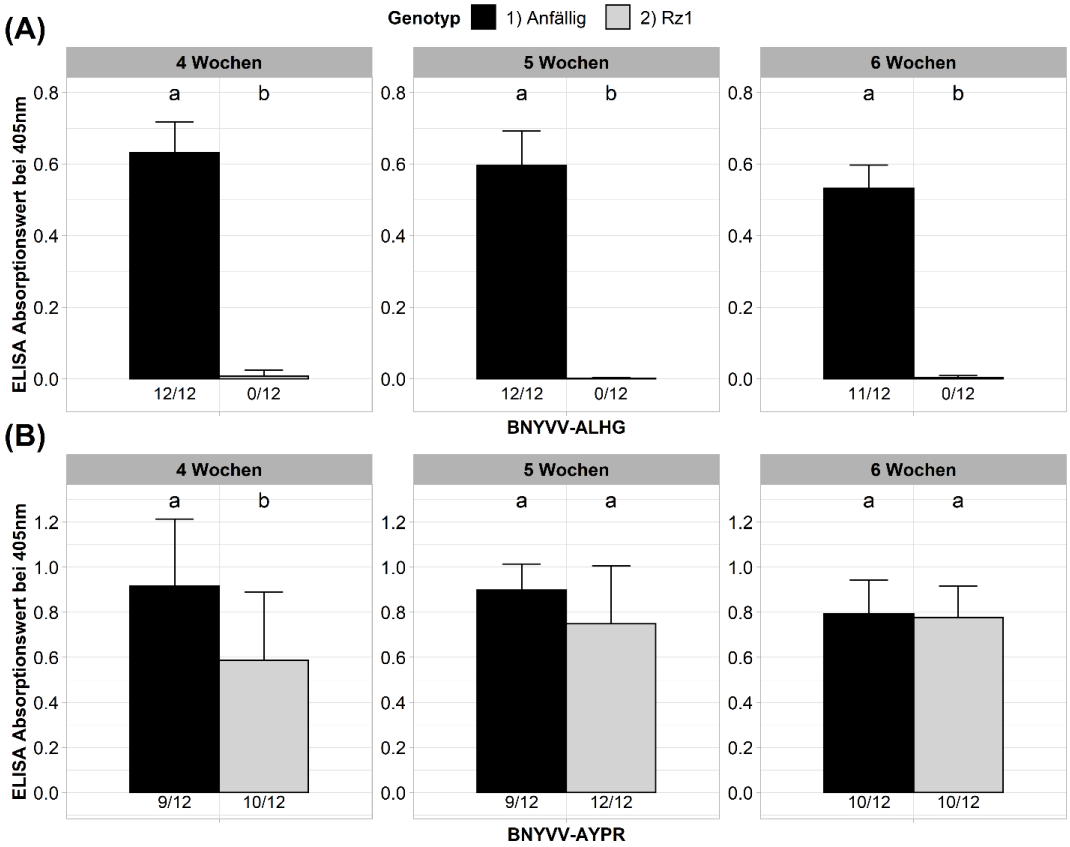

Abb. 5: Inokulation von Zuckerrüben eines anfälligen Genotyps (N=12) mit einem (A) nicht-resistenzüberwindenden (Tetrade ALHG) und (B) mit einem resistenzüberwindenden Klon (Tetrade AYPR) des BNYVV. Nach 4, 5 und 6 Wochen wurde der Virusgehalt mittels ELISA (Absorption bei 405nm) in den Seitenwurzeln bestimmt. Zahlen unterhalb der Balken stellen die Infektionsrate dar (infiziert/inokuliert). Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet (Wilcoxon-Test, $p<0.05$).

Zu allen Zeitpunkten war eine Infektion im anfälligen, aber nicht im resistenten Genotyp nachweisbar. Die Infektionsrate lag ebenfalls zu allen Zeitpunkten bei nahezu 100%. Somit lassen sich mit dem entwickelten Resistenztest beide Genotypen eindeutig voneinander differenzieren.
Im nächsten Schritt wurde der Versuch mit dem resistenzüberwindenden Virusklon (Tetrade AYPR) wiederholt und ebenfalls nach 4, 5 und 6 Wochen ausgewertet (Abb. 5B). Zu allen Zeitpunkten war ein Virusnachweis in beiden Genotypen möglich, lediglich zum ersten Erntezeitpunkt war der Virusgehalt in den resistenten Genotypen signifikant niedriger als im anfälligen Genotyp. Trotzdem war zu allen Zeitpunkten eine Infektion nachweisbar und damit auch der Resistenzbruch bereits 4 Wochen nach der Infektion. Die Eignung des Resistenztests wurde abschließend mit verschiedenen *Rz1* resistenten Genotypen validiert (Abb. 6). Im anfälligen Genotyp erzeugte sowohl der nicht-resistenzüberwindende (Tetrade ALHG) als auch der resistenzüberwindende Klon (Tetrade AYPR) eine vergleichbare Virusinfektion. Die Virusgehalte zeigten keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu ließen sich in den Genotypen B und D keine Infektionen mit dem nicht-resistenzüberwindenden Klon nachweisen, jedoch in den Genotypen C und E auf einem sehr niedrigen Niveau. Ein deutlicher Anstieg im Virusgehalt wurde im resistenten Genotyp erst nach Inokulation des resistenzüberwindenden Klons gemessen. Dieser Anstieg war bei allen *Rz1* Genotypen gleichermaßen zu beobachten und signifikant gegenüber dem anfälligen Genotyp. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der entwickelte Resistenztest Genotypen unabhängig funktioniert und Resistenzbruch nachweisen kann, womit die Etablierungsphase erfolgreich abgeschlossen werden konnte.

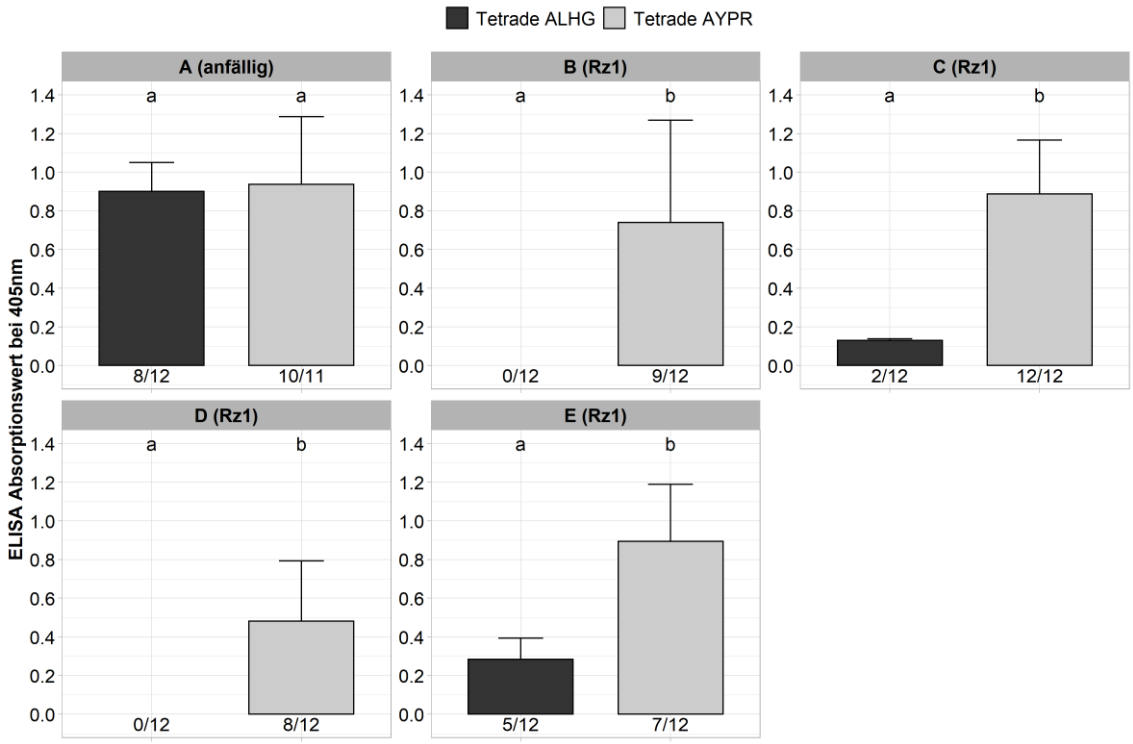

Abb. 6: Inokulation von unterschiedlichen Zuckerrübengenotypen (A: anfällig, B-E: *Rz1* resistent, N=12) mit einem nicht-resistenzüberwindenden (Tetrade ALHG) und einem resistenzüberwindenden Klon (Tetrade AYPR) des BNYVV. Nach 5 Wochen wurde der Virusgehalt mittels ELISA (Absorption bei 405nm) in den Seitenwurzeln bestimmt. Zahlen unterhalb der Balken stellen die Infektionsrate dar (infiziert/inokuliert). Signifikante Unterschiede zwischen den Virusvarianten sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet (Wilcoxon-Test, $p<0.05$).

Arbeitspaket 3: Charakterisierung von *Rz1* resistenzüberwindenden Populationen

- Ziele und durchgeführte Arbeiten

Mit dem entwickelten Resistenztest lassen sich die Ursachen für die *Rz1* Resistenzüberwindung erstmalig genauer untersuchen. Grundlage hierfür ist jedoch eine genaue Kenntnis über die genetische Variabilität und Struktur natürlicher resistenzüberwindender Populationen, jedoch gibt es dazu nur wenig aktuelle Studien. Daher sollte im Arbeitspaket 3 zunächst eine Charakterisierung von *Rz1* resistenzüberwindenden BNYVV-Population erfolgen. Die Zuckerrübenzüchter stellten hierfür Bodenproben (36 Proben) für Fangpflanzentests zur Verfügung, bei denen der Verdacht eines Resistenzbruchs bestand. In den Bodenproben wurden unter Gewächshausbedingungen ein anfälliger und ein *Rz1* resistenter Zuckerrübengenotyp kultiviert. Anschließend erfolgt die Bestimmung des Virusgehalts mittels ELISA, um den Verdacht eines Resistenzbruchs zu überprüfen (Pferdmenges *et al.*, 2009). Nach erfolgreichem Virusnachweis im ELISA erfolgte eine molekulare Charakterisierung der Populationen, um den Virustyp sowie das Vorhandensein einer RNA5 zu bestimmen. Da vor allem Mutationen im Pathogenitätsfaktor P25 für einen Resistenzbruch verantwortlich sind, sollte ebenso die Sequenzvariabilität in den Viruspopulationen erfasst werden. Auf Grund des langjährigen Anbaus von *Rz1* wurde eine große Sequenzvariabilität erwartet, die mit herkömmlichen Sequenzierungsmethoden nicht erfasst werden kann. Daher wurde parallel zur klassischen Sanger-Sequenzierung auch eine Hochdurchsatzsequenzierung bei ausgewählten Populationen durchgeführt. Hierbei sollte vor allem geprüft werden, ob weitere Mutationen außerhalb der Tetrade im P25 existieren sowie in anderen Genombereichen, die bisher mit Resistenzbruch nicht in Verbindung gebracht wurden. Die im Rahmen des Arbeitspaketes erzielten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Liebe & Varrelmann, 2022) und werden deshalb im folgenden Abschnitt nur zusammengefasst dargestellt.

- Erzielte Ergebnisse

Die von den Züchtern zur Verfügung gestellten Bodenproben (36) wurden im Fangpflanzentest geprüft, jedoch konnte nur in 32 Proben das Rizomaniavirus nachgewiesen werden. Die 32 Proben stammten aus insgesamt 6 verschiedenen europäischen Ländern. Es ließen sich sowohl im anfälligen als auch im resistenten Genotyp Virusgehalte messen (Tab. 1). Bei einigen Bodenproben (Boden Nr. 15, 21 und 25) waren die Virusgehalte jedoch auch im anfälligen Genotyp sehr gering oder die Infektionsraten zu gering, so dass nicht eindeutig ein Resistenzbruch nachgewiesen werden konnte.

Tab. 1: ELISA Werte (Mittelwert der Absorption bei 405nm) bestimmt im Fangpflanzentest nach 6 Wochen Standzeit im Gewächshaus. Es wurden jeweils 12 Pflanzen vom anfälligen und *Rz1* resistenten Genotyp in den Bodenproben kultiviert.

			Anfälliger Genotyp		**Resistenter Genotyp**	
Nr.	**Land**	**Region**	**Infizierte Pflanzen**	**Mittelwert ELISA**	**Infizierte Pflanzen**	**Mittelwert ELISA**
1	Frankreich	Bondaroy	12	0,460	12	0,471
2	Deutschland	Hankensbuettel	11	0,716	12	0,583
3	Deutschland	Kirchweyhe	12	0,459	12	0,451
4	Deutschland	Oetzendorf	12	0,504	12	0,456
5	Italien	Lombardy	12	0,600	12	0,483
6	Österreich	Marchfeld	12	0,761	12	0,671
7	Frankreich	Pithiviers	12	0,708	12	0,687
8	Italien	Boggian	12	0,846	11	0,790

9	Deutschland	Straubing	10	0,453	11	0,574
10	Niederlande	Flevoland	12	0,519	12	0,407
11	Frankreich	Pithiviers	10	1,091	5	0,345
13	Frankreich	Pithiviers	12	0,556	12	0,545
14	Frankreich	Pithiviers	12	0,714	12	0,626
15	Frankreich	Pithiviers	3	0,348	1	0,713
16	Frankreich	Pithiviers	12	0,406	12	0,188
17	Frankreich	Pithiviers	12	0,476	12	0,366
18	Deutschland	Mattenkofen	12	1,272	12	0,942
19	Deutschland	Mattenkofen	12	0,983	12	0,659
21	Deutschland	Soest	9	0,687	2	1,277
22	Deutschland	Peine	12	0,872	10	0,473
24	Deutschland	Pfakofen	12	0,863	12	0,549
25	Deutschland	Strasskirchen	4	0,356	3	0,686
26	Deutschland	Tabertshausen	12	0,949	10	0,537
27	Deutschland	Tabertshausen	10	0,741	12	0,522
28	Deutschland	Tabertshausen	12	0,970	9	0,444
29	Deutschland	Lehrte	12	0,792	12	0,746
30	Deutschland	Roeddensen	11	0,716	11	0,757
31	Deutschland	Immensen	12	0,747	12	0,644
33	Deutschland	Elsdorf	12	1,265	10	0,246
34	Spanien	Casasola	7	0,857	9	0,87
35	Spanien	Tordesillas	12	1,064	10	1,414
36	Spanien	Villalonso	12	1,032	12	1,23

Für die Beurteilung des Resistenzbruchs wurde für jede Population das Verhältnis aus den ELISA Werten des anfälligen und resistenten Genotyps gebildet und grafisch dargestellt (Abb. 7).

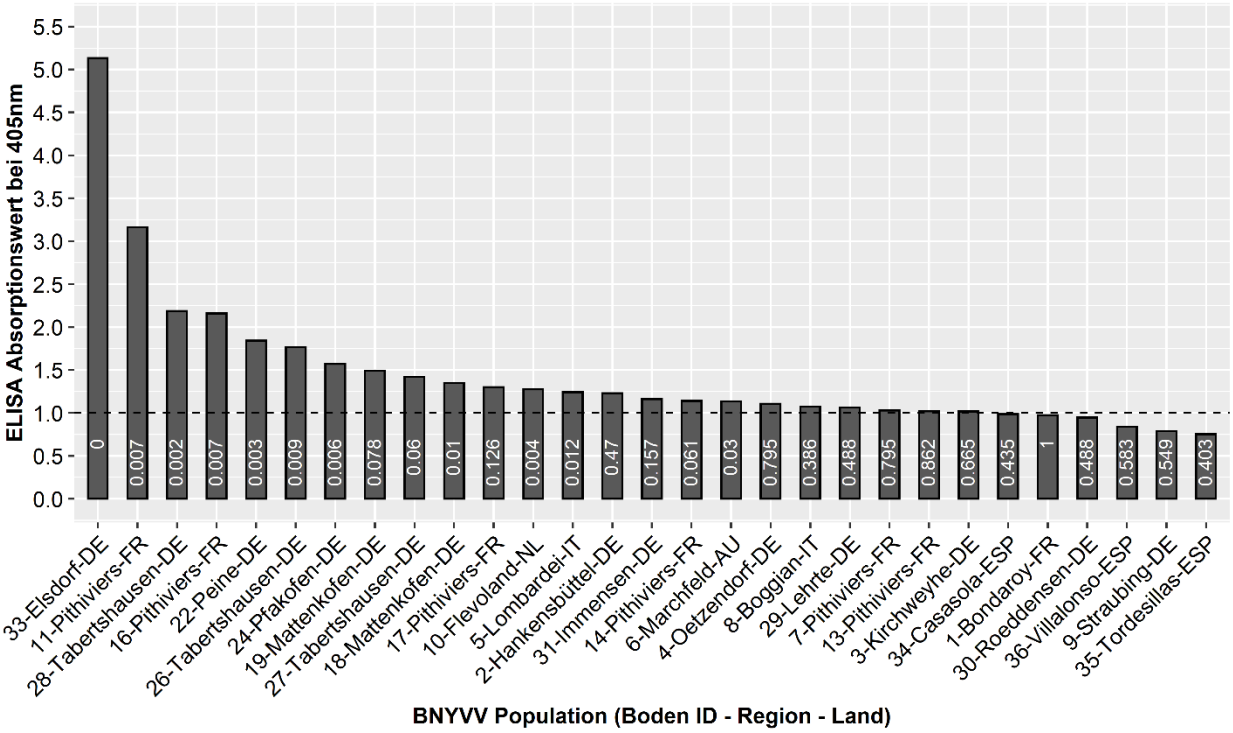

Abb. 7: Verhältnis aus den ELISA Werten des anfälligen und resistenten Genotyps für jede untersuchte Bodenprobe. Die Werte in den Balken stellen den P-Wert (Wilcoxon-Test) für den Mittelwertvergleich beider Genotypen dar.

Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Populationen. Die Population aus Elsdorf (Nr. 33) verzeichnete den höchsten Wert auf Grund der niedrigen Virusgehalte im resistenten Genotyp. Da jedoch die Virusgehalte im anfälligen Genotyp sehr hoch waren, handelte es sich hierbei vermutlich um eine nicht-resistenzüberwindende Viruspopulation. Im Vergleich dazu wiesen die anderen Populationen deutliche niedrigere Werte auf, jedoch gab es auch hier erhebliche Schwankungen. Die Virusgehalte der Populationen 11, 28 und 16 waren im resistenten Genotyp noch deutlich reduziert. Trotzdem konnte für die meisten der geprüften Populationen ein Resistenzbruch festgestellt werden, wenn man nur Werte zwischen 1 und 2 berücksichtigt. Vor allem Populationen mit einem Wert von 1 können als hochgradig angepasst betrachtet werden. Die statistische Auswertung des Mittelwertvergleichs konnte dies bestätigen, da kaum signifikante Unterschiede zwischen beiden Genotypen gefunden wurden (P-Wert kleiner 0,05).

Nach dem Fangpflanzentest erfolgte die molekulare Charakterisierung der Populationen (Tab. 2). Es konnten alle drei Virustypen (A-, B- und P-Typ) in verschiedenen Testböden nachgewiesen werden. Die Bestimmung der P25 Sequenz im Bereich der Aminosäurepositionen 67-70 ergab eine hohe Variabilität in Abhängigkeit der Viruspopulation. Auf Grund der aktuellen Literaturlage ist davon auszugehen, dass dieser Sequenzbereich im P25 für die *Rz1* Resistenzüberwindung von großer Bedeutung ist. So sind zum Beispiel die Aminosäureabfolgen AYPR und VCHG mit *Rz1* Resistenzbruch assoziiert und konnten auch in einzelnen Böden (z. B. Boden Nr. 2, 4, 6) nachgewiesen werden. Daneben wurden viele Aminosäurevarianten (z. B. VHHG, VHPG) mit bisher unbekannten resistenzbrechenden Eigenschaften nachgewiesen. Zusätzlich wiesen zahlreiche Populationen eine weitere RNA5 auf, die entweder Ähnlichkeit zum J- oder P-Typ aufwies (Miyanishi *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass die RNA5 an der Resistenzüberwindung beteiligt ist (Tamada *et al.*, 2021).

Tab. 2: Molekulare Charakterisierung von Rizomania-Populationen isoliert aus anfälligen und *Rz1* resistenten Genotypen. Es wurde der Virustyp, sowie die Sequenzvariabilität im P25 an den Aminosäurepositionen 67-70 (AS67-70) bestimmt. Ebenso wurde das Vorhandensein einer zusätzlichen RNA5 geprüft.

				P25 AS67-70		
Boden Nr.	**Land**	**Region**	**Virustyp**	**Anfälliger Genotyp**	***Rz1* resistenter Genotyp**	**RNA5**
1	Frankreich	Bondaroy	B	AYHR	AYHR	P
2	Deutschland	Hankensbüttel	A	AYPR	AYPR, TYPR	J
3	Deutschland	Kirchweyhe	B	AHHG, AFHR, SYHG	AFHR	-
4	Deutschland	Oetzendorf	A	AYPR	AYPR	-
5	Italien	Lombardy	A	ALHG, AHHG, VHPG	ACHG, AHHG, AYHG, AYPR	J
6	Österreich	Marchfeld	A	ACHG, VCHG	ACHG, ALHG, VCHG	J
7	Frankreich	Pithiviers	P	SYHG	SYHG	P
8	Italien	Boggian	A	ALHG	ALHG, VLHG	J
9	Deutschland	Straubing	B	SYHG, VHHG	VHPG, VHHG	P
10	Niederlande	Flevoland	A	AYPR, TYPR	AYPR	J
11	Frankreich	Pithiviers	P	SYHG	SYHG	P
13	Frankreich	Pithiviers	P	SYHG	SYHG	P
14	Frankreich	Pithiviers	P	SYHG, VHHG	SYHG	P
15	Frankreich	Pithiviers	P	SYHG	SYHG, VHHG	P
16	Frankreich	Pithiviers	P	SYHG, VHHG	SYHG	P
17	Frankreich	Pithiviers	P	SYHG	SYHG	P
18	Deutschland	Mattenkofen	B	AYHR, SYHG	AYHR, SYHG	-

19	Deutschland	Mattenkofen	A/B	SYHG	SYHG, VHHG	-
21	Deutschland	Soest	A	SYHG	AYPR, SYHG	-
22	Deutschland	Peine	B	AHHR, SYHG	AHHR, SYHG	-
24	Deutschland	Pfakofen	B	AYHR, SYHG	SYHG	-
25	Deutschland	Straßkirchen	B	SYHG, VHHG	SYHG, VHHG	-
26	Deutschland	Tabertshausen	B	AYHR	AYHR	-
27	Deutschland	Tabertshausen	B	AYHR, SYHG	AYHR, SYHG	-
28	Deutschland	Tabertshausen	B	AYHR, SYHG, VHHG	AYHR, SYHG	-
29	Deutschland	Lehrte	A/B	AYHR	AYHR	J
30	Deutschland	Roeddensen	B	AHHR	AYHR	-
31	Deutschland	Immensen	B	AYHR	AYHR	-
33	Deutschland	Elsdorf	A	AFHR	AHHR, AYHR	-
34	Spanien	Casasola	A	AHHG	AHHG	-
35	Spanien	Tordesillas	A	ACHG	ACHG	-
36	Spanien	Villalonso	A	VCHG	VCHG	-

Für eine tiefergehende Charakterisierung mittels Hochdurchsatzsequenzierung wurden vier Populationen ausgewählt (Boden Nr. 1, 2, 3 und 6). Dabei wurde für jede Population die Genomsequenz des Rizomaniavirus aus dem anfälligen Genotyp mit der Genomsequenz aus dem resistenten Genotyp verglichen. Zunächst wurde nach Mutationen außerhalb von P25 gesucht, die im *Rz1* resistenten Genotyp selektiert wurden. Hierbei konnten jedoch keine signifikanten Sequenzunterschiede gefunden werden, wenn die Population aus einem anfälligen oder resistenten Genotyp isoliert wurde (Daten nicht gezeigt). Wie zu erwarten, wies der Pathogenitätsfaktor P25 die größte Sequenzvariabilität auf (Tab. 3). Es ließen sich in zwei Populationen mehrere Tetradenvarianten (Aminosäurepositionen 67-70) nachweisen (Boden Nr. 2 und 6) und verschiedene Mutationen außerhalb dieses Sequenzbereichs. Trotzdem ließ sich bei allen beobachteten Mutationen keine eindeutige Selektion durch die *Rz1*-Resistenz beobachten, was vermutlich auf den bereits hohen Anpassungsgrad der Populationen zurückzuführen ist.

Tab. 3.: Häufigkeit von Tetraden-Varianten (Aminosäureposition 67-70) und anderen Mutationen in P25 bestimmt durch Hochdurchsatz-Sequenzierung. Die Analyse umfasste einen anfälligen und einen resistenten Genotyp, die in vier von Rizomania befallenen Böden unterschiedlicher Herkunft angebaut wurden.

Boden Nr.	Land	Region	Genotyp	Tetrade (P25 AS67-70)	Weitere Mutationen im P25		
					21	**36**	**118**
1	Bondaroy	Frankreich	Anfällig	AYHR (100%)	T(30%) M(70%)	R(28.44%) C(71.53%)	I(17.32%) T(82.45%)
			Resistent	AYHR (100%)	M(100%)	C(100%)	I(17.17%) T(82.63%)
					132		
2	Hankensbüttel	Deutschland	Anfällig	AYPR (98.93%) TYPR (1.01%)	I(40.54%) L(59.40%)		
			Resistant	AYPR (95.16%) TYPR (4.78%)	I(100%)		
					21	**25**	**32**
3	Kirchweyhe	Deutschland	Anfällig	AYHR (100%)	M(23.42%) T(76.28%)	G(8.29%) D(91.64%)	N(100%)
			Resistant	AYHR (100%)	M(17.58%) T(82.10%)	G(55.87%) D(38.67%) N(5.43%)	N(87.12%) H(12.86%)
					21	**135**	
6	Marchfeld	Österreich	Anfällig	ACHG (91.86%) AYHG (6.40%) AFHG (1.66%)	M(78.13%) T(19.18%) K(2.47%)	D(100%)	
			Resistant	ACHG (93.68%) AYHG (5.12%) AFHG (1.19%)	M(58.63%) T(41.04%)	D(75.21%) E(24.77%)	

Arbeitspaket 4: Identifizierung der Ursachen der *Rz1* Resistenzüberwindung

- Ziele und durchgeführte Arbeiten

Auf Grundlage der in Arbeitspaket 3 gewonnen Erkenntnisse sollte der Rizomania-Resistenztest dazu genutzt werden, um die viralen Ursachen für die *Rz1* Resistenzüberwindung genauer zu untersuchen. Dies ist eine wichtige Grundlage für die Nutzbarmachung des Resistenztests im Züchtungsprozess. Deshalb wurden sämtliche Mutationen in der Tetrade des P25, die in den natürlichen Populationen identifiziert wurden, in den Volllängenklon des Rizomaniavirus eingeführt. Der Austausch der Tetrade im Volllängenklon erfolgte über „site directed mutagenesis“ mittels PCR. Die Herstellung dieser Mutanten erfolgte im Auftrag durch Prof. Dr. Maiss (Leibniz Universität Hannover). Des Weiteren war das häufige Auftreten einer zusätzlichen RNA5 in den natürlichen Populationen sehr auffällig, wodurch ein Zusammenhang mit Resistenzbruch naheliegt. In den natürlichen Populationen konnten zwei verschiedene RNA5 Typen gefunden werden. Die J-Typ RNA5 ist mit asiatischen Virusisolaten verwandt, wohingegen die P-Typ RNA5 mit französischen Virusisolaten verwandt ist. Um den Resistenzbruch zu bestätigen, wurden die beiden unterschiedlichen RNA5 Typen kloniert und auf ihre resistenzbrechenden Eigenschaften untersucht. In allen Versuchen erfolgte die Überprüfung der Resistenzüberwindung mit einem anfälligen und einem *Rz1* resistenten Genotyp. Die Zuckerrübenpflanzen wurden wie beschrieben mit den verschiedenen Virusvarianten inokuliert und die Bestimmung der Virusgehalte in den Wurzeln erfolgt mittels ELISA. Die generierten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Liebe et al., 2023) und werden deshalb im nächsten Abschnitt zusammengefasst dargestellt.

- Erzielte Ergebnisse

Es wurden insgesamt 25 verschiedene P25 Tetraden-Varianten auf ihre resistenzbrechenden Eigenschaften geprüft (Tab. 4). Wie bereits oben erläutert, ist der nicht-resistenzüberwindende Klon nicht in der Lage, eine messbare Infektion im resistenten Genotyp hervorzurufen. Die Tetraden AYPR, VCHG und VLHG wurden als Kontrolle mit einbezogen, da ihre resistenzbrechenden Eigenschaften bereits durch reverse Genetik nachgewiesen wurden (Liebe *et al.*, 2020), jedoch nicht mit dem hier angewendeten Verfahren. Die große Anzahl von Tetraden erforderte mehrere getrennte Versuche, so dass ein statistischer Vergleich nur zwischen den beiden mit derselben Tetrade infizierten Genotypen möglich war. Nach jedem Experiment bestätigten wir durch konventionelle Sanger-Sequenzierung das Vorhandensein der Tetraden im anfälligen und resistenten Genotyp. Interessanterweise waren sieben Tetraden in Zuckerrüben instabil, was durch mehrere Peaks im Sequenzierelektropherogramm angezeigt wurde. Der anfällige Genotyp war immer noch infiziert, aber einige der instabilen Tetraden waren mit einer verminderten Pathogenität verbunden, die durch eine niedrige Infektionsrate (AFHG, AHHG, AYHG, SYHG) oder einen niedrigen mittleren ELISA-Wert (AYHG) angezeigt wurde. Daher können aufgrund ihrer Instabilität im Hintergrund des A-Typ-Klons keine Schlussfolgerungen hinsichtlich des Resistenzbruchs gezogen werden. Die zweite Gruppe umfasste stabile Tetraden, die aufgrund des Fehlens einer Infektion im *Rz1*-Genotyp keine resistenzbrechenden Eigenschaften aufwiesen. Ähnlich wie in der vorherigen Gruppe waren einige Tetraden mit einer geringeren Infektionsrate oder einem niedrigen mittleren ELISA-Wert verbunden (AYHR, AYPG, AYRV). Im Gegensatz dazu hatten die Tetraden ACHR, AHHR und ASHR keinen Einfluss auf die Pathogenität des A-Klons. Die letzte Gruppe enthielt nur Tetraden, die stabil waren und eine Akkumulation im *Rz1*-Genotyp ermöglichten. Ein direkter statistischer Vergleich der beiden

Genotypen zeigte, dass einige Tetraden eine ähnliche Akkumulation in beiden Genotypen ermöglichten (d. h. AYPR, -DHG/D-HG, TFPR, TYPR, VHPG). Die anderen Tetraden (AFPR, TCHG, VCHG, VHHG, VLHG) ermöglichten ebenfalls die Durchbrechung der Resistenz, aber der Virustiter war im Vergleich zum anfälligen Genotyp deutlich niedriger. Am deutlichsten war dies bei TCHG mit einer mittleren ELISA-Absorption von 0,74 beim anfälligen Genotyp und 0,279 beim *Rz1* Genotyp. Außerdem schien die Tetraden-AFPR die Pathogenität unseres A-Typ-Klons zu verringern, was sich in einem niedrigen mittleren ELISA-Wert bei beiden Genotypen zeigte. Dies war auch bei der Tetrade TYHR der Fall, abgesehen von einer Verringerung der Infektionsrate.

Tab. 4: Bestimmung der resistenzbrechenden Eigenschaften verschiedener Tetraden. Es sind die ELISA Werte (Mittelwert der Absorption bei 405nm) nach Infektion eines anfälligen und *Rz1* resistenten Genotyps dargestellt sowie die Infektionsraten. Es wurden jeweils 18 Pflanzen von beiden Genotypen inokuliert.

	Anfälliger Genotyp		***Rz1* resistenter Genotyp**		
Tetrade[a]	**Infizierte Pflanzen**	**ELISA[b]**	**Infizierte Pflanzen**	**ELISA[b]**	**P-Wert[c]**
Instabile Tetraden					
ACHG	10	0,584	0	-	-
AFHR	10	0,408	1	0,105	-
AFHG	6	0,752	0	-	-
AHHG	4	0,412	0	-	-
AYHG	4	0,216	0	-	-
SYHG	5	0,624	2	0,145	-
VYHG	15	0,524	4	0,199	-
Kein Virusnachweis in Rz1					
ACHR	17	0,68	0	-	-
AHHR	12	0,771	0	-	-
ASHR	17	1,077	0	-	-
AYHR	4	0,255	0	-	-
AYPG	6	0,532	0	-	-
AYRV	11	0,374	0	-	-
Virusnachweis in Rz1					
AFPR	13	0,388	10	0,257	0,025*
AYPR	18	0,662	17	0,617	0,428
-DHG/D-HG	13	0,75	8	0,725	0,690
TCHG	15	0,74	6	0,279	0,001*
TFPR	17	0,678	17	0,669	0,917
TYHR	3	0,321	2	0,364	1
TYPR	18	0,597	17	0,576	0,503
VCHG	18	0,652	13	0,473	0,001*
VFHG	16	1,143	12	0,524	0,001*
VHHG	17	0,662	15	0,427	0,001*
VHPG	18	0,701	17	0,75	0,541
VLHG	18	0,64	9	0,409	0,001*

[a]Das Vorhandensein der mutierten Tetrade wurde am Ende der Inkubationsperiode sowohl im anfälligen als auch im resistenten Genotyp mittels Sequenzierung bestimmt. Im Falle von instabilen Tetraden ließen sich nach der Sequenzierung mehrere Mutationen nachweisen, sodass keine Aussage über den spezifischen Effekt der Tetrade möglich ist.
[b]Für die Mittelwertberechnung wurden nur infizierte Pflanzen berücksichtigt.

[c]Der P-Wert gibt die Signifikanz für den Vergleich der ELISA Messwerte beider Genotypen an (Wilcoxon Test). Es wurden nur resistenzbrechende Tetraden analysiert. Signifikante Unterschiede (P-Wert < 0,5) sind hervorgehoben durch “*”.

Zusätzlich zu den Tetraden wurden ebenso beide RNA5 Varianten im Resistenztest geprüft (Abb. 8). Hierbei zeigte sich ein deutlicher Effekt auf die Virusvermehrung im resistenten Genotyp. Der nicht-resistenzüberwindende Klon konnte mit beiden RNA5 Varianten den resistenten Genotyp infizieren. Die Virusgehalte waren zwar niedriger als im anfälligen Genotyp, aber deutlich unterscheidbar von der Variante ohne RNA5. Somit konnte neben der Tetrade ein weiterer Mechanismus der *Rz1* Resistenzüberwindung beschrieben werden.

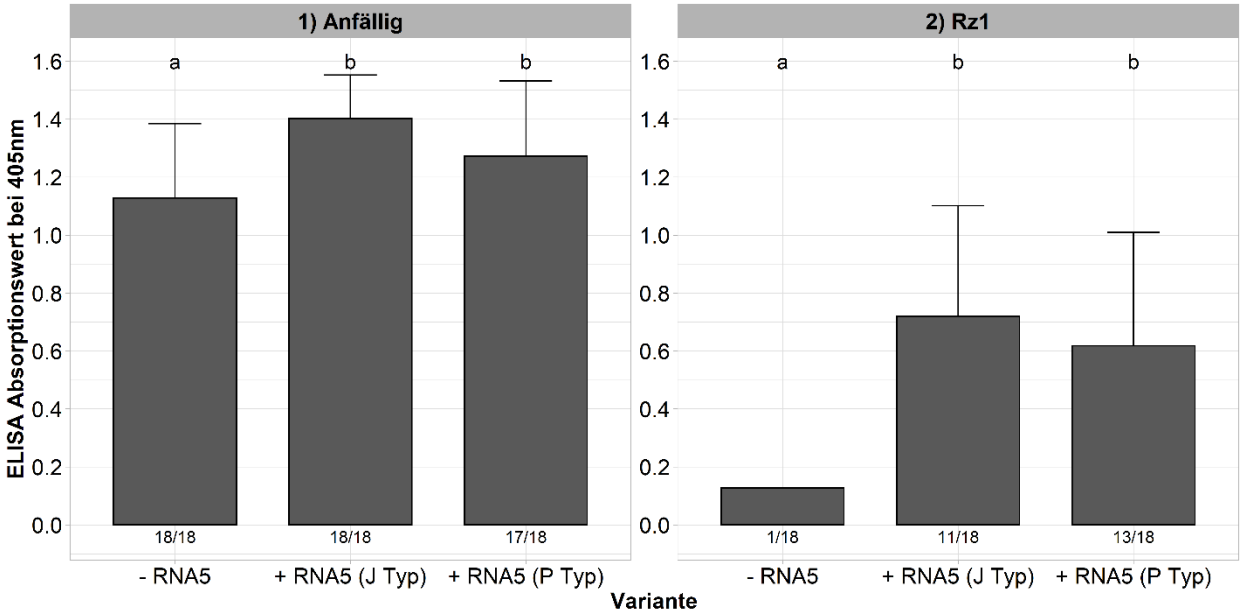

Abb. 8: Effekt der RNA5 auf den Virusgehalt im anfälligen und resistenten Genotyp (N=18). Der nicht-resistenzüberwindende Klon wurde entweder ohne oder mit einer RNA5 inokuliert. Es wurden zwei verschiedene RNA5s (P- oder J-Typ) geprüft. Die Virusgehalte wurden nach 5 Wochen in den Seitenwurzeln bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen den Virusvarianten innerhalb eines Genotyps sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet (Dunnett-Test, p<0.05).

Arbeitspaket 5: Stabilität der *Rz2* Resistenz

- Ziele und durchgeführte Arbeiten

Neben dem *Rz1* Resistenzgen wird in kommerziell erhältlichen Sorten das *Rz2* Resistenzgen zur Kontrolle der Rizomania-Krankheit eingesetzt. In Regionen, in denen eine *Rz1* Resistenzüberwindung nachgewiesen wurde, ist somit der Anbau von Sorten, die das *Rz2* Resistenzgen tragen, die einzige Bekämpfungsmöglichkeit. Daher ist die Stabilität dieses Resistenzgens für die Sicherung des Rübenanbaus von großer Bedeutung. Um hierüber eine Aussage treffen zu können, sollte geprüft werden, ob *Rz1* überwindende Virusvarianten auch einen Selektionsvorteil in Genotypen besitzen, die neben *Rz1* zusätzlich das *Rz2* Resistenzgen tragen. Dazu wurden mit Hilfe von Resistenztests und den in Arbeitspaket 4 hergestellten resistenzüberwindenden Klonen Infektionsexperimente durchgeführt. Es wurde der Effekt der RNA5 sowie der Effekt einer Tetradenmutation auf die Resistenzstabilität untersucht. Mit einem Genotypen-Set, bestehend aus einem anfälligen sowie einem doppelt resistenten Genotyp

(*Rz1+Rz2*) wurden die Versuche durchgeführt (N=18). In den Seitenwurzeln der inokulierten Pflanzen wurde nach 5 Wochen mittels ELISA der Virusgehalt bestimmt. Diese Ergebnisse sind ebenfalls ausführlich in einer Publikation beschrieben (Liebe et al., 2023).

- Erzielte Ergebnisse

Im ersten Versuch wurde der Effekt der RNA5 auf die Virusvermehrung im doppelt resistenten Genotyp geprüft (Abb. 9A). Wie zu erwarten, ließen sich hohe Virusgehalte im anfälligen Genotyp nachweisen. Im Gegensatz dazu waren nur vereinzelt sehr niedrige Virusgehalte im doppelt resistenten Genotyp nachweisbar. Die Infektionsrate ist ebenso drastisch zurückgegangen. Derselbe Effekt ließ sich bei den resistenzbrechenden Tetraden-Varianten beobachten (Abb. 9B). Sowohl die Infektionsrate als auch die Virusgehalte waren sehr niedrig in dem doppelt resistenten Genotyp. Aus beiden Versuchen kann abgeleitet werden, dass die resistenzbrechenden Eigenschaften der Tetrade und der RNA5 spezifisch sind für das *Rz1* Resistenzgen sind. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten innerhalb eines Genotyps.

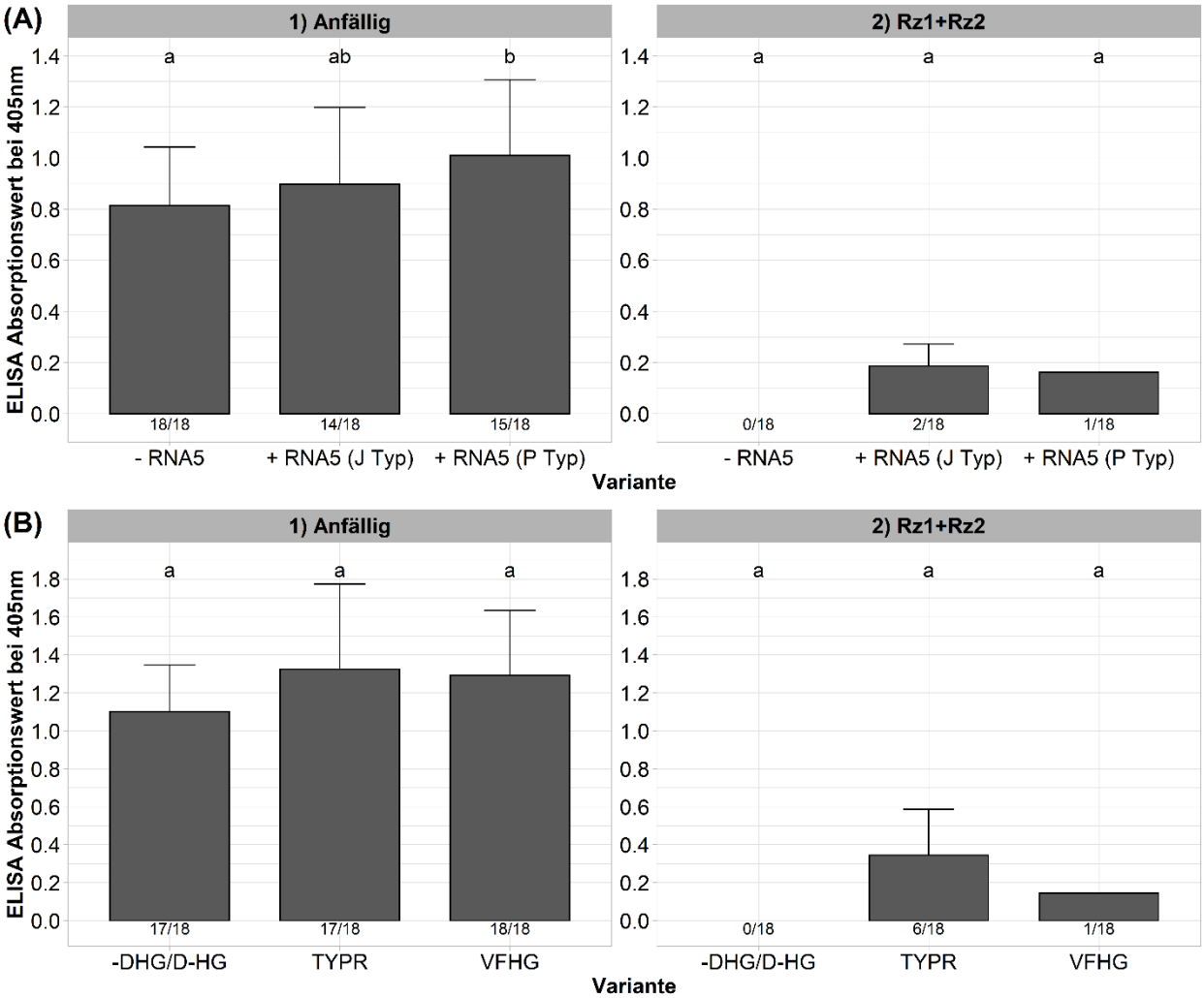

Abb. 9: (A) Effekt der RNA5 und unterschiedlicher (B) Tetraden-Varianten auf den Virusgehalt im anfälligen und doppelt resistenten Genotyp (*Rz1+Rz2*). Die Virusgehalte wurden nach 5 Wochen in den Seitenwurzeln bestimmt (N=18). Zahlen unterhalb der Balken stellen die Infektionsrate dar (infiziert/inokuliert). Signifikante Unterschiede zwischen den Virusvarianten innerhalb eines Genotyps sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet (Dunnett-Test, $p<0.05$).

4. Diskussion

Entwicklung des neuen Rizomania-Resistenztest

Im Rahmen des Forschungsprojektes war es uns möglich ein neues Verfahren für die Resistenztestung bei Rizomania zu entwickeln. Hierbei wurde erstmalig ein reverses genetisches System angewendet, das bei der Etablierung einer Infektion ohne eine natürliche Viruspopulation auskommt. Das Verfahren basiert auf der Nutzung eines infektiösen Volllängenklons des BNYVV, der aus einer nicht-resistenzüberwindenden A-Typ Populationen gewonnen wurde (Laufer *et al.*, 2018). Der A-Typ des BNYVV ist am weitesteten verbreitet und zeigte bisher am häufigsten Resistenzbruch (Schirmer *et al.*, 2005; Chiba *et al.*, 2011). Der hier genutzte Klon kann nachweislich nach Agrobakterien vermittelter Infektion die Rizomania-Krankheit in Zuckerrüben auslösen. Hierbei zeigte sich in den Voruntersuchungen, dass eine Inokulation über das Hypokotyl nach mechanischer Beschädigung mit einer Nadel den besten Infektionserfolg erzielt. Ebenso zeigten die Ergebnisse, dass frische Bakterienkulturen als Inokulum eingesetzt werden können und damit die Herstellung einer Infiltrationslösung mit definierter Bakteriendichte nicht erforderlich ist. Im Resistenztest war eine eindeutige Differenzierung zwischen anfälligen und *Rz1* resistenten Genotypen möglich. Im Vergleich zu natürlichen nicht-resistenzüberwindenden Viruspopulationen ließen sich nur vereinzelt oder gar keine Virusgehalte in resistenten Pflanzen nachweisen. Diese Differenzierung war bereits vier Wochen nach der Infektion sichtbar. Um die Eignung des Klons zum Nachweis von Resistenzbruch zu prüfen, wurde die Tetrade ALHG im Pathogenitätsfaktor P25 gegen AYPR ausgetauscht. Bereits aus früheren Arbeiten ist die resistenzbrechende Eigenschaft dieser Tetrade bekannt und diente somit als Kontrolle für das neue Verfahren (Bornemann & Varrelmann, 2011; Liebe *et al.*, 2020). Nach Einführung dieser Tetrade war der Klon in der Lage, alle geprüften *Rz1* Genotypen zu infizieren. Die Virusgehalte waren signifikant höher als beim nicht-resistenzüberwindenden Klon. Da die *Rz1* Genotypen von unterschiedlichen Züchtern zur Verfügung gestellt wurden, kann von einer breiten Anwendbarkeit des Verfahrens ausgegangen werden. Damit waren die Grundlagen für die Bearbeitung der weiteren Fragestellungen im Projekt gelegt.

Charakterisierung von *Rz1* resistenzüberwindenden Populationen

Mit dem im Projekt entwickelten Resistenztest sollten die Ursachen der *Rz1* Resistenzüberwindung bestimmt werden. Grundlage hierfür bildeten Untersuchungen von Bodenproben mit natürlichen resistenzüberwindenden Populationen. Unter den von uns untersuchten Proben befand sich lediglich eine nicht-resistenzbrechende Population (Boden Nr. 33). Bei dieser Population war der Virusgehalt im resistenten Genotyp um mehr als das fünffache reduziert, so wie man es bei Wirksamkeit der *Rz1* Resistenz erwarten würde (Liu *et al.*, 2005; Pferdmenges *et al.*, 2009; Bornemann *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu waren ähnliche Virusgehalte in beiden Genotypen ein klarer Indikator für die Überwindung der Resistenz, wie es bei vielen beprobten Populationen in dieser Arbeit beobachtet wurde. Daneben wiesen einige Populationen deutlich erhöhte Virusgehalte im resistenten Genotyp auf, jedoch waren die Werte immer niedriger als im anfälligen Genotyp. Bereits in früheren Arbeiten konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden (Liu & Lewellen, 2007; Bornemann & Varrelmann, 2011; Bornemann *et al.*, 2015). Dies lässt auf einen unterschiedlichen Anpassungsgrad der Populationen schließen, weshalb die molekulare Charakterisierung der Populationen im Projekt von besonderer Bedeutung ist.

Nach unserem Kenntnisstand wurde die Überwindung der *Rz1* Resistenz im Fangpflanzentest bisher nur für den A- und P-Typ von BNYVV nachgewiesen. Die Resistenzbrechung durch den A-Typ führt man auf die Tetraden AYPR, VLHG und VCHG zurück, die auch in unseren Populationen gefunden wurden, die *Rz1* überwinden konnten (Koenig *et al.*, 2009; Bornemann *et al.*, 2015; Liebe *et al.*, 2020). Es ließen sich jedoch auch andere Tetraden (z.B. VHHG, VHPG, TYPR) nachweisen, bei denen bisher unklar war, ob sie resistenzbrechende Eigenschaften vermitteln. Die resistenzbrechende Eigenschaft des P-Typs konnte in diesem Projekt ebenfalls bestätigt werden, da alle Populationen dieses Virustyps erhöhte Virusgehalte im resistenten Genotyp verursachten. Überraschenderweise war es uns möglich, zum ersten Mal Populationen des B-Typs zu identifizieren, die in der Lage waren vergleichbare Virusgehalte in beiden Genotypen zu verursachen. Die meisten dieser Populationen enthielten AYHR als Tetrade, eine Variante die bereits in Populationen gefunden wurde, die vor mehr als zwanzig Jahren gesammelt wurden (Bouzoubaa *et al.*, 1985; Koenig *et al.*, 2008). Daher ist es unwahrscheinlich, dass diese spezifische Tetrade für das Überwinden der *Rz1* Resistenz verantwortlich ist. Drei der Populationen des B-Typs (Boden Nr. 1, 9 und 29) enthielten ebenfalls eine RNA5. Diese RNA Komponente findet man auch im P-Typ und sie ist für den Resistenzbruch verantwortlich (Müllender *et al.*, 2022). Daher kann auch hier geschlussfolgert werden, dass die RNA5 den B-Typ Populationen resistenzbrechende Eigenschaften verleiht. Es gab jedoch auch andere Populationen des B-Typs, die ähnliche Virusgehalte in beiden Genotypen ohne eine zusätzliche RNA5 produzierten. Es müssen also noch weitere Mutationen existieren, die für die Resistenzbrechung durch den B-Typ des Rizomaniavirus verantwortlich sind. Um dies zu untersuchen muss jedoch ein Volllängenklon des B-Typ entwickelt werden.

Besonders auffällig in den von uns untersuchten Proben war das häufige Auftreten einer fünften RNA Komponente (RNA5). Mehrere Populationen vom A- und B-Typ enthielten eine RNA5-Spezies, die sich entweder dem asiatischen J- oder dem französischen P-Typ zuordnen ließ. Soweit uns bekannt ist, wurde über das Vorkommen einer RNA5 des P-Typs in Deutschland und einer RNA5 des J-Typs in Österreich, Italien und den Niederlanden noch nie berichtet (Chiba et al., 2011). In Deutschland wurde bisher nur einmal eine RNA5 vom J-Typ gefunden, die eng mit der in unserer Studie gefunden RNA5 verwandt ist (Koenig et al., 2008). Die RNA5 steht in direktem Zusammenhang mit Resistenzbruch (Liebe *et al.*, 2020; Tamada *et al.*, 2021). In der Literatur wird angenommen, dass sich das ursprüngliche Rizomaniavirus mit der RNA5 in einheimischen Wirten in Ostasien entwickelt hat und danach weltweit in Zuckerrübenanbaugebiete eingedrungen ist (Chiba et al., 2011). Folglich wurde die RNA5 verbreitet und differenzierte sich in den J- und P-Typ wie phylogenetische Analysen zeigten (Miyanishi et al., 1999). Interessanterweise wurde in einer kürzlich durchgeführten Studie festgestellt, dass das Vorkommen von RNA5 des J-Typs in Japan im Laufe der Zeit (1969 - 2019) zugenommen hat, was höchstwahrscheinlich auf die Einführung von *Rz1* resistenten Sorten zurückzuführen ist (Nakagami *et al.*, 2021). Es bleibt zu zeigen, ob eine solche Verschiebung in der Genomzusammensetzung auch in europäischen Rizomania-Populationen auftritt. Das Vorhandensein einer RNA5 in Populationen aus Deutschland und anderen europäischen Ländern war für uns überraschend und unterstreicht damit die Notwendigkeit solcher Überwachungsstudien.

Ursachen der *Rz1* Resistenzüberwindung

Die molekulare Charakterisierung natürlicher Viruspopulationen in früheren Studien und in diesem Projekt hat ergeben, dass zum einen Mutationen in der Tetrade des P25 sowie das

Auftreten einer zusätzlichen RNA5 eindeutig mit Resistenzbruch in Verbindung stehen. Für beide Mechanismen der Resistenzüberwindung gibt es experimentelle Evidenz, jedoch sind noch einige Fragen ungeklärt. Dies betrifft vor allem die enorme Vielfalt an unterschiedlichen Tetraden, wobei für die meisten Varianten die resistenzbrechenden Eigenschaften unbekannt sind. Daher führten wir ein umfassendes Screening durch, um neue resistenzbrechende Tetraden zu identifizieren. Tatsächlich konnten wir für die Varianten -DHG/D-HG, TFPR, TYPR, VFHG, VHHG und VHPG eindeutige *Rz1* resistenzbrechende Eigenschaften nachweisen. Andere Tetraden wie AFPR, TCHG und TYHR ermöglichten dem Virus nur eine geringfügige Akkumulation in resistenten Pflanzen, und daher würden wir sie zumindest in dem Hintergrund des A-Typ-Klons nicht als resistenzbrechend einstufen. Darüber hinaus zeigte ein großer Teil der getesteten Tetraden keine resistenzbrechenden Eigenschaften. Mit diesen Ergebnissen haben wir bestätigt, dass unser Resistenztest geeignet ist, neu entstehende Tetraden auf ihre resistenzbrechenden Eigenschaften hin zu überprüfen. Einige Tetraden waren jedoch entweder im Hintergrund unseres A-Typ-Klons instabil oder verringerten die Pathogenität des Virus drastisch. Am deutlichsten wurde dies bei der Tetrade AYHR, die für B-Typ-Isolate von BNYVV charakteristisch ist (Schirmer *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass jeder Virustyp des BNYVV nur begrenzt in der Lage ist, die Tetrade zu mutieren, da sie die Funktion von P25 beeinträchtigen kann. Aus diesem Grund ist wie oben bereits erwähnt ein B-Typ Klon erforderlich, um die resistenzbrechenden Eigenschaften der Tetrade AYHR zu prüfen.

In den resistenzbrechenden Populationen ließen sich neben Tetradenmutationen auch zwei unterschiedliche RNA5 Spezies (J-und P-Typ) nachweisen. Die RNA5 des P-Typs gehört ursprünglich zu Isolaten des P-Typs und ist der Hauptfaktor für die Resistenzbrechung durch diesen Virustyp (Müllender et al., 2022). Im Gegensatz dazu basieren die Beweise für die resistenzbrechende Wirkung der RNA5, die zur J-Typ-Gruppe gehört, auf Experimenten mit natürlichen Viruspopulationen (Nakagami et al., 2021; Tamada et al., 2021). Beide RNA5-Spezies weisen eine gewisse Sequenzvariation im kodierten P26-Protein auf, und deshalb wollten wir die resistenzbrechenden Eigenschaften beider RNA5s im Hintergrund unseres Klons vergleichen. Unabhängig von der RNA5-Spezies war das Virus in der Lage *Rz1* zu überwinden, aber der Virusgehalt war immer niedriger als beim anfälligen Genotyp. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch gemacht, als die resistenzbrechende Fähigkeit der RNA5 des P-Typs mit einem cDNA-Klon des BNYVV P-Typs untersucht wurde (Müllender et al., 2022). Der Grund dafür ist unbekannt, aber es deutet stark darauf hin, dass neben dem Vorhandensein der RNA5 noch weitere Mutationen an der Resistenzbrechung beteiligt sind. Darüber hinaus weisen unsere Ergebnisse auch auf einen positiven Effekt der RNA5 auf den Virusgehalt hin. Dieser Effekt war zwar nicht durchgängig statistisch signifikant, wurde aber für beide RNA5s in unabhängigen Versuchen beobachtet. Unser reverses genetisches System ermöglicht es uns nun, die genaue Funktion von P26 in weiteren Experimenten zu untersuchen.

Stabilität der *Rz2* Resistenz

Das weltweite Auftreten von Populationen, die die *Rz1* Resistenz brechen, stellt eine Bedrohung für die Zuckerrübenproduktion dar. Dadurch wird die Bedeutung des zweiten Resistenzgens *Rz2*, das in einigen Sorten zusammen mit *Rz1* verwendet wird, verstärkt. Eine frühere Studie zeigte, dass *Rz1*+*Rz2*-Sorten unter Feldbedingungen keinen vollständigen Schutz gegen das Rizomaniavirus bieten (Galein et al., 2018), obwohl es bisher keine Berichte über *Rz2* resistenzbrechende Populationen gibt. Um diesen Befund zu überprüfen, testeten wir die Fähigkeit unserer *Rz1* resistenzbrechenden Klone in einem doppelt resistenten Genotyp (*Rz1*+*Rz2*) zu

akkumulieren. Wir haben beide Mechanismen zur Überwindung der Resistenz getrennt getestet (Tetradenmutation und Zugabe von RNA5), aber keiner der Klone war in der Lage eine Infektion im doppelt resistenten Genotyp auszulösen, die mit dem anfälligen Genotyp vergleichbar ist. Folglich sind die hier beschriebenen Mechanismen der Resistenz hochgradig spezifisch für *Rz1* und bieten dem Virus keinen Fitnessvorteil bei doppelt resistenten Genotypen. Diese Schlussfolgerung wird auch durch eine neuere Studie gestützt, die zeigt, dass das virale Transportprotein „triple gene block I“ von *Rz2* erkannt wird und Zelltod auslöst (Wetzel *et al.*, 2021). Im Gegensatz dazu wird angenommen, dass P25 das Avirulenzgen von *Rz1* darstellt. Die Beobachtung eines teilweisen Schutzes gegen BNYVV durch doppelt resistente Sorten (Galein et al., 2018) könnte auf spezifische Feldbedingungen zurückzuführen sein, wenn andere Faktoren die Resistenz beeinträchtigen, wie z. B. eine Sekundärinfektion mit Nematoden oder anderen z.B. pilzlichen Krankheitserregern.

5. Ausblick

Mit dem im Projekt entwickelten Infektionsverfahren ist es erstmals möglich die Resistenzeigenschaften von Zuckerrübensorten gegenüber der Rizomania-Krankheit ohne die Verwendung einer natürlichen Viruspopulation zu prüfen. Darüber hinaus bietet der Resistenztest vielseitige Einsatzmöglichkeiten, um die resistenzbrechenden Eigenschaften neu auftretender Mutationen zu überprüfen. Dadurch konnten im Projekt wichtige Fortschritte zum besseren Verständnis von Resistenzüberwindung bei BNYVV erzielt werden. Sowohl für den A-Typ als auch für den P-Typ von BNYVV sind die Ursachen der Resistenzüberwindung dadurch sehr gut aufgeklärt. Die hier im Projekt beschriebenen Ergebnisse zu den Ursachen der Resistenzüberwindung liefern wichtige experimentelle Evidenz für bisherige Berichte und Vermutungen aus der Literatur. Im Rahmen des Projektes konnten wir erstmalig auch B-Typ Populationen mit resistenzbrechenden Eigenschaften beschreiben. Für diesen Virustyp sind die Ursachen der Resistenzüberwindung noch nicht vollständig aufgeklärt. Genauere Untersuchungen erfordern die Entwicklung eines Volllängenklons des B-Typs, der bisher noch nicht vorliegt. Die Tatsache das mittlerweile alle drei Virustypen (A-, B- und P-Typ) des BNYVV resistenzbrechende Eigenschaften entwickelt haben, verdeutlicht die Anpassungsfähigkeit des Virus und die abnehmende Stabilität von *Rz1*. Dies wird weiter bestärkt durch die Funde solcher Populationen in unterschiedlichen Ländern, weshalb man davon ausgehen kann, dass resistenzüberwindende Mutationen prinzipiell unabhängig überall auftreten können. Faktoren, die diesen Prozess beschleunigen, sind bisher nicht bekannt. Gerade aus diesem Grund muss der Resistenzbruch in den Viruspopulationen weiterhin intensiv beobachtet werden. Dies betrifft nicht nur *Rz1* sondern auch das zweite Resistenzgen *Rz2*, das bereits in einigen Sorten genutzt wird. Unsere Ergebnisse verdeutlichen die Wichtigkeit von *Rz2* für die Kontrolle von *Rz1* brechenden Viruspopulationen.

6. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Während der Projektphase traten keine experimentellen Probleme auf und alle notwendigen Arbeiten konnten durchgeführt werden. Daher war es möglich die im Projektantrag formulierten Ziele im vollen Umfang zu erreichen. Bei der Durchführung der einzelnen Arbeitspakete konnte insbesondere die Etablierungsphase für den Resistenztest sehr schnell abgeschlossen werden. Ebenso gab es nur geringfügige Einschränkungen auf Grund der Corona-Pandemie. Bereits während der Projektphase konnte mit der Erstellung von Publikationen begonnen werden. Daher können abschließend sämtliche durchgeführte Arbeiten als notwendig und angemessen bewertet werden.

7. Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der erzielten Ergebnisse

Im Rahmen des Projektes wurde erstmalig ein reverses genetisches System für eine wichtige Viruserkrankung an der Zuckerrübe entwickelt. Das System lässt sich nachweislich zur Bewertung der Resistenzeigenschaften von Zuckerrübensorten gegenüber der Rizomania-Krankheit einsetzen. Der wissenschaftlich-technische Nutzen der Ergebnisse liegt unter anderem in der entwickelten Methode für die Virusinokulation, da sich das Verfahren prinzipiell auch auf andere Viruserkrankungen der Zuckerrübe übertragen lässt. Es wurden wichtige Grundlagen zur Nutzung von Agrobakterien für die Virusinfektion bei Zuckerrüben erarbeitet. Bisher gibt es nur wenig wissenschaftliche Arbeiten in denen tatsächlich gezeigt werden konnte, dass infektiöse Volllängenklone eines Virus dazu geeignet sind Resistenzeigenschaften von Kulturpflanzen zu bewerten. Des Weiteren wurden im Projekt wichtige Ergebnisse zur genetischen Diversität von Rizomania-Populationen und dessen Anpassung an die *Rz1* Resistenz erarbeitet. Mit Hilfe des Resistenztests konnten die molekularen Ursachen für die Resistenzüberwindung genauer untersucht werden. Diese Ergebnisse haben unser Verständnis über die Anpassungsstrategien von Pflanzenviren an Resistenzeigenschaften ihrer Wirte erheblich erweitert.

Der wirtschaftliche Nutzen der Projektergebnisse umfasst einen vielseitigen Interessentenkreis. Die Züchtungsunternehmen können den neuen Resistenztest vor allem für ihre Züchtungsarbeiten nutzen, um das herkömmliche Verfahren mit Bodenproben und natürlichen Viruspopulationen zu ersetzen.Eine präzisere und schnellere Differenzierung zwischen anfälligen und resistenten Genotypen optimiert den Züchtungsprozess. Ebenso kann der Resistenztest genutzt werden, um neue Resistenzgene gegen Rizomania zu identifizieren. Für den Methodentransfer wird am Ende des Projektes mit den Züchtungsunternehmen ein Workshop zum Resistenztest durchgeführt. Dadurch profitieren auch langfristig die Zuckerrübenanbauer und Zuckerunternehmen, da mit der Identifizierung und Einführung neuer Resistenzgene weiterhin unter Rizomaniabefall ertragsstabile und leistungsfähige Sorten zur Verfügung stehen werden. Darüber hinaus können auf Grundlage der Ergebnisse zur *Rz1* Resistenzüberwindung Verfahren für die Genotypisierung von natürlichen Viruspopulationen entwickelt werden. Dies ermöglicht die Entwicklung eines molekularen Diagnosetools für resistenzüberwindende Viruspopulationen im Feld.

8. Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

- Durchgeführte und geplante Transfermaßnahmen (von Projektbeginn bis heute)

Maßnahme	Ziel	Ort/Rahmen	Datum/Zeitraum
Vortrag	Jährlicher Bericht über das Projekt in der GFPi-Abt. Beta-Rüben	GFPi-Tagung in Bonn	November 2019
Vortrag	Jährlicher Bericht über das Projekt in der GFPi-Abt. Beta-Rüben	GFPi-Tagung in Bonn	November 2020
Vortrag	Vorstellung der Projektergebnisse vor dem Projekt begleitenden Ausschuss	IfZ Göttingen	März 2021
Vortrag	Vorstellung der Projektergebnisse bundesweit vor den	Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft (DPG)-Arbeitskreis	März 2021

	Experten für Pflanzenvirologie	Viruskrankheiten der Pflanze	
Vortrag	Vorstellung der Projektergebnisse international vor den Experten für Pflanzenvirologie	Association of Applied Biology (aab) International Advances in Plant Virology 2021	April 2021
Vortrag	Vorstellung der Projektergebnisse bundesweit vor den Experten für Pflanzenschutz	DPG-Pflanzenschutztagung	September 2021
Vortrag	Jährlicher Bericht über das Projekt in der GFPi-Abt. Beta-Rüben	GFPi-Tagung in Bonn	November 2021
Vortrag	Vorstellung der Projektergebnisse vor dem projektbegleitenden Ausschuss	IfZ Göttingen	Februar 2022
Vortrag	Vorstellung der Projektergebnisse bundesweit vor den Experten für Virologie	DPG-Arbeitskreis Viruskrankheiten der Pflanze	März 2022
Vortrag	Vorstellung der Projektergebnisse international vor den Experten für Zuckerrüben	International Institute for Beet Research (IIRB) Congress	Juni 2022
Vortrag	Vorstellung der Projektergebnisse international vor den Experten für Pflanzenvirologie	Association of Applied Biology (aab) International Advances in Plant Virology 2022	October 2022
Vortrag	Abschlussbericht über das Projekt in der GFPi-Abt. Beta-Rüben	GFP-Tagung in Bonn	November 2022
Vortrag	Abschlussbericht über das Projekt vor dem projektbegleitenden Ausschuss vorstellen	IfZ Göttingen	Februar 2023
Workshop	Workshop Rizomania-Resistenztest	IfZ Göttingen	März 2023
Artikel	Vorstellung der Projektergebnisse der wissenschaftlichen Gemeinschaft	Peer-review Journal	Mai 2022 und März 2023

8. Literatur

Acosta-Leal R, Bryan BK, Smith JT, Rush CM, 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.

Bornemann K, Hanse B, Varrelmann M, Stevens M, 2015. Occurrence of resistance-breaking strains of Beet necrotic yellow vein virus in sugar beet in northwestern Europe and identification of a new variant of the viral pathogenicity factor P25. *Plant pathology* **64**, 25–34.

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.

Bornemann K, Varrelmann M, 2013. Effect of sugar beet genotype on the B eet necrotic yellow vein virus P 25 pathogenicity factor and evidence for a fitness penalty in resistance-breaking strains. *Molecular plant pathology* **14**, 356–364.

Bouzoubaa S, Guilley H, Jonard G, Richards K, Putz C, 1985. Nucleotide sequence analysis of RNA-3 and RNA-4 of beet necrotic yellow vein virus, isolates F2 and G1. *Journal of General Virology* **66**, 1553–1564.

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.

Core Team R, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. *Vienna, Austria: URL https://www. R-project. org/.[Google Scholar]*.

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**, 348–374.

Koenig R, Holtschulte B, Deml G *et al.*, 2009. 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.

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.

Laufer M, Mohammad H, Maiss E *et al.*, 2018. Biological properties of Beet soil-borne mosaic virus and Beet necrotic yellow vein virus cDNA clones produced by isothermal in vitro recombination: Insights for reassortant appearance. *Virology* **518**, 25–33.

Lewellen R, Skoyen I, Erichsen A, 1987. Breeding sugar beet for resistance to rhizomania: Evaluation of host-plant reactions and selection for and inheritance of resistance. In: IIRB. Secretariat General,.

Liebe S, Maiss, E., Varrelmann M, 2023. The arms race between beet necrotic yellow vein virus and host resistance in sugar beet. *Frontiers in Plant Science* **14**.

Liebe S, Varrelmann M, 2022. Ongoing evolution of *Beet necrotic yellow vein virus* towards *Rz1* resistance-breaking in Europe. *Plant Pathology* **71***,* 1647-1659.

Liebe S, Wibberg D, Maiss E, Varrelmann M, 2020. Application of a reverse genetic system for beet necrotic yellow vein virus to study Rz1 resistance response in sugar beet. *Frontiers in plant science* **10**, 1703.

Liu H-Y, Lewellen R, 2007. Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of Beet necrotic yellow vein virus in the United States. *Plant disease* **91**, 847–851.

Liu H-Y, Sears J, Lewellen R, 2005. Occurrence of resistance-breaking Beet necrotic yellow vein virus of sugar beet. *Plant disease* **89**, 464–468.

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.

Müllender MM, Varrelmann M, Maiss E, Liebe S, 2022. Comparative analysis of virus pathogenicity and resistance-breaking between the P- and A-type from the beet necrotic yellow vein virus using infectious cDNA clones. *Journal of General Virology* **103**.

Nakagami R, Chiba S, Yoshida N *et al.*, 2021. Epidemic progress of beet necrotic yellow vein virus: Evidence from an investigation in Japan spanning half a century. *Plant Pathology*.

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. *European Journal of Plant Pathology* **124**, 31–43.

Schirmer A, Link D, Cognat V *et al.*, 2005. Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. *Journal of General Virology* **86**, 2897–2911.

Scholten OE, Jansen RC, Keizer LP, De Bock TS, Lange W, 1996. Major genes for resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in Beta vulgaris. *Euphytica* **91**, 331–339.

Tamada T, Uchino H, Kusume T *et al.*, 2021. Pathogenetic roles of beet necrotic yellow vein virus RNA5 in the exacerbation of symptoms and yield reduction, development of scab-like symptoms, and Rz1-resistance breaking in sugar beet. *Plant Pathology* **70**, 219–232.

Wetzel V, Willlems G, Darracq A, Galein Y, Liebe S, Varrelmann M, 2021. The Beta vulgaris-derived resistance gene Rz2 confers broad-spectrum resistance against soilborne sugar beet-infecting viruses from different families by recognizing triple gene block protein 1. *Molecular Plant Pathology*.