Eine neue Viruserkrankung in *Goniolimon tataricum*: Molekularbiologische Charakterisierung des Erregers sowie Etablierung von Gewebe- und Tranformationssystemen mit dem Ziel der Erzeugung einer Virusresistenz

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Danuta Galetzka
aus Gliwice

Marburg, 2000

Vom Fachbereich Biologie Philipps-Universität Marburg als Dissertation

Angenommen am: 13.09.1999

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2000

Erstgutachter: PD. Dr. R. Fischer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Batschauer

Ich versichere, daß ich meine Dissertation mit dem Titel "**Eine neue Viruserkrankung in *Goniolimon tataricum*: Molekularbiologische Charakterisierung des Erregers sowie Etablierung von Gewebe- und Tranformationssystemen mit dem Ziel der Erzeugung einer Virusresistenz**" selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe mich dabei keiner als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen Prüfungszwecken gedient.

Marburg den 12.06.00

Danuta Galetzka

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 1997 bis Dezember 1999 im Laboratorium Grüne Gentechnik der Staatlichen Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau, Berufsbildende Schule, Neustadt an der Weinstrasse unter der Leitung von Dr. H.-P. Lorenz und der Betreuung von Dr. G. Krczal durchgeführt.

Im Rahmen eines Kooperationsvertrages wurden einige der Untersuchungen im Institut Centro di Studio sui Virus e le Virosi delle Colture Mediterranee Bari (Italien) während eines 2-monatigen Aufenthaltes unter der Leitung von Prof. Dr. M. Russo und Dr. L. Rubino vorgenommen.

Für Luisa Rubino und Marcello Russo

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen **1**

I. Zusammenfassung **2**

II. Einleitung **4**

III. Material und Methoden **14**

1. Chemikalien und Materialien **14**

1.1 Verwendete Organismen und deren Züchtung

2. Molekularbiologische Methoden **15**

2.1. Virusmaterial und Propagierung **15**

2.2 Virusreinigung **16**

2.3 Photometrische Messung **17**

2.4 RNA-Isolation aus Pflanzen-und Virusmaterial **17**

2.5 DNA-RNA-Hybridisierung (*Northern blot*) **18**

2.6 cDNA Synthese (*Random Priming*) **19**

2.6.1 Bestimmung der Nucleotidsequenz am 3'Ende und 5'Ende der genomischen RNA des Virus **20**

2.7 T7-abhängige RNA Transkription **20**

2.8 PCR **21**

2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten **22**

2.10 Ligation **23**

2.11 Transformation von E. *coli* und Agrobakterien **25**

2.11.1 Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien **25**

2.12 Präparation und Restriktion von DNA **26**

2.13 DNA- Sequenzierung **27**

2.14 Mikroskopische Methoden **27**

2.14.1 Immunelektronenmikroskopie **27**

2.14.2 Antikörper **27**

2.14.3. Preparation von Viruspartikeln für die elektronenmikroskopische Untersuchung **27**

2.14.4 Dekoration der Viruspartikel mit Antikörpern **27**

2.15 Serologische Methoden **28**

2.15.1 Ouchterlonydoppeldiffusionstest **28**

2.15.2 Elisa **28**

3. Gewebekultur Statice (*Goniolimon tataricum*) **29**

3.1 Sterilisation der Samen **29**

3.2 Anzucht von sterilem Pflanzenmaterial **29**

3.3 Transformation von Staticen-Wurzeln **30**

3.4 Selektion der Transformanten **31**

3.5 Infiltration von *Nicotiana benthamiana* Blättern **31**

3.6 GUS-Färbung **32**

IV. Ergebnisse **33**

Teil 1. Molekularbiologische und serologische Charakterisierung des Virus **33**

1.1 Makroskopisches Krankheitsbild **33**

1.1.1 Nachweis und Isolation des Virus aus Statice und Ackerbegleitflora **33**

1.2 Infektionsversuche unter definierten Bedingungen **35**

1.3 Elekronenmikroskopische Untersuchung **36**

1.4 Serologische Charakterisierung **36**

1.5 Cytophatologie der Virusinfektion **37**

1.6 Bestimmung der Virussequenz **39**

1.7 TBSV-BS3-Statice assoziierte Submoleküle **43**

1.7.1 Satelliten-RNA **43**

1.7.2 DI-RNA **44**

1.8 Klonierung einer infektiösen cDNA Kopie des Virus **46**

1.9 Subklonierung der Replikase oder deren Fragmente in einen binären, Pflanzen-transformationsvektor **48**

Teil 2. Regeneration und Transformation der Statice **51**

2.1 Ausgangskultur **51**
2.2 Bestimmung der regenerativen Pflanzenteile der Statice **51**
2.3 Kallusinduktion in Infloreszenzanlagen **53**
2.4 Transformationsversuche der Statice mit *Agrobacterium tumefaciens* **54**
2.4.1 Ermittlung der Antibiotikakonzentrationen **54**
2.4.2 Reportergen Test unter Verwendung von *N. benthamiana* Blättern **56**
2.4.3 Ermittlung der Infektionseffizienz des Agrobakterienstammes ATHV in der Transformation der Staticenwurzel **57**
2.5 Transformantenregeneration **58**

V. Diskussion **60**

VI. Literatur **71**

Anhang **81**

Dank
Lebenslauf

Abkürzungen

ABA	Abscisinsäure
AMCV	*Artischoke mottled crinkle virus*
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BAP	6-Benzylaminopurin
CIRV	*Carnation italian ringspot virus*
CNV	*Cucumber necrosis virus*
CymRSV	*Cymbidium ringspot virus*
DIG	Digoxygenin
dNTP	Desoxy-Nucleotide
FDE	Formaldehyd RNA-Puffer
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GUS	ß-Glucoronidase-Gen
IAA	Indolessigsäure
IBA	Indolbuttersäure
IPTG	Isopropyl-ß-D-Thiogalaktopyranosid
KIN	Kinetin
LB	Luria-Bertani-Medium
LD	DNA *Loading dye*
MS	Murashige & Skoog Medium
MVB	*Multi vesiculated bodies*
NAA	Naphtylessigsäure
PNK	Polynukleotidkinase
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBSV	*tomato bushy stunt virus*
TBSV-BS3	*tomato bushy stunt virus BS3*
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	*Units*
Xgal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-ß-D-galactosid
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2ip	N^6-(2-Isopentenyl) Adenin

I. Zusammenfassung

Seit einigen Jahren ist in einer für Rheinhessen wirtschaftlich wichtigen Trockenblume, eine Virose beobachtet worden, die Ernteausfälle bis zur 70% verursacht. Das Virus ist sehr stabil und in niedrigsten Titern infektiös. Es wurde beobachtet, daß es vektorlos bodenübertragbar ist. Vertreter dieser Virusart sind unter anderem in euroasiatischen Regionen, in Kanada, in Deutschland, in Kalifornien und Spanien gefunden worden.

In dieser Arbeit wurde das Virus, aus einer der infizierten Staticen (*Goniolimon tataricum*) isoliert, molekularbiologisch und serologisch untersucht. Serologisch wurde das Virus der Gruppe der Tombusviren zugeordnet. Sequenzvergleiche mit anderen Tombusviren ließen eine endgültige Einordnung des Virus in die Familie der *Tombusviridae* und eine Charakterisierung als *tomato bushy stunt virus- BS3* Isolat Statice zu. Die Replikation des untersuchten Virus erfolgt an der Peroxisomenmembran der Wirtszelle. Bei Subinokulation des Virus auf die Testpflanze *Nicotiana benthamiana* wurden *defective interfering*-RNA Moleküle (DI-RNA) gebildet. Eine Satelliten-RNA konnte nicht detektiert werden. Eine DNA-Kopie der DI-RNA wurde in einen bakteriellen Vektor subkloniert. Es gelang eine infektiöse DNA-Kopie des TBSV-BS3-Stat. zu erstellen, was beweist, daß die erhaltene cDNA Kopie biologisch aktiv ist.

Versuche anderer Arbeitsgruppen zur Resistenzerzeugung in Modellpflanzen (*Nicotiana benthamiana*) gegenüber Tombusvirusinfektionen zeigten bereits einige Erfolge auf. Es wurden deshalb in dieser Arbeit mehrere Konstrukte, die Sequenzen der Replikase in *sense* wie in *antisense* in geeigneten Pflanzentransformationsvektoren enthalten, erstellt. Diese Sequenzen wurden von der infektiösen Kopie des TBSV-BS3-Stat. Virus abgeleitet. Da die Pflanzentransformation mit DNA-Sequenzen der DI-RNA ebenfalls Resistenz erzeugen kann, wurde die klonierte DNA Sequenz in einen Pflanzentransformationsvektor subkloniert.

Da die mehrjährige Staticen-Art (*Goniolimon tataricum*) bisher eine problemlose Kulturpflanze war, ist sie nie molekularbiologisch bearbeitet worden. Um eine resistente Pflanze zu erzeugen, mußte deshalb zunächst eine sterile Gewebekultur etabliert werden. Diese sterile Kultur diente als Ausgangsmaterial für alle nachfolgenden Arbeiten. Damit ein Regenerationsprotokoll erarbeitet werden konnte, war es notwendig die regenerativen Gewebe der Pflanze zu bestimmen. Als regenerative Teile für die Statice wurden die Sproßachse und die Wurzel bestimmt. Teile dieser Gewebe, mit der Hormonkombination 1mg/L NAA und Kinetin behandelt, gingen in ein Kallusstadium über, bildeten später Sproßscheitelpunkte, Blätter und Wurzeln aus. Ausgehend von diesem Regenerationsprotokoll konnte ein Transformationsprotokoll für den agrobakterienvermittelten Gentransfer erstellt werden. Als geeigneter Agrobakterien-Stamm für die Übertragung der resistenzerzeugenden Sequenzen konnte ATHV bestimmt werden. Die Wurzelexplantate, transformiert mit dem Stamm ATHV und einem Reportergen (GUS-Intron), zeigten bereits nach einer Woche Transformationsereignisse auf. Weitere Transformationsversuche bewiesen, daß die gewählten

Transformationsbedingungen eine Bildung von Chimären unterdrückten. Nur transformiertes Gewebe wurde regeneriert. Die Regeneration der Transformanten bis zur bewurzelungsfähigen Pflanze dauert ca. 3 Monate. Ausgehend von den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen ist es möglich, eine Transformation von Staticen mit den klonierten Konstrukten durchzuführen und eine Linie zu etablieren, die zumindest eine Virustoleranz aufweisen sollte.

Neben dem praxisrelevanten Aspekt dieser Arbeit hat die eingehende Untersuchung des Virus und die Herstellung einer infektiösen DNA-Kopie eine Reihe weitergehender Untersuchungen ermöglicht. Diese werden in der Diskussion der Arbeit als Ausblick behandelt. Wesentliche Teile der Arbeit wurden im *Journal of Plant Pathology* publiziert.

II. Einleitung

Schon um die Jahrhundertwende begannen Gärtner und Winzer in Rheinhessen Trockenblumen anzubauen. Heute ist der Anbau vor allem im Raum Ingelheim und Worms konzentriert, Felder existieren aber auch verstreut in vielen Gemeinden des rheinhessischen Hügellandes. Die wirtschaftlich wichtigste Art ist die mehrjährige Statice *Goniolimon tataricum*. Der Anbau dieser Trockenblume wird durch besondere klimatische Verhältnisse begünstigt. Entscheidend sind eine geringe mittlere Niederschlagshöhe von 510 bis 590 mm/Jahr, eine hohe Anzahl an Sonnenscheinstunden, eine lange Vegetationsperiode, milde Winter und hohe Durchschnittstemperaturen mit Jahresmittel von 9 bis 10 °C (Müller-Westermeier, 1990). Die mehrjährige Statice erbringt 5 bis 7 Jahre einen stetigen Ertrag an Trockenblumen (Thal, 1986), die einen in dieser Branche relativ hohen Preis von 16 DM/kg erzielen. Da sie in der Pflege sehr anspruchslos ist, wurde sie für viele Betriebe zur wichtigen Einnahmequelle.
Mitte der achtziger Jahre wurde an kommerziell angebauten *Goniolimon tataricum* Pflanzen in Rheinhessen ein bis dahin unbekanntes Schadbild beobachtet. Die Ernteausfälle seit Mitte der achtziger Jahre betrugen bis zu 70%, und das Schadbild der Pflanzen ließ eine neue Virose vermuten. Auf Blattspreiten betroffener Pflanzen zeigten sich ringförmige Chlorosen und Nekrosen, die Blätter waren deformiert, die Blütenbildung erfolgte verzögert oder blieb aus, die Blütentriebe nekrotisierten (Krczal und Beutel, 1994). Diese Schäden führten bei einem Teil der erkrankten Pflanzen zum Absterben und damit zu erheblichen Ernteeinbußen (Abb. 1).

Abb. 1: Virusschäden in einem Staticenfeld.
Neben gesunden, blütentragenden Pflanzen finden sich Staticen, deren Infloreszenz nicht entwickelt ist. An einigen Stellen sind die Pflanzen vollständig abgestorben.

Bisher wurden folgende Vertreter an *Limonium ssp.* gefunden: *Broad bean wilt virus* (Hein et al., 1977), *Turnip mosaic virus* (Niblett et al., 1969; Laird und Dickson, 1972; Iino et al., 1987), *cucumber mosaic virus* (Iino et al., 1987), *Tabacco rattle virus* (Dijkstra und Dike, 1981) und Statice-Virus Y (Lesemann et al., 1979). Es handelt sich dabei um ein seltenes Auftreten und regional begrenztes

Vorkommen der einzelnen Viren, die einen eher unbedeutenden Ernteausfall bewirken. Aus Blättern einer infizierten Pflanze konnte ein Virus isoliert werden, das nicht mit dem bereits beschriebenen identisch ist (Krczal und Beutel, 1994). Anhand von Symptomausprägung auf Testpflanzen, physikalischen Eigenschaften und serologischen Untersuchungen wurde dieses Virus in die Gruppe der Tombusviren eingeordnet. Ferner konnte gezeigt werden, daß das Virus vektorlos bodenübertragbar ist.

Die Gruppe der Tombusviren ist eine von 16 Pflanzenvirengruppen, eingeführt seit 1971 (Harrison et al., 1971). Seit dem sechsten Internationalen Kongress der Virologie in Glasgow 1995 wurde durch das ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) eine Neuordnung der Pflanzenviren in Familien, Gattungen und Arten vorgenommen. Demnach umfaßt die Familie *Tombusviridae* die Gattungen *Tombusvirus* mit 13 definierten Arten und die Gattung *Carmovirus* mit 13 definierten und 8 möglichen Arten (Russo et al.,1994).
Die Schädigung der Pflanze beginnt mit der Virusinfektion. Das Virus wird in die Pflanzenzelle aufgenommen und nach Kollabieren der Virushülle wird die Virus-RNA freigesetzt. Hier beginnt der Infektionszyklus, in dessen Verlauf das Virusgenom repliziert wird, die Proteine hergestellt werden und neue Viruspartikel entstehen (Abb. 2).

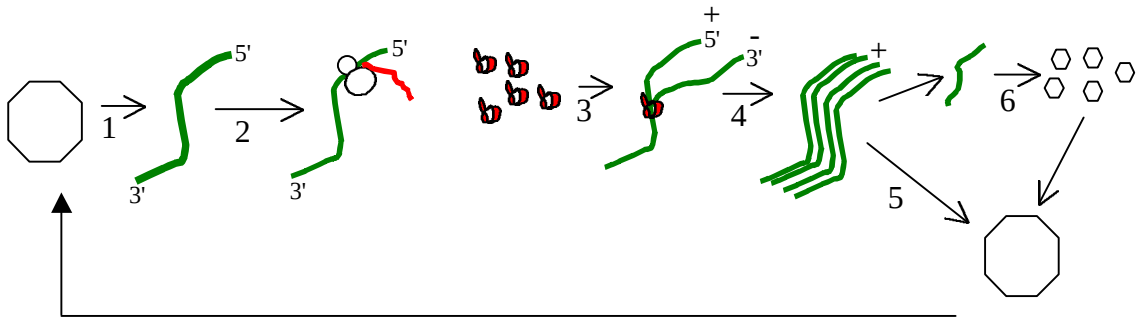


Abb. 2: Modell des Lebenszyklus eines Tombusvirus.
Ein Viruspartikel infiziert eine Pflanzenzelle und die RNA (+Strang) wird entpackt (1). An den Wirtsribosomen erfolgt die Translation der Replikase (2), die ihrerseits die komplementäre RNA (-Strang) synthetisiert (3). Diese Synthese findet, je nach Virusart an der Peroxisomen- oder Mitochondrienmembran statt. Die komplementäre RNA dient als Matrize für die Replikase, um sehr viele + RNA-Stränge herzustellen (4), die in Virushüllen verpackt werden (5). Die Virushülle wird von der Sg1 (Subgenomische RNA1 siehe auch Abb. 3) synthetisiert (6).

Die genetische Information der Tombusviren besteht aus einem einsträngigen, linearen, positiven, RNA-Molekül (genomische RNA), das ca. 4700 Nukleotide lang ist. Die RNA wird in eine

Proteinhülle, die isometrische Partikel von 30 nm Durchmesser bildet, verpackt. Die genomische Organisation kann von den kompletten Nukleotidsequenzen folgender Vertreter abgeleitet werden: CNV (Rochon und Tremaine, 1989), CyRSV (Grieco et al., 1989) und TBSV-cherry (Hearne et al.; 1990). Demnach besitzt die genomische RNA fünf offene Leseraster (ORF), die für Proteine von voraussichtlich 33 kDa, 92 kDa, 41 kDa, 22 kDa und 19 kDa kodieren (Abb. 3).

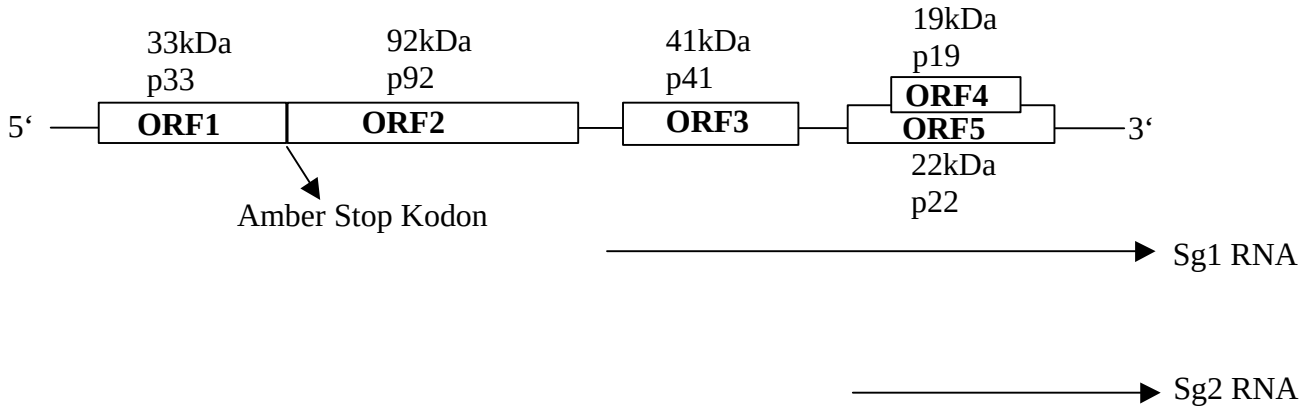


Abb. 3: Schematische Darstellung der genomischen Organisation eines Tombusvirus.
Die Proteine p33 und p92 haben die Funktion einer Replikase. Das p41 Protein ist das Hüllprotein und die Proteine p19 und p22 sind unter anderem für die Ausbreitung des Virus in der Pflanze verantwortlich. Sg1 und Sg2 bezeichnen die subgenomischen RNA-Moleküle die für die Expression der Proteine notwendig sind.

Untersuchungen an Arten der Tombusviren (CyRSV, CNV, TBSV) belegen, daß die einsträngige, genomische RNA, die in den Viruspartikeln verpackt wird, als mRNA für die Expression der Gene (ORF 1 und 2) fungiert, die sich am 5'Ende des RNA Moleküls befinden (Abb. 3). Gereinigte genomische RNA, die *in vitro* translatiert wurde, produzierte ein 33 kDa Protein, das den Voraussagen des ORF1 entsprach. Nach Zugabe von Kälber-Leber-tRNA, die das Amber Stop Kodon zu supprimieren vermag, wird das *read through* p92 Protein produziert, das dem ORF2 entspricht (Hayes et al.,1988). Die Gene in der Mitte und am 3'Ende der genomischen RNA werden über die Bildung zweier subgenomischer RNA's (Sg1 und Sg2) exprimiert. Sg1 und Sg2 werden in der Pflanzenzelle gebildet, werden aber auch in die Virushülle verpackt (Burgyan et al., 1986; Russo et al., 1988; Hayes et al., 1988; Johnston and Rochon, 1990). Die Sg1 wird viel effizienter verpackt im Vergleich zur Sg2. Offensichtlich enthält die Sg1-Sequenz Signalbereiche, die für eine Verpackung in die Virushülle notwendig sind und die der Sg2 bereits fehlen. Die größere subgenomische RNA1 kodiert das ORF3 und die überlappenden ORF4 und ORF5, wobei nur ORF3 in ein Protein translatiert wird. Die Proteine des ORF4 und ORF5 werden über die subgenomische RNA2 translatiert (Hayes et al., 1988).
Die Aminosäuresequenz des Proteins p33 enthält keinerlei Motive, die auf eine Funktion hinweisen. Veränderungen des Leserasters des Proteins bewirken aber den Stop der Replikation (Dalmay et al., 1993). Es wurden jedoch zwei zentrale hydrophobe Segmente identifiziert, die für eine stabile

Integration des Proteins in eine Membran sprechen (Rubino et al., 1998). Weitere Versuche mit Membrankomponenten aus infizierten Pflanzen belegen, daß die Replikase nicht durch Detergentien abgewaschen werden kann und sehr wahrscheinlich über einen *Loop* in der Membran integriert ist Rubino et al., 1998).

Die Aminosäuresequenz des 92 kDa Proteins enthält acht konservierte Motive, wie sie typisch für RNA abhängige RNA Polymerasen sind (Koonin, 1991). Die Expression des 92 kDa Proteins alleine kann aber das Fehlen des p33-Proteins nicht ersetzen. Offensichtlich sind beide Proteine für die Replikation des Virus notwendig.

Versuche mit Antikörpern, die gegen das 33 kDa Protein und 92 kDa Protein gerichtet sind zeigen, daß die Proteine mit den Membranen der *multi vesicle bodies* (MVB) assoziiert sind (Bleve-Zacheo et al., 1997). MVBs entstehen aus Peroxisomen oder Mitochondrien einer virusinfizierten Zelle. Die einzelnen Vesikel der MVBs enthalten dsRNA, welche die replikative Form der Virus-RNA ist (Appiano et al., 1986). Dieser Befund verstärkt die Hypothese, daß die MVB's die Replikationsorte des Virus sind (Abb. 4).

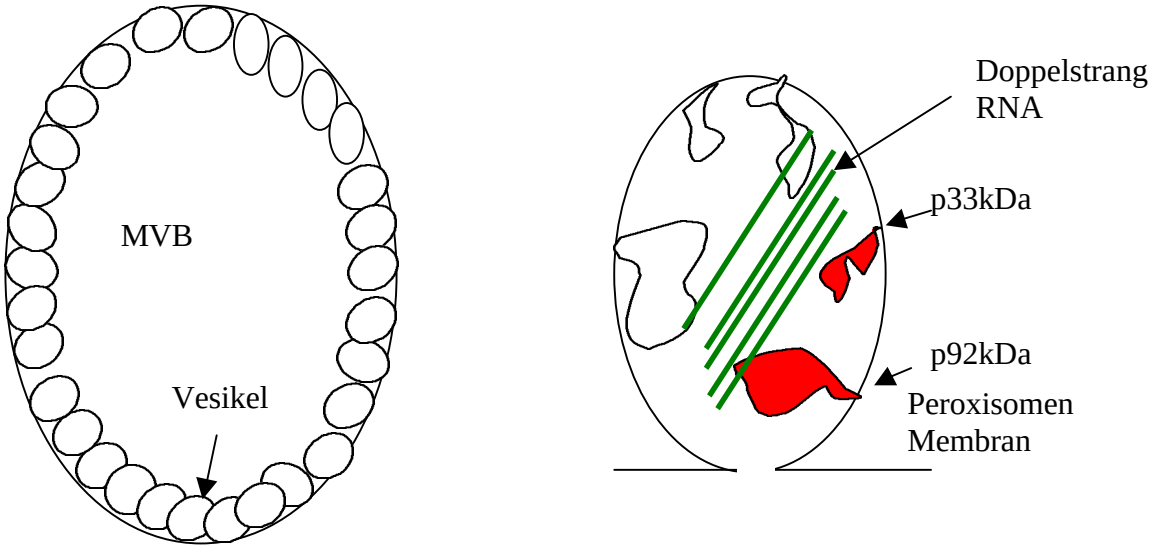


Abb. 4: Modell für die virale Replikation an der Peroxisomenmembran.
Links: Modell eines *multi vesicle bodies* (MVB), entstehend bei einer viralen Infektion in *N. benthamiana* aus Peroxisomen oder Mitochondrien. Rechts: Detaildarstellung eines noch offenen Vesikels. Das Vesikel ist in Richtung des cytoplasmatischen Raumes offen, enthält die Proteine p33 und p92 so wie doppelsträngige RNA, die replikative Form des Virus. In einem fortgeschrittenen Stadium der Infektion wird das noch offene Vesikel ins Innere des Peroxisoms abgeschnürt. Es ist nicht geklärt, in wie weit Proteine der Wirtspflanze an dem Replikationsvorgang beteiligt sind.

Im Zusammenhang mit Tombusvirusinfektionen sind zwei Klassen von Submolekülen beschrieben worden, die repliziert (Celix et al., 1997) und in die Virushülle aufgenommen werden. Es handelt sich um lineare RNA-Moleküle, die für ihre Replikation mit dem Virus (Helfer-Virus) assoziiert vorkommen müssen.

In die erste Klasse werden die Satelliten RNAs (Sat-RNA) die ca. 0,6-0,8 kb groß sind (Gallitelli und Hull, 1985; Celix et al., 1997; Rubino et al., 1990) eingeordnet. Dabei handelt es sich um lineare Moleküle, die während der Replikation in RNA-Doppelstrangform vorkommen. Es gibt einige Hinweise, daß Satelliten-RNA durch Interaktionen mit dem Pflanzengenom entstehen und Teile der Wirtssequenzen enthalten kann (Simon et al., 1987; Collmer et al., 1991). Sequenzvergleiche mit dem Helfer-Virus ergaben eine Homologie in der 5'- und 3'-Region der Virus-RNA und einer zentralen Sequenz von ca. 50 Nukleotiden, die bei allen Vertretern der Gattung *Tombusvirus* konserviert ist.

Diese Sequenzbereiche finden sich auch in der zweiten Klasse der Submoleküle wieder, der *defective interfering* RNA (DI-RNA). Diese Moleküle sind kleiner (0,4 kb-0,7 kb) und entstehen bei experimenteller Inokulation des Tabaks *Nicotiana benthamiana* durch die stufenweise Deletion des Virusgenomes (White und Morris, 1994). Ein Auftreten der DI-RNA in natürlichen Systemen ist nie beschrieben worden (Celix et al., 1997).

In Zusammenhang mit Tombusvirusinfektionen bei Kulturpflanzen sind Tombusviren-Epidemien in Gewächshäusern und auf Feldern in Südamerika (Pontis et al., 1968), Kalifornien (Gerik et al., 1990), Marokko (Fischer und Lockhart, 1977), Portugal (Borges et al., 1979), Tunesien (Cherif und Spire, 1983) und Spanien (Luis-Arteeaga et al., 1996) beschrieben worden. Die Bekämpfung der Virose ist schwierig und mit hohen Kosten verbunden. Bodenentseuchungen z. B. sind in Deutschland nicht mehr erlaubt. Dies macht die Suche nach einem Schutz der Pflanzen gegenüber der Viruskrankheit verständlich. Die gezielte Züchtung krankheitsresistenter Pflanzen begann kurz nach Entdeckung der Mendelschen Gesetze. Gezielte Kreuzungen erlauben die Züchtung verschiedener Pflanzenarten mit Resistenzen gegenüber Krankheiten. Unglücklicherweise entwickeln die Pathogene ihrerseits Strategien, um diese Resistenzen aufzuheben oder zu umgehen. Neben der Züchtung virusresistenter Pflanzen mit klassischen Kreuzungsverfahren stellt pathogen abgeleitete Resistenz in transgenen Pflanzen mit Hilfe der Gentechnik eine zusätzliche Möglichkeit dar, den Pool der Parentalgeneration für Kreuzungen zu erweitern oder die Pflanzen mit den gewünschten Eigenschaften direkt zu nutzen.

Das Hüllprotein von *tobacco mosaic virus* (TMV) war das erste Gen, das benutzt wurde, um virusresistente transgene Pflanzen zu erzeugen (Powel et al., 1986). Dies war der Start für die Etablierung einer großen Anzahl virusresistenter Pflanzenlinien mit Hilfe der Gentechnik. Eine Reihe verschiedener Virussequenzen (Replikase, Hüllproteine oder mutierte nicht funktionelle Derivate dieser Gene) wurden benutzt, um mittels Gentechnik eine pathogenabgeleitete Virusresistenz zu erzeugen (Baulcombe, 1996; Beachy, 1997; Lomonossoff, 1995; Scholthof et al., 1993).

Transformationen mit DI-RNA (Kollar et al., 1993; Stanley et al., 1990; Rubio et al., 1999) und Sat-RNA (Gerlach et al., 1987; Harrison et al., 1987) führten ebenfalls zur einer Virusresistenz in transformierten Pflanzen.

Verschiedene Modelle werden für die Erklärung der gentechnisch induzierten Virusresistenz in Pflanzen herangezogen. Transgene Pflanzen, die das Hüllprotein des Virus im Überschuß exprimieren, verhindern das Entpacken des Virus, das die Zelle infiziert (Osborn et al., 1989; Clark et al., 1995; Powel, 1990). Werden dennoch einige Partikel entpackt und repliziert, wird die RNA sofort gebunden und der Infektionszyklus unterbrochen (Reusken et al., 1994; Taschner et al., 1994). Ein ähnlicher "Blockierungs-Mechanismus" wird für die Expression der Replikasen diskutiert, da man von einer Regulation der Expression der Replikasen durch das Virus ausgeht. In Versuchen mit Viren, die Submoleküle enthalten, wurde beobachtet, daß diese Moleküle im Vergleich zur genomischen RNA viel stärker akkumuliert werden. Diese Beobachtung wurde in den Versuchen, eine transgene Pflanze zu erzeugen, ausgenutzt. Die Pflanzen, die DI-RNA oder Sat-RNA exprimierten, blieben nach Inokulation symptomfrei, da die angebotene RNA viel stärker repliziert wurde als die genomische RNA der Viruspartikel (Gerlach et al., 1987; Harrison et al.,1987; Kollar et al., 1993; Zaccomer et al., 1993).

Erstaunlicherweise können bei den Transformationsereignissen keine verläßlichen Voraussagen darüber getroffen werden, ob eine Pflanze, die das Transgen trägt, eine Resistenz ausbildet oder nicht. Manche Pflanzenlinien, die das Transgen in einem hohen Level exprimieren, bleiben gegenüber der Virose empfindlich, andere Linien, die kaum transgene RNA produzieren, zeigen eine hohe Resistenz (Lawson et al., 1990). Postuliert wurde in diesem Zusammenhang eine Verbindung zwischen Resistenz und post-transkriptionaler Suppression der RNA (Lindbo et al., 1993; Van den Boogaart et al., 1998). Die post-transkriptionale Suppression wird ausgelöst durch Sequenzen, die eine Homologie zu transformierten Genen aufweisen (English et al., 1996). Dieser Mechanismus operiert höchstwahrscheinlich auf dem Level der RNA-Expression. Wird die Zelle mit DNA oder RNA, die Sequenzhomologien zum Transgen aufweist, infiziert bewirkt das eine Reaktion, infolge derer die Expression dieser Gene unterbunden wird. Diese Virusresistenz wird auch homologieabhängige Resistenz genannt (Mueller et al., 1995). Eine der möglichen Erklärungen für dieses Phänomen könnte die Bildung eines *sens-antisense* Duplex-RNA-Moleküls sein. Angenommen wird, daß dies möglich ist, wenn Pflanzenreplikasen die transgene RNA in die komplementäre RNA umschreiben (Schiebel et al., 1993 a/b). Die Doppelstrang-RNA-Form könnte dann von RNAsen, die spezifisch Doppelstrangformen angreifen, abgebaut werden. Der Translationsvorgang ist durch die Bildung von Duplex-Molekülen unmöglich, was einen indirekten Einfluß auf die Stabilität der RNA hat (Nicholson, 1996; Green, 1993). Eine andere Möglichkeit stellt die transkriptionale Suppression dar (Jones et al., 1998). Postuliert wird eine ektopische Paarung der DNA oder eine DNA-Methylierung. Beide Vorgänge verhindern, daß weder die transgene RNA, noch die Virus-RNA gebildet werden (English et al., 1996; Sijen et al., 1996). Da dieses Forschungsfeld erst seit ca. 10 Jahren intensiv

bearbeitet wird, sind gesicherte Aussagen, wie die Pflanze eine Invasion fremder RNA erkennt und verhindert, nicht möglich.

Wie oben dargestellt gibt es prinzipiell zwei mögliche Wege, um Resistenz in Pflanzen zu erzeugen. Die erste Möglichkeit besteht darin, mittels klassischer Kreuzung aus ausgewählten Arten, die eine Virusresistenz oder Toleranz aufweisen, eine Resistenz einzubringen. Im Falle der Statice wäre dieses Verfahren nur dann möglich, wenn Wildpopulationen oder resistente Arten zur Verfügung ständen, die als Ausgangsmaterial dienen könnten. Dies ist bis jetzt nicht untersucht worden. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der eingeschränkten Samenbildung der Pflanze im Gewächshaus. Die Samen werden gar nicht oder nur eingeschränkt gebildet. Dieses Problem müsste für die klassische Kreuzung gelöst werden. Eine weitere Möglichkeit, um Resistenzen oder andere Eigenschaften in Pflanzen zu erzeugen, ist die molekulare Züchtung. Diese basiert auf der Fähigkeit, fremde Gene in Pflanzen einzubringen und zu exprimieren. Diese Art der Züchtung ist schneller, wenn man über die Methode der Regeneration der Pflanze, ausgehend von Einzelzellstadien verfügt. Die Strategien, die am häufigsten für den DNA-Transfer in die Pflanze benutzt werden, sind Elektroporation, Partikelbeschuß und agrobakteriumvermittelte Transformation.

Das Agrobakterium ist zu einem allgemeinen Werkzeug für viele Molekularbiologen geworden. In natürlicher Umgebung agiert Agrobakterium als Pathogen an Pflanzen. Zwei Arten sind eingehend studiert worden: *A. tumefaciens* und *A. rhizogenes*. *A. tumefaciens* induziert Tumorentwicklung, wogegen eine Infektion mit *A. rhizogenes* zur Bildung haariger Wurzeln führt. Diese Veränderungen an Pflanzen werden durch die Übertragung von bestimmten Abschnitten der Agrobakterium-DNA verursacht. Diese Übertragung ist nur Möglich an geschädigten Kutikula der Pflanzen. Eine verletzte Pflanze produziert eine Anzahl von Substanzen (z.B. Azetosyringon), die ihrerseits eine Signalkaskade im Bakterium auslösen, die dazu führt, daß bestimmte Sequenzen des Ti-Plasmids (*Tumor inducing plasmid*) in die Pflanzenzelle übertragen und dort stabil integriert werden (Thomashof et al., 1980; Mayerhofer et. al 1991; Tinland et. al., 1995).
Die T-DNA (T-DNA; *transferred* DNA) enthält Gene für Tumor-Entwicklung und für die Produktion von einer Reihe ungewöhnlicher Aminosäuren, den Opinen. Die meist verbreiteten Arten von Opinen sind Octopine und Nopaline. Opine werden von der Pflanzenzelle produziert und fungieren als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle für die Bakterien. Die T-DNA enthält keine Sequenzen, die für den Transferprozess wichtig sind. Nur die *cis*-agierenden Elemente von 25 bp (*Left-border, right-border*), sind für die Übertragung in die Pflanzenzelle notwendig. Es ist möglich, zwischen diesen beiden Sequenzen beliebige DNA-Abschnitte einzufügen. Diese werden dann mit Hilfe der *vir*-Gene (virulenz Gene, die für den Transfer von T-DNA benötigt werden) in die Pflanzenzelle übertragen. Die Integration der DNA in das Pflanzengenom ist nicht gerichtet, sondern kann an jeder beliebigen Stelle erfolgen.

Produziert die Pflanze aber sekundäre Metaboliten, die die Aktivierung der *vir*-Gene verhindern (Sahi et al., 1990), kann keine Übertragung von DNA stattfinden. Alle diese Aspekte der agrobakterienvermittelten Transformation sollten im Hinblick auf die Staticengewebekultur berücksichtigt werden.

Die Transformation der Pflanzen mit dem Agrobakteriensystem ist in sehr vielen Fällen einfach, effizient und kostengünstig (Boulton et al., 1989; Chan et al., 1992; Conner und Dommisse, 1992; Gould et al., 1991; Mooney et al., 1991; Raineri et al., 1990 und 1993). Um eine Pflanze erfolgreich zu transformieren, muß diese einige Voraussetzungen erfüllen. Diese Pflanze muß die Fähigkeit zur Regeneration besitzen. Die Regeneration kann über das Bilden eines Kallusgewebes, über die Embryogenese oder die Stecklingsvermehrung erfolgen (Abb. 5). Sehr viele Pflanzen sind in der Lage, über ein Kallusstadium neue Sprosse und Blätter zu bilden.

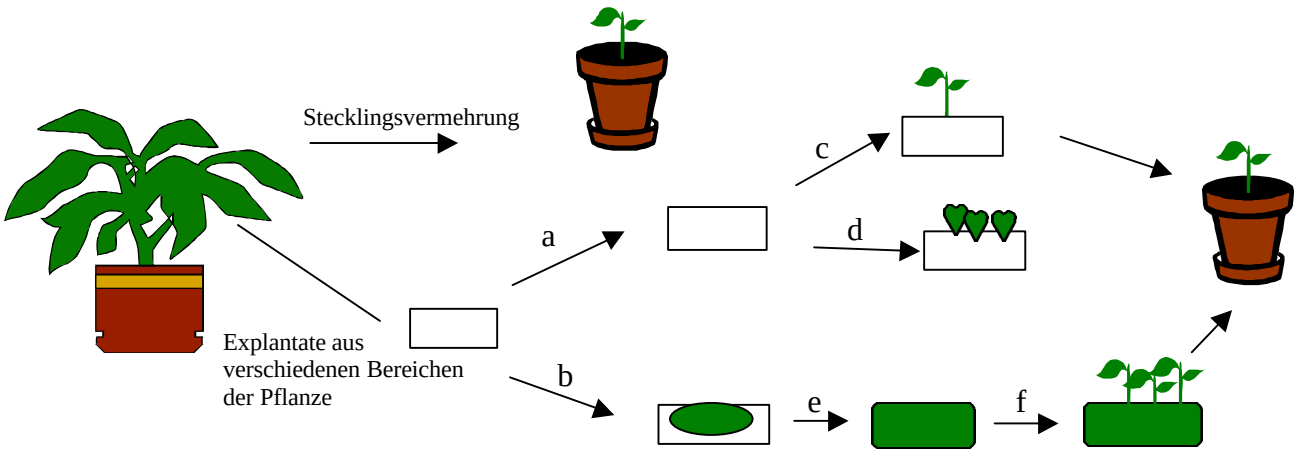


Abb. 5: Schematische Darstellung einiger der Möglichkeiten der Propagation von Pflanzen *in vitro*.
Eine Möglichkeit stellt die Stecklingsvermehrung dar, die andere ist die direkte Morphogenese (a) bei der die Pflanze dann entweder Adventivsprosse (c) oder somatische Embryonen (d) ausbildet oder die indirekte Morphogenese (b) bei der ein Kallusstadium gebildet wird (e), aus dem dann Adventivsproße gebildet werden (f).

Kallus wird in der Natur als Wundverschluss gebildet. Werden Pflanzen durch äußere Einflüsse verletzt, können Parenchymzellen des Grundgewebes durch Rückdifferenzierung wieder meristematisch werden und als Kallus die Wunde verschließen. Bei der Bildung dieses Wundkallus kommt es zur einer starken Produktion von Phytohormonen. Auxine und Cytokinine, regen die Zellen zu erneuten Teilungen an. Nach Schließung der Wunde wird die Hormonproduktion wieder eingestellt. Appliziert man eine bestimmte Menge und Kombination der Pflanzenhormone an

geeignetes Pflanzenmaterial, ist es möglich, ein künstliches Kalluswachstum anzuregen. Dieses Wachstum der Zellen erweist sich als besonders günstig für die agrobakteriumvermittelte Transformation.

Pflanzenhormone sind chemische Botenstoffe die eine Veränderung des Gewebes bewirken. Als klassisches Beispiel wird die Synthese von Gibberellin in Getreidesamen angesehen. Das synthetisierte Hormon diffundiert zur Auleuronschicht des Embryos und bewirkt eine Sekretion der hydrolytischen Enzyme. Die bisher bekannten Pflanzenhormone werden aufgrund ihrer Struktur und Wirkung in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Auxine zu denen z. B. 1-Naphtalen Acetat Säure (NAA) gehört, bewirken unter anderem das Zellwachstum, Ausbilden der adventiven Wurzel und adventiven Sprosse, Kallusformation und Wachstum. Eine andere Gruppe sind die Cytokinine, zu denen das Hormon *Kinetin* (KIN) zugerechnet wird. Diese Substanz bewirkt unter anderem adventive Sproßbildung, Wurzelwachstumsinhibition, Zellteilung, Kallusformation, Seneszensverzögerung. Für eine erfolgreiche Regeneration ist die Interaktion der Auxine und Cytokinine von entscheidender Bedeutung (Abb. 6). Die Kombinationen und Konzentrationen müssen für jedes Gewebe empirisch ermittelt werden.

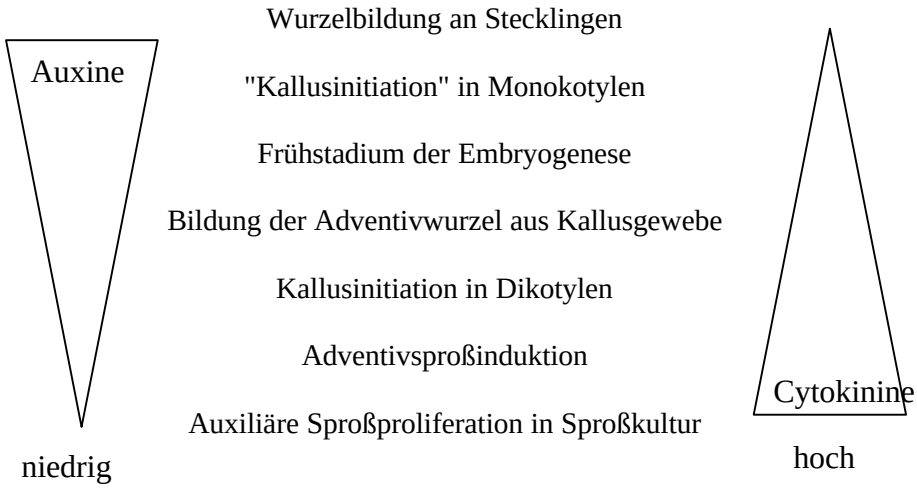


Abb. 6: Auswirkungen der Konzentrationen und Kombinationen der Phytohormone auf das Pflanzengewebe.
Über die Auswirkung auf das Gewebe entscheidet die Konzentration und Kombination der jeweiligen Phytohormone. Diese Bedingungen müssen für jedes Gewebe empirisch ermittelt werden.

Es gibt mehrere Staticenarten, die weltweit ein Interesse in der Gartenbauindustrie finden. Die *in vitro* Arbeiten mit einigen Arten (Kunitake et al., 1995; Matsumoto et al., 1997; Martin et al., 1995; Amomarco et al., 1998) beziehen sich auf die Effizienz der Vermehrung und die Kryopreservation von

in vitro-Material. Ein Transformationsprotokoll ist für keine dieser Arten erstellt worden. *Goniolimon tataricum* ist eine Staticenart die auf Grund ihrer Eigenschaften in der Trockenblumenindustrie sehr geschätzt wird und regional einen hohen Stellenwert besitzt.

Das Ziel dieser Arbeit war daher eine eingehende Charakterisierung des neuen Virus, die Herstellung einer infektiösen cDNA-Kopie, die als Vorlage zur Subklonierung der resistenzerzeugenden Sequenzen dienen sollte und die Etablierung der Regenerations- und Transformationsprotokolle für die mehrjährige Statice. Die Sequenzen sollten in geeignete Transformationsvektoren eingebracht und diese für die spätere Produktion bereitgestellt werden.

III. Material und Methoden

1. Chemikalien und Materialien

Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn im Text nicht speziell darauf hingewiesen, von den Firmen Boehringer (Mannheim), E. Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Difco Laboratories (Detroit, MI, USA) bezogen. Restriktionsenzyme und andere DNA-modifizierende Enzyme oder DNA-Standards wurden von der Firma Eurogentec (Belgien) und GibcoBRL (Eggenstein) bezogen. Die verwendeten Nitrocellulosemembranen (Highbond-N^+) wurden von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen. Die Medien für die Gewebekultur der Statice wurden bei Duchefa Biochemie BV (Niederlande) gekauft. Verbrauchsmaterial wurde hauptsächlich von Fischer LabWorld (Nidderau) und Firma NeoLab (Heidelberg) bezogen.

1.1 Verwendete Organismen und deren Züchtung

Im Rahmen der Untersuchungen der Virose wurden Pflanzen (Blätter) von Staticen und Ackerbegleitflora von Feldern Heinz Stilgenbauer (Flonheim) gesammelt und mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Elisa) auf das Vorhandensein der Virusinfektion untersucht.
Die Referenzisolate (TBSV-*cherry*, TBSV-BS3) wurden freundlicherweise von Fr. Dr. König (BBA Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Die Staticensamen wurden von der Firma Stilgenbauer und die *Nicotiana benthamiana*-Samen von der Firma Loewe Biochemika, Otterfingen bezogen. Für die cDNA Isolierung und die anschließende Klonierung wurde das Isolat Nr. 33 benutzt. Dieses Isolat stammt von Staticenblättern, die 1994 auf dem Feld "Stilgenbauer Autobahn" gesammelt und bei –80 °C aufbewahrt wurden (Diplomarbeit Britta Wegener, 1994).
Als Anzuchterde wurde Flomaris Orginal Fruhstorfer Erde (Topferde pH 5,5 bis 6,5, Humusgehalt 60%) verwendet. Die Aussaat erfolgte in 12 cm Durchmesser Plastiktöpfen. Nach ca. 3-4 Wochen wurden die Jungpflanzen in 8 cm Töpfe pikiert und später nach Bedarf umgetopft.
Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte unter Gewächshausbedingungen bei Temperaturen zwischen 16 und 25°C. Im Winter wurden die Pflanzen zusätzlich 12 bis 16 Stunden mit Quecksilberdampflampen (HQITS) beleuchtet.
Für die Klonierung der DNA Fragmente wurde der E. *coli* Stamm DH5α von GibcoBRL verwendet. Die Medien wurden, wie bei Sambrook et al., (1989) beschrieben, hergestellt und je nach Versuchsansatz mit Antibiotika und Nachweisreagenzien supplementiert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Antibiotika und Nachweisreagenzien für E. *coli*-Medien

Substanz	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/l
Kanamycin	50 mg/l
Streptomycin	100 mg/l
XGal	40 mg/l
IPTG	8 mg/l

Für die Etablierung eines Transformationsprotokolls für Statice *(Goniolimon tataricum*) wurde ein *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm ATHV (Hood et al., 1986) benutzt (Tabelle 2). Dieser Stamm zeichnet sich durch eine erhöhte Virulenz aus, die durch Gene bedingt ist, die auf dem Helfer-Plasmid lokalisiert sind.

Tabelle 2: Eigenschaften des *Agrobacterium tumefaciens* Stammes ATHV

Stamm	Genomische Antibiotikaresistenz	Helferplasmid	Antibiotikaresistenz des Helferplasmids
ATHV	C58C1 Rif ^{r}	pEHA101	Km ^{r} deletiert

Eine Kolonie wurde gepikt und in 10 ml LB (+Antibiotikum) Medium über Nacht bei 26 °C inkubiert. Diese Vorkultur wurde für die Co-Kultur der Staticenwurzel mit Agrobakterien verwandt.

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Virusmaterial und Propagierung

Die künstliche Infektion einer Pflanze mit Viren oder mit Virus-RNA nennt man mechanische Inokulation. Verwendet wird Pflanzensaft oder RNA-Transkripte in Pufferlösung. Die Blattoberfläche der zu infizierenden Pflanzen wird durch Zugabe von Celite 545 (Fisher Scientific) verletzt. Folgendes Vorgehen erwies sich als das Erfolgreichste:
Eine *Nicotiana benthamiana* Pflanze im 4 Blattstadium wurde mit einem Glasspatel (jeweils 3 Blätter einer Pflanze) abgerieben. Die Abreibungslösung bestand im Falle der Verwendung von Blattmaterial (frisch oder gefroren) aus 0,1 M Natrium Acetat pH 5 und 2% Celite. 5 µl der Lösung wurden für 1 mg Rohmaterial verwendet und in einem Porzellanmörser zerrieben.

Für die Aplifikation von RNA-Transkripten wurde folgender Inokulationspuffer verwendet.

RNA-Puffer: 0,03 M K_2HPO_4
0,05 M Glycin
pH 9,2 eingestellt mit 1 M KOH
1% Bentionit
1% Celite

Der Puffer wird autoklaviert und bei 4°C aufbewart.

Inokulierte Tabak-Pflanzen zeigten nach 3 Tagen typische Einzel-Läsionen, und nach ca. 10 Tagen war die Infektion so weit fortgeschritten, daß eine systemische Infektion der apikalen Blätter vorlag. Pflanzen dieses Stadiums wurden für die Virusisolation benutzt.
Für die Infektion von Staticen-Pflanzen im 5-6 Blattstadium wurde der 0,1 M Natrium-Acetat- Puffer pH 5,2 verwendet. Die verwendeten Pflanzen wurden bei 16°C in der Klimakammer gehalten, da sonst keine Symptomentwicklung erfolgte. Dieses Phänomen wurde bereits von Krczal und Beutel, (1994) beschrieben.

2.2 Virusreinigung

Von *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen mit systemischer Infektion wurden die Blätter abgeerntet und gewogen mit 0,3 g/ml 0,1 M Natrium-Acetat Puffer pH 5,2 versetzt mit 250 µl Merkaptoethanol (0,25%) im Mixer bei möglichst 4°C zerkleinert, bis ein homogener Brei entstand. Dieser wurde durch ein Käsetuch gefiltert und der aufgefangene Saft 0,5 h auf Eis stehengelassen. Anschließend wurde die Lösung bei 10000 rpm 10 min. bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verarbeitet und das Pellet verworfen. 100 ml des Überstandes wurden 1,1 g NaCl und 8 g PEG 6000 oder 8000 versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt, bis sich das Salz gelöst hat. Die Lösung soll trüb sein. Nach einer 1-stündigen Inkubation auf Eis wurde erneut bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 4 ml 0,02 M Natrium Acetat Puffers überschichtet. Bei 4°C während der folgenden 2 Stunden wurde das Pellet angelöst und kann dann mit vortexen vollständig gelöst werden. Eine erneute Zentrifugation bei 10000 rpm 10 min. und 4°C klärte die Suspension, der gewonnene Überstand wurde einer Zentrifugation bei 36000 rpm 1 h unterworfen um die Viruspartikel zu sedimentieren. Die pelletierten Viren wurden über Nacht mit 0,3 ml 0,02 M Natrium Acetat Puffers pH 5,2 angelöst, und dann in einer 1:10 Verdünnung im Photometer gemessen.

2.3 Photometrische Messung

Virussuspension

Für Tombusvirusisolate gilt der Richtwert bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht 1 mg/ml Viruskonzentration dem Extinktionswert von 4-5. Anhand dieser Angaben konnte die Ausbeute der Virusisolation bestimmt werden (mündliche Mitteilung Prof. Dr. Russo).

2.4 RNA-Isolation aus Pflanzen- und Virusmaterial

Virusmaterial

200 µl der Virusisolation (3,5 mg/ml) wurden mit 200 µl 1x EB Puffer versetzt und kurz gevortext. Sofort wurden 400 µl Phenol zugegeben und 1 min. gevortext. Eine 2 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm trennt die Lösung in zwei Phasen, von der die obere mit 400 µl Phenol/Chloroform (1:1) gemischt und 1 min. gevortext wurde. Es wurde erneut 2 min. bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde dann mit 400 µl Chloroform gevortext, und eine Zentrifugation 1 min. bei 13000 rpm erlaubte die Überführung der oberen Phase in ein neues Cup, das mit 100%igem Ethanol aufgefüllt wurde. Es wurde 15 min. bei 13000 rpm zentrifugiert, das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und 5 min. getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl DEPC-Wasser gelöst.

Pflanzenmaterial

1cm^2 Blattmaterial wurde in einem kaltem Mörser zerrieben und mit 600 µl 1xEB Puffer aufgenommen. Es wurden 600 µl Phenol zugegeben und 1 min. gevortext. Nach 2 min. Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die wässrige Phase mit 400 µl Phenol/Chloroform (1:1) gemischt und gevortext. Erneute Zentrifugation bei 2 min. und 13000 rpm trennt die Phasen. Die obere wurde abgezogen, mit 400 µl Chloroform gemischt, und die Suspension wurde 1 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml 100%igem Ethanol gefällt (30 min. bei –20°C). Eine Zentrifugation von 15 min. bei 13000 rpm pelletierte die RNA. Diese wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet (5 min.). Das Pellet wurde in 25 µl DEPC-Wasser aufgenommen. 3 µl wurden mit 3 µl der FDE-Lsg. 5 min. bei 65°C denaturiert, und nach einer 1 min. Inkubation auf Eis in einem RNAse freiem 1%igem TBE Gel bei 100 V aufgetrennt. Verbleibendes RNA-Material wurde bei –80°C aufbewahrt.

FDE-Lsg.
900 µl Formamid deionisiert
20 µl EDTA 0,5 M (pH8)
80 µl DEPC-H_20
Kristalle Bromphenolblau.

10xEB-Puffer 100 ml

7,7 g Glycin

5,8 g NaCl

20 ml EDTA 0,5 M (pH 8)

in sterilem Wasser lösen und mit NaOH (1 M) auf pH 9 einstellen. Aufbewahren in einer dunklen Flasche.

Bei Bedarf werden für 100 ml folgende Reagenzien zugegeben:

10ml 10xEB Puffer

+ 2 g SDS

+ 1 g Lauroyl Sarcosine, (Sigma)

mit sterilem H_2O auf 100 ml aufgefüllt.

2.5 DNA-RNA-Hybridisierung (*Northern blot*)

Die Detektion der Virus-RNA in Pflanzenmaterial erfolgte unter Verwendung der DNA-RNA Hybridisierung. Bei dieser Technik wurde die RNA denaturiert und auf einer Membran immobilisiert. Mit DIG markierter DNA (entspricht einem Fragment der cDNA, siehe Material und Methoden Teil cDNA Herstellung) erfolgte die spezifische Detektion der viralen RNA. 2,3 µl der gewonnenen RNA (siehe Teil RNA-Extraktion) wurde mit 4,5 µl DMSO; 0,9 µl 100 mM NaH_2PO_4; 1,2 µl Glyoxal bei 50°C 1 Stunde inkubiert und auf Eis abgekühlt. Zu diesem Ansatz wurde 1 µl LD-RNA-Lsg. zugegeben und in einem 1,2%igem Gel in 10 mM NaH_2PO_4 Puffer aufgetrennt (80 V ca. 2 h). Kammer und Kämme wurden vor der Auftrennung mindestens 1 h lang mit 3%igem H_20_2 behandelt. Nach der Auftrennung wurde das Gel 15 min. in einer Denaturierungslösung und dann weitere 15 min. in einer Neutralisationslösung inkubiert. So vorbereitet wurde das Gel wie in Sambrook et al., (1989) beschrieben in einer 20xSSC Kammer über Nacht geblotet. Nach Übertragung der RNA auf die Membran wurde diese getrocknet und bei 80°C 2 h lang gebacken. Die Membran wurde mit Hybridisierungslösung mind. 1 h bei 50°C behandelt, um die Stellen auf der Membran abzusättigen, an welchen keine RNA gebunden ist. Die vorbereitete Sonde (DIG-markierte DNA, Produkt Boehringer Mannheim, vorbereitet nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von 1 µg Plasmid-DNA) wurde 10 min. bei 100°C im Wasserbad erhitzt und schnell auf Eis abgekühlt. 10 ml neue Hybridisierungslösung und die denaturierte Sonde wurden zu der Membran zugegeben und über Nacht inkubiert. Da die Sonde bei 50°C auch unspezifische Bindungen eingeht, wurde bei 60°C die Membran mit 1xSSC+0,1% SDS jeweils 2x15 min. gewaschen und anschließend mit 0,2xSSC+0,1% SDS 2x15 min. behandelt. Die Signalentwicklung erfolgte laut den Angaben der Firma Boehringer Mannheim für das Produkt Signalentwicklungskit für DIG-markierte Sonden.

Herstellung von Glyoxal-Lsg.

Das in diesem *Northern blot* verwendete Glyoxal muß deionisiert werden, deshalb wurde es aufgelöst und mit Ionenaustauschern behandelt. 4 g Glyoxal wurden in 10 ml DEPC-Wasser gelöst und mit Dowex 1 (Drymesh 100-200) und Dowex Type 50w x 8 100-200 (Sigma) zu 15 ml aufgefüllt, wobei die Ionenaustauscher 1:1 eingesetzt wurden. Diese Mischung wurde 2 h auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert, anschließend durch einen Sterilfilter 0,45 µm in Cups a 50 µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Hybridisierungslösung

0,5 M NaH_2PO_4 + 1 mM EDTA wurden mit 10 M NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Zu dieser Lösung wurden 7% SDS und 1% BSA zugegeben und unter Zuführung von Wärme (max. 50°C) so lange gerührt bis die Lösung klar und gelb war. Die Lösung wurde dann durch einen Faltenfilter gegeben und in 30 ml Aliquots bei -20°C eingefroren. Die Lösung darf niemals in der Mikrowelle getaut oder angetaut werden, da sonst die Blockungseigenschaften durch die veränderte Proteinstruktur des BSA verlorengehen.

Denaturierungslösung: 0,05 M NaOH/1,5 M NaCl

Neutralisationslösung: 0,5 M Tris (HCl pH 7,5)/1,5 M NaCl

2.6 cDNA-Synthese (*Random Priming*)

Da die Tombusviren über ein RNA-Genom verfügen, war es nicht direkt möglich, das Virusgenom zu klonieren. Vielmehr war es notwendig eine Anzahl von cDNA Klonen zu erhalten, diese zu sequenzieren, spezifische Primer abzuleiten und mit Hilfe der PCR-Technik einen infektiösen Klon herzustellen. Die cDNA-Klone wurden mit *random* Primern hergestellt. Die cDNA-Synthese wurde nach folgendem Verfahren durchgeführt:

9,5 µl RNA (6 µg)
+2 µl Random Primer 70 µM
+4 µl 5x Puffer für AMLV reverse Transkriptase (Biolabs)
diese Komponenten werden 10 min. bei 70°C erhitzt und langsam 15 min. bei Raumtemperatur abgekühlt.
+0,2 µl 0,1 M DTT
+0,5 µl HPRI Boehringer
+1 µl dNTP's 20 µM
+1 µl AMLV reverse Transkriptase

Die Lösung wurde 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend wurde das Enzym 1 min. bei 100°C inaktiviert.

2.6.1 Bestimmung der Nukleotidsequenz am 3'Ende und 5'Ende der genomischen RNA des Virus

3'Ende der genomischen RNA des Virus

1 µg der TBSV-BS3-Statice RNA wurde bei 65°C für 15 min. erhitzt und auf Eis abgekühlt. Das 3'Ende wurde nach Angaben des Herstellers polyadenyliert mit *poly(A) polymerase* (Bethesda Research Laboratories, BRL). Die polyadenylierte RNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Die RNA wurde in 10 µl DEPC-Wasser resuspendiert und als Matrize für die cDNA Synthese benutzt. Als Primer wurde Oligo (dT) verwendet, wobei die Reaktion nach dem *cDNA Synthesis Module* (Amersham) nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde.

5'Ende der genomischen RNA des Virus

Die terminale 5'Nukleotidsequenz wurde mit der Methode beschrieben bei Hirzman et al., (1993) determiniert. Die cDNA wurde mit dem Primer RepP4 hergestellt und mit RibonucleaseH verdaut. Die cDNA wurde mit dem QIAquick kit von Quiagen für PCR Aufreinigung gereinigt und in 30 µl eluiert. Der cDNA wurden am 3'Ende mehrere dGTP's angehängt. Das verwendete Enzym war die *terminale deoxynucleotidyl transferase* (BRL) und die Reaktion fand nach den Angaben des Herstellers statt. Die so erhaltene cDNA wurde in einer PCR-Reaktion amplifiziert und in pUC18 *Sma* I kloniert.

2.7 T7-abhängige RNA-Transkription

Tombusviren besitzen am 3'Ende ihres Genoms die Sequenz CCC, die Klonierung der cDNA in einen *Sma* I geschnittenen Vektor führt zur Erhaltung der Schnittstelle und nach einem erneutem Verdau des Vektors mit *Sma* I zu einem korrektem Ende der resultierenden Transkripte.
2 µg der cDNA kloniert in pUC18 wurden mit *Sma* I in 20 µl 1 h bei 25°C verdaut. Nach vollständigem Verdau wurden 20 µl H_2O und 40 µl Phenol/Chloroform (1:1) zugegeben. Eine Zentrifugation bei 13000 rpm 2 min. trennt die Phasen und der wässrige Überstand wurde mit 40 µl Chloroform gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand mit 4 µl NaCl 2 M und
88 µl 100%igem EtOH gefällt. Eine Zentrifugation bei 13000 rpm und 10 min. führt zu Pelletierung der DNA, die dann mit 70%igem EtOH gewaschen wurde (2 min. bei 13000 rpm). Die DNA wurde in 67 µl H_2O resuspendiert. Für die Transkription wurden 20 µl RNA dNTP`s (2,5 M jedes), 10 µl 10xT7 RNA Polymerase Puffer, 1 µl HPRI (100 U) und 2 µl T7 RNA Polymerase (100 U Biolabs) zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C 1 h. Nach der Inkubation wurden 2 µl der Reaktion auf einem TBE-RNA-Gel überprüft. War die Reaktion erfolgreich wurde 100 µl eiskalter Inokulationspuffer für RNA Transkripte zugegeben und je 10 µl pro Blatt (je 3 Blätter pro Pflanze) mit einem Glasspatel appliziert.

2.8 PCR

Die Synthese der cDNA erlaubt eine Amplifikation des Virusgenomes und dessen Klonierung. Um die Klonierung von PCR-Amplifikaten zu erleichtern, wurden die entsprechenden Primer vor der PCR-Reaktion an ihrem 5'-Ende phosphoryliert.

Reaktionsansatz: 5 µl Oligonukleotide (100 µM)
2,5 µl 10x PNK-Reaktionspuffer (Boehringer Mannheim)
2,5 µl 10x10 mM ATP
1 µl T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl Boehringer Mannheim)
14 µl H_2O

Der Ansatz wird für 15 min. bei 37°C inkubiert und anschließend wurde das Enzym bei 75°C 10 min. deaktiviert.

Die so vorbereiteten Primer (Primer-P) werden in die PCR-Reaktion eingesetzt. Der Ansatz erfolgte in 100 µl Volumen.
78,5 µl H2O
+2 µl dNTP's 10 mM
+2 µl Primer-P(1)
+2 µl Primer-P(2)
+5 µl cDNA
+10 µl 10xPCR Puffer+$MgCl_2$
+0,5 µl *Vent* DNA Polymerase (Biolabs)

PCR Programm:

Denaturierung der DNA	95°C	5min.
35 Amplifikationszyklen		
Matrizendenaturierung	95°C	1 min.
Primeranlagerung	45°C	1 min.
Elongation	72°C	1 min. (4 min. für die Herstellung von infektiösen Klon)

Anschließend ein verlängerter Elongationsschritt:

72°C 10 min.

Das Ergebnis der Reaktion wurde durch Auftrennung von 10 µl des Ansatzes auf einem 1%igem TBE Gel überprüft.
Folgende Primer wurden sowohl für die PCR als auch für die Sequenzierungsreaktionen eingesetzt. Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, in PSF-gereinigter Qualität bezogen.

5'ENDE	5'ACG CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AAA TTC CCC AGG-3'
CPP1	5'-CAC AAA CAC AAG AGA TGG-3'
CPP2	5'-AGT ATG TCA TTA ATA ACC-3'
CPP3	5'-GTA TAG CTC GTT CCA TGG-3'
CPP4	5'-TGT TGA GTA CAC GAC GGC-3'
CPP5	5'-AAA CCC ACT GCC GAT TGT AGC-3'
CPP6	5'-GAC ATC TGG ATC TGT CAC-3'
1610-1627	5'-GCG GCA TAT GGA ATC CAA-3'
P22NcoI	5'-TCA TGG ATA CTG AAT ACG-3'
RepP1	5'-GTA GTA TGA CAG GAA ACC-3'
RepP2	5'-AAT TCT GCC AGG CAC ACC-3'
RepP3	5'-GGC GGC AGG TTT AGC GCT-3'
RepP4	5'-GGC TAG CGC GCA TAT AGG-3'
RepP5	5'-AAC CTG GAG TAG AAT CGC-3'
IR28	5'-GGG CTG CAT TTC TGC AAT G-3'

Für die Amplifikation der Replikasefragmente die benutzt wurden, um die Transformationsplasmide und die Plasmide für die Proteinexpression herzustellen, wurden zusätzlich folgende Primer benutzt:

Rep5'prt33	5'-ACG ATC GCG GCC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GAG ACC ATT AAG AGG ATG AT-3'
Rep5'prt55	5'-ACG ATC GCG GCC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GGA GGC CTA GTA CGT CTA CCT-3'
Rep3'prt33	5'-ACC AGT CAG CTG TTT GAC ACC TAG GGA TTC CTG TGA ACC-3'
Rep3'prt55	5'-ACC AGT CAG CTG TGC TAC GGC GGA ATC AAG GAT GCT-3'

2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die erhaltenen PCR-Amplifikate wurden über *low-melting* Gel (Sigma) Extraktion nach folgendem Verfahren gereinigt.

20 µl vom PCR Produkt wurden in einem 1,2%igem *low-melting* TBE Gel aufgetrennt, die Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein 1 ml Eppendorf Cup überführt. Nach Addition von 100 µl TE-Puffer wurde der Ansatz 5 min. auf 75°C erhitzt, mit 300 µl Phenol (Roti Phenol Roth) versetzt und 1 min. gevortext. Die Suspension wurde 10 min. bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand

mit 200 µl Phenol/Chloroform (1:1) gevortext. Eine erneute Zentrifugation 2 min. bei 13000 rpm trennte die wässerige von der aliphatischen Phase. Die wässrige Phase wurde mit 200 µl Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert. Das Volumen des Überstandes wurde gemessen und folgende Reagenzien wurden zugegeben:

+1 µl tRNA (5µg /µl Sigma)

+0,1 vol 2 M NaCl

+2,5 vol EtOH 100%

Die DNA wurde 30 min. bei -80°C gefällt. Eine Zentrifugation (10 min. bei 13000 rpm) pelletierte die DNA, die anschließend mit 70%igem EtOH gewaschen wurde. Die DNA wurde in 10 µl DEPC H_2O aufgenommen und 1 µl der Lösung wurde in einem 1%igem TBE-Gel überprüft. War die Isolation erfolgreich, konnte eine Ligationsreaktion angeschlossen werden.

2.10 Ligation

Die Ligation der linearisierten Klonierungsvektoren mit entsprechenden Fragmenten erfolgte unter Verwendung der *T4 DNA-Ligase* (Biolabs). Für eine effektive Ligationsreaktion sollte das Verhältnis von Vektor zu kloniertem Fragment 1:3 betragen. Die Abschätzung der einzusetzenden Volumina geschah durch Vergleich der Leuchtintensität der im Agarosegel aufgetrennten Banden. Die verdauten Plasmide wurden auch über *low-melting* Agarose gereinigt und auf einem 1%igem TBE-Gel geprüft.

10x Ligationspuffer. 200 mM Tris-HCl pH 7,6
50 mM DTT
50 mM $MgCl_2$
5 mM ATP

Ligationsansatz: 5,5 µl DNA-Fragment
+1 µl 20 µM Hexamin.cobalt-III-Chlorid
+1 µl PEG 8000
+1 µl 10xLigationspuffer
+1 µl Plasmid
+0,5 µl T4 DNA Ligase

Der Ansatz wurde 4 Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Von 10 µl Ligationsansatz wurden 1-2 µl in die Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt.

Für Klonierungsschritte verwendete Plasmide

Nach der erfolgreichen Etablierung eines Transformationsprotokolls für die Staticenpflanzen mit Hilfe der Reportergene (Tabelle 3) sollten die Pflanzen mit Konstrukten transformiert werden, die von züchterischem Interesse sind. Die hierzu notwendigen Konstrukte, die zur Induktion von Virusresistenz führen sollen, mußten hergestellt werden. Die dabei verwendeten Plasmide sind ebenfalls in der Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden

pRT101	Dieses Plasmid enthält den 35S Promotor und das Poly(A)-Signal aus dem CaMV-Stamm"Cabb B-D" (Töpfer et al., 1987)
pGJ357	Ein auf dem Plasmid pPZP200 (Heidukiewicz et al., 1994) basierender binärer Vektor, in dessen T-DNA ein nptII Gen unter Kontrolle von nos-Promotor und Poly(A)-Signal kloniert wurde. Die erfolgreiche Transformation von Bakterien kann durch eine auf dem Plasmid kodierte Streptomycin- und Spectinomycinresistenz (aadA-Gen) überprüft werden.
pBIN19	Binärer Vektor mit *npt*II-Gen (Kanamycinresistenz) unter der Kontrolle des nos-Promoters und Poly(A)-Signals in der T-DNA (Bevan, 1984).
pUC18 und pUC19	Standardklonierungsvektor mit Ampicillinresistenz (Vieira & Messing, 1982)
pBluesctipt II KS+	Standardklonierungsvektor mit Ampicillinresistenz (Alting-Mees & Short, 1989)
GUS-Intron	Auf dem pBIN 19 basierender binärer Vektor. Enthält innerhalb der T-DNA das *uidA*-Gen unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors und Poly(A)-Signals aus pRT102 (Töpfer et al., 1987). Um zu verhindern, daß das Enzym GUS in *A. tumefaciens* exprimiert wird, wurde das Intron IV2 aus dem Gen *ST-LS1* aus der Kartoffel in das *uidA* Gen inseriert (Vancanneyt et al., 1990).

2.11 Transformation von E. *coli und* Agrobakterien

Transformation von E. *coli*

Die Transformation der *DH5a* F' kompetenten Zellen (Gibco BRL) wurde nach dem modifizierten Protokoll des Herstellers durchgeführt. 20 µl der kompetenten Zellen wurden mit 1-2 µl des Ligationsansatzes versetzt und 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 45 sek. in 42°C warmen Heizblock einem Hitzeschock ausgesetzt und auf Eis abgekühlt. 175 µl LB-Medium zugegeben und bei 37°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde komplett auf selektive LB-Platten gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien.

Mit einer Bakterien-Kolonie wurden 5 ml Vorkultur (LB-Medium) angeimpft und über Nacht auf dem Schüttler bei 200 rpm und 27°C inkubiert. Das LB-Medium sollte Antibiotika enthalten, so daß nur Bakterien mit Helfer-Plasmid wachsen. Für den Stamm ATHV pEHA101 ist diese Selektion allerdings nicht möglich, da die Kanamycin-Resistenz auf dem Helfer-Plasmid deletiert ist. Mit 3 ml der Vorkultur wurden 250 ml Hauptkultur inokuliert und ebenfalls über Nacht auf dem Schüttler bei 200 rpm und 27°C inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von 0,5-0,6 wurden die Zellen geerntet, indem sie im Eisbad 10-15 min. gekühlt und dann 10 min. bei 3000 g in 50 ml Röhrchen (Falcon Tubes) bei 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert wurden. Auch bei allen weiteren Arbeitsschritten sollten die Zellen kühl gehalten werden. Das Bakterienpellet wurde in 200 ml kaltem, sterilem Wasser aufgenommen (40 ml pro Röhrchen) und ein weiteres Mal, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in insgesamt 100 ml sterilem Wasser aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in insgesamt 50 ml kaltem, sterilem, 10%igem Glycerin aufgenommen und anschließend zentrifugiert. Die Pellets wurden in 1 ml kaltem, sterilem, 10%igem Glycerin resuspendiert und in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden bei -80°C eingefroren.

Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

In einem Eisbad wurden die vorbereiteten Zellen (50 µl) angetaut und zu 50-100 ng Plasmid DNA gegeben. Die Mischung wurde in eine Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand, Biorad) gegeben und einem Spannungsimpuls unterworfen. Sofort nach der Elektroporation wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben, die Bakteriensuspension in ein 2 ml Eppendorf Cup überführt. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 27°C wurden Aliquots von 50 µl und 100 µl auf entsprechenden LB-Selektionsagarplatten plattiert. Nach 2 Tagen Inkubation bei 27°C wurden Kolonien sichtbar.

2.12 Präparation und Restriktion von DNA

Isolierung von Plasmid-DNA aus E. *coli*

Zur Überprüfung von Transformationen wurde Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse aus den Bakterien extrahiert und gereinigt, wie von Ausubel et al., (1994) beschrieben. Die beschriebene Methode wurde folgendermaßen modifiziert: 1 ml LB-Medium wurde in einem 2 ml Eppendorf Cup mit einer Bakterienkolonie inokuliert. Nach 5-6 h auf dem Schüttler (250 rpm, 37°C) war eine für Plasmidpräparation ausreichende Zelldichte erreicht. Die Proben wurden 30 sek. bei 13000 rpm (Heraeus Biofuge 13) zentrifugiert und das Pellet in 100 µl GTE-Lösung (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCL pH 8.0) resuspendiert. Nach 5 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl NaOH/SDS (0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) zugefügt. Die Probe wurde durch Invertieren gemischt und 5 min. inkubiert. Danach wurden 150 µl 5 M K-Acetat (pH 4,8) hinzugegeben, die Probe durch mehrfaches Invertieren gut gemischt und 5 min. auf Eis inkubiert. Nach 3 min. Zentrifugation bei 13000 rpm wurden 400 µl des Überstandes abgenommen und in ein neues Rektionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 100%igem EtOH und anschließender Zentrifugation wurde die Plasmid-DNA gefällt und mit 70%igem EtOH gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 10 µl H_2O aufgenommen. Für folgende Restriktionsverdaus wurden 3 µl eingesetzt.
Wurde eine hohe Ausbeute und hohe Reinheit der extrahierten DNA benötigt, z.B. für die Sequenzierung, wurde Plasmid-DNA mit Hilfe des "Quiagen Plasmid Mini Kit" (Quiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert und gereinigt.

Photometrische Messung der Nukleinsäuren DNA und RNA

Die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration erfolgte durch Absorptionsmessungen bei 260 und 280 nm in einem Photometer (UV-160 1PC Schimadzu) in Quarzküvetten. Eine A_{260} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml und RNA-Konzentration von 40 µg/ml (Sambrook et al., 1989).

Restriktion von DNA

Sofern nicht anders vermerkt, wurden Ansätze mit 10 µl Gesamtvolumen angesetzt, die 0,5 µl Restriktionsenzym (1-20 U/µl) enthielten. Die Inkubation erfolgte in den vom Hersteller mitgelieferten Restriktionspuffern nach Angaben des Herstellers. Bei präparativem Verdau wurden
1 µg DNA eingesetzt, bei Minipreparation (siehe oben) 3 µl von 10 µl des Lösungsvolumen. Die Inaktivierung des Enzyms war nicht notwendig.

Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 1%igen Agarosegelen (Sambrook et al., 1989) in TBE-Puffer. Als Größenstandard diente die 1kb *Ladder* (15615-016) GibcoBRL. Die Visualisation der DNA oder RNA erfolgte unter UV-Licht bei 302 nm und wurde mit Hilfe einer Kamera der Firma INTAS (Göttingen) und eines Videoprinters dokumentiert.

1xTBE:	90 mM Tris-HCl pH8
	90 mM Borsäure
	2 mM Na_2EDTA

2.13 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma GENterprise (Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH) in Mainz durchgeführt.

2.14 Mikroskopische Methoden

2.14.1 Immunelektronenmikroskopie

Diese Technik erlaubt eine Visualisierung der Viruspartikel und deren Reaktivität mit Antikörpern. Die äußere Form der Virusparikel gibt wichtige Anhaltspunkte für die taxonomische Einordnung des Virus. Die Ergebnisse der Antikörperreaktionen geben weitere Hinweise auf die Zugehörigkeit des Isolates zu einer bestimmten Virusgruppe.

2.14.2 Antikörper

Die spezifischen Antikörper, gerichtet gegen das Hüllprotein des Virus, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Marcello Russo und Dr. Luisa Rubino, Centro di Studio sui Virus e le Virosi delle Colture Mediterranee, 70126 Bari, Italy hergestellt. Die gereinigten Viruspartikel (siehe Virusreinigung) wurden einem Kaninchen injiziert. Nach ca. 6 Wochen wurde das Serum mit den gebildeten Antikörpern entnommen. Dieses Serum wurde für die Immundekoration verwendet.

2.14.3 Präparation von Viruspartikeln für die elektronenmikroskopische Untersuchung

Ein kohlebedampftes Kupfernetzchen (überlassen freundlicherweise von Prof. Dr. M. Russo) wurde auf einen Tropfen Virussuspension für 30-40 sek. aufgelegt, danach mit 30 Tropfen Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Netzchen mit 5 Tropfen Uranylacetat (2%) benetzt und kurz angetrocknet.

2.14.4 Dekoration der Viruspartikel mit Antikörpern

Ein kohlebedamftes Kupfernetzchen wurde auf einen Tropfen Virussuspension für ca. 30-40 sek. aufgelegt. Das Netzchen wurde mit 30 Tropfen 0,1 M NaH_2PO_4 pH 7 Puffer gespült und mit einem Stück Filterpapier wurde die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig entfernt. Das Netzchen wurde auf einen Tropfen Antikörperlösung (Ausgangsserum verdünnt 1:10 in Phosphat-Puffer) für 15 min. aufgelegt. Anschließend wurde das Netzchen mit 20 Tropfen Puffer, 30 Tropfen Wasser, 5 Tropfen Uranylacetat 2% gespült und leicht angetrocknet.
So vorbereitete Träger sind fast unbegrenzt haltbar und wurden in einem Philips EM 208 Elektronenmikroskop ausgewertet.

Die cytopathologischen Untersuchungen der infizierten *Nicotiana benthamiana* Pflanzen wurden von Prof. Dr. Marcello Russo und Dr. Luisa Rubino, Centro di Studio sui Virus e le Virosi delle Colture Mediterranee, 70126 Bari, Italien durchgeführt.

2.15. Serologische Methoden

2.15.1 Ouchterlonydoppeldiffusionstest

Lösliche Antigene und Antikörper diffundieren leicht in einem Agarosemedium, wobei in der Äquivalenzzone optimale Bedingungen für die Bildung eines Präzipitats aus Antigen-Antikörper-Komplexen (Präzipitationsbögen) herrschen. Hierauf beruht der Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony und Nielsson, (1978). Der zur Verwandtschaftsbestimmung von Pflanzenviren verwendet wird. Difco Noble Agar wird in einem 0,01 M Tris-HCl pH 8 Puffer + 0,85% NaCl und 0,025% Natriumacide aufgekocht und in kleine Petrischalen, (ca. 5 cm Durchmesser) gegossen. Nach dem Erkalten des Agar werden ca. 4 mm große Probenlöcher ausgestochen, die ca. 5 mm voneinander entfernt liegen. Die Virussuspension wird zuerst in die Löcher eingefüllt. Nach 4 Stunden wurde in die dafür vorgesehene Probenvertiefung die Antikörperlösung gefüllt. Um ein optimales Ergebnis der Präzipitatationsreaktion zu erhalten, wurden mehrere Versuche mit Verdünnungen von Virussuspensionen und Antikörperlösung durchgeführt.

2.15.2 Elisa

Der zunächst für die medizinische Diagnostik eingeführte *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Elisa) wird seit einiger Zeit auch zum Nachweis von Pflanzenviren eingesetzt (Clark et al., 1976). Um eine Virusinfektion in Pflanzen nachzuweisen, wurde ein Doppel-Antikörper-Sandwich (DAS)-Elisa im wesentlichen nach Clark and Adams (1977) mit Antikörpern gegen die Nucleocapsidproteine von TBSV-cherry durchgeführt. Aufgrund der starken Kreuzreaktion zwischen den untersuchten Tombusviren (TBSV-cherry, TBSV-BS3) ist ein Nachweis des TBSV-BS3-Statice mit polyklonalem

Antiserum gegen TBSV-cherry möglich. Die Antiseren stammen von der Firma Loewe Biochemica GmbH, Otterfingen. Es wurden Mikrotiterplatten der Firma Nunc (Maxi Sorb F16) verwendet. Zum Nachweis von Viren in Pflanzenmaterial wird dieses 1:10 (w/v) in Probenpuffer (laut Hersteller) gemörsert. Entgegen den Angaben des Herstellers wird nur ein Proben- und Reagenzienvolumen von 100 µl eingesetzt. Der Virusnachweis erfolgt in vier Schritten:

1) Bindung des Antikörpers an die Oberfläche der Mikrotiterplatte

Dazu werden in jedes Vial 100 µl des Antikörper (1:200 mit Beschichtungspuffer, siehe Hersteller, verdünnt) pipettiert und 2 h bzw. 4 h bei 37°C inkubiert.

2) Reaktion des immobilisierten Antikörpers mit dem in der Probe enthaltenen Antigen zum Antikörper-Antigen-Komplex

Nach drei Waschschritten mit dem Waschpuffer (siehe Angaben des Herstellers) werden je 100 µl Probe zugegeben und für 2 h bei 37°C bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert.

3) Reaktion des Sekundärantikörpers der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist

Nach drei Waschschritten werden je 100 µl Antikörperkonjugat (1:200 in Konjugatpuffer verdünnt) in die Vials pipettiert und über Nacht bei 4°C bzw. 4 h bei 37°C inkubiert.

4) Enzymatische Nachweisreaktion, bei der das Vorliegen von Antigen in der Probe durch Spaltung des Substrats 4-Nitrophenylphosphat durch die alkalische Phosphatase und die resultierende Farbreaktion nachgewiesen wird

Dazu werden nach drei Waschschritten je 200 µl 4-Nitrophenylphosphat (1 mg/ml) in Substratpuffer hinzugegeben. Die quantitative Auswertung erfolgte nach 60 min. durch Messung der Extinktion bei 405 nm im Photometer (Labsystems Uniskan I, Flow Laboratories).

3. Gewebekultur der Staticen (*Goniolimon tataricum*)

3.1 Sterilisation von Samen

Die Samen wurden in ein 15 ml Falkon-Röhrchen überführt (ca. 100 Samen) mit 10 ml 2%igem Hypochlorid aufgefüllt. Die Samen wurden 2 h bei 100 rpm geschüttelt und anschließend unter sterilen Bedingungen 3 mal gewaschen. Die gründlich gewaschenen Samen wurden in ca. 5 ml Keimungsmedium aufgenommen und in eine Petrischale überführt.

3.2 Anzucht von sterilem Pflanzenmaterial

Die sterilisierten Samen wurden einzeln mit einer Pinzette aufgenommen und nebeneinander auf Rundfilter MN 440 (Macherey und Nagel), die in einer Petrischale plaziert wurden, aufgelegt. Dabei wurden nur intakte Samen ausgewählt. Das Filterpapier wurde mit 20 ml Keimungsmedium getränkt, und die Petrischale wurde mit Parafilm geschlossen. Nach ca. 1 Woche konnte man die Keimlinge ernten und auf ein Grundmedium (MS-Agar) überführen. Das Medium enthält die notwendigen Salze, die die Staticenpflanze zum Keimen benötigt. In diesem Medium bildet der Keimling Dicotyledonen und Wurzeln aus.

Keimungsmedium:

Stammlösung 1	**Stammlösung 2**	**Stammlösung 3**	**Stammlösung 4**
1,62 g KNO_3	0,47 g $Ca(NO_3)_2$ x $4H_2O$	0,41 g KH_2PO_4	0,5 g $MgSO_4$ x 7 H_2O 5 mg $MnCl_2$ x H_2O 0,6 mg H_3BO_3 0,2 mg Na_2MO_4

Alle Stammlösungen werden auf 100 ml mit H_2O aufgefüllt und 1:1:1:1 gemischt. Die Lösung ist nach dem Autoklavieren unbegrenzt haltbar.

3.3 Transformation von Staticen-Wurzeln

Vorbereitung und Infektion der Wurzeln

Nach ca. zwei Monaten haben die *in-vitro* Staticen genügend Wurzelmaterial, gebildet um diese zu ernten und für Versuche einzusetzen. Als Richtgröße hat sich die Verwendung von Wurzeln von 6 einzelnen Pflanzen bewährt. Diese sollten lang und möglichst von weißer Farbe sein. Sie werden von der Pflanze abgeschnitten und im ganzen auf das Grundmedium gelegt. 1 Woche später werden die Wurzeln entnommen und im Infektionsmedium in ca. 1 cm große Stücke geschnitten. Die Wurzeln werden in dem Infektionsmedium ca. 4 h belassen, anschließend mit MS-Medium ohne Glucose gespült und einzeln nebeneinander auf das Infektionsmedium (Grundmedium + Kanamycin 10 mg/l + Azetosyringon 200 µM) gelegt. Dort wurden die Wurzelstücke 3 Tage inkubiert und dann auf das Selektionsmedium plaziert.

1000 ml Grundmedium für die sterile Staticenkultur

4,4 g MS (Murashige & Skoog DUCHEFA Biochemie BV (Niederlande))

20 g Saccharose oder Glucose

6 g Agar

Herstellung des Agrobakterien-Infektionsmedium

Eine Agrobakterien-Kolonie wurde in 10 ml LB Kanamycin (50 mg/l) angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 27°C und 250 rpm auf dem Schüttler. Die Bakteriensuspension wurde mit 20 ml 10%iger Glucoselösung, 200 µM Azetosyringon, 100 µl NAA (1 mg/l) und 100 µl Kinetin (1 mg/l) supplementiert und mit LB auf 100 ml aufgefüllt. Die Suspension wurde 4 h bei Raumtemperatur belassen. Nach 4 h konnte man die Suspension für die Wurzelinfektion wie auch für die *Nicotiana benthamiana*-Infiltration benutzen.

3.4 Selektion der Transformanten

Die Wurzelstücke, die 3 Tage lang mit Agrobakterien co-kultiviert waren, wurden anschließend auf ein Selektionsmedium plaziert, um den transformierten Zellen einen Wachstumsvorteil zu ermöglichen. Das Selektionsmedium besteht aus dem Grundmedium, das mit folgenden Zusätzen supplementiert wurde:

20 mg/l	Kanamycin
100 mg/l	Timentin
1 mg/l	NAA
1 mg/l	Kinetin

Timentin ist eine Mischung aus Ticarcillin und Clavulanat. Ticarcillin inhibiert die Zellwandsynthese von *A. tumefaciens*, ist aber sehr empfindlich gegenüber ß-Lactamase. Clavulanat ist ein spezifischer ß-Lactamase-Inhibitor und schützt so Ticarcillin gegen Inaktivierung.

3.5 Infiltration von *Nicotiana benthamiana* Blättern mit Agrobakterien

Die Infiltration der *N. benthamiana*-Blätter stellt eine schnelle Methode dar, die sich einerseits zur Überprüfung der Marker-Konstrukte (GUS, GFP) oder zur Expression gewünschter Proteine in Pflanzenmaterial eignet. Die Pflanzenblätter werden in die Agrobakteriensuspension eingetaucht und einem Vakuum ausgesetzt. Wird das Vakuum plötzlich gebrochen, werden die Agrobakterien durch die Spaltöffnungen in das Blattinnere gesogen und können dort die einzelnen Zellen infizieren. Folgendes Verfahren wurde angewendet, um die *N. benthamiana* Blätter zu infiltrieren. Die Agrobakterium-Suspension, die für die Infektion von Staticenwurzen benutzt wurde, wurde auch verwandt, um die Blätter zu infiltrieren. Besonders wichtig ist der Zustand der Blätter. Sie müssen relativ jung sein, von gesundem Aussehen. Außerdem müssen die Spaltöffnungen weit geöffnet sein. Um dies zu erreichen, wurden nur Pflanzen in den Morgenstunden verwendet, die gut gewässert waren und im Gewächshaus von Quecksilber Lampen bestrahlt wurden. Die Blätter wurden von den Pflanzen abgeschnitten und sofort in die Agrobakterium-Lösung getaucht. Der Infiltrationsvorgang begann sofort. In ein Speed Vakuum wurde das Vakuum für 20-30 min. angesetzt, bis keine Luftblasen mehr

zu sehen waren, und dann plötzlich gebrochen. So behandelte Blätter verlieren ihr mattes Aussehen und werden leicht durchscheinend. Die Blätter wurden mit Leitungswasser abgespült und in Petrischalen, die mit Filterpapier ausgelegt wurden, plaziert. Diese werden 2-3 Tage in einer Klimakammer bei 24°C und einem Licht/Dunkel-Wechsel von 16 h/8 h inkubiert. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 70%.

3.6 GUS-Färbung

Um ein Transformationsprotokoll zu etablieren, wurde ein Reportergen benutzt. Das Reportergen war GUS-Intron (Vancanneyt et al., 1990). Dieses Konstrukt erlaubt den Nachweis einer stabilen Intergration der T-DNA in das Pflanzengenom. Ist die Integration erfolgreich, wird ein Enzym die *b-Glucoronidase* (GUS) gebildet, bei der als Substrat unter anderen X-GlcA eingesetzt werden kann. X-GlcA (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-glucoronsäure) wird von GUS an der β1-glycosidischen Bindung zwischen der Glucuronsäure und dem 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-Teil hydrolytisch gespalten. Die Spaltung von X-GlcA führt zur Bildung des in Wasser unlöslichen blauen Dichloro-dibromo-indigo. In drei weiteren Reaktionen wird das freigesetzte Indoxyl-Derivat dimerisiert und schließlich zum Indigo-Farbstoff oxidiert.

Von 5-Bromo-4-chloro-3-indol-ß-D-Glucuronsäure (X-GlcA) wird eine 100 mM Stammlösung durch Zugabe von 100 mg X-GlucA (Duchefa, Niederlande) zu 2 ml DMSO hergestellt.

Färbelösung: 1 mM X-GlucA
15 mM EDTA
0,5 mM Kaliumhexacyanoferrat (II) $K_4Fe(CN)_6$
50 mM Phosphat-Puffer pH 7
1% (v/v) Triton X-100

Zum histochemischen Nachweis in Kallus-Gewebe wurden Mikroreaktionsgefäße (0,2 ml) mit 50 µl Färbelösung befühlt und anschließend das Explantat eingebracht. Die Probe wurde für 3-6 Stunden bei 37°C inkubiert. Um die entstehende Blaufärbung in grünem Pflanzengewebe deutlich sichtbar zu machen, wurde das Explantat mit 70%igem EtOH bei Raumtemperatur entfärbt. Zur Beschleunigung dieses Vorgangs kann die Inkubationstemperatur auf 50°C erhöht werden. Größere Blätter oder ganze Pflanzen wurden in entsprechend größeren Gefäßen behandelt. Die Explantate sollten dabei immer ganz von der Färbelösung bedeckt sein. Nach dem Entfärben können die Proben unter Lichtabschluß in 70%igem Ethanol aufbewahrt werden.

IV. Ergebnisse

Teil 1. Molekularbiologische und serologische Charakterisierung des Virus

1.1 Makroskopisches Krankheitsbild

Bereits zum Beginn der Wachstumsperiode sind erste Symptome der Krankheit zu erkennen. Die Blätter bleiben klein, sind deformiert und zeigen ein mehr oder weniger deutliches Mosaik. Ältere Blätter werden gelb und sterben frühzeitig ab. Die Infloreszenz wird entweder gar nicht oder unvollständig ausgebildet. Das Entwickeln voller Blüten unterbleibt. Ein nicht befallenes Feld erscheint zur Blütezeit vollständig weiß, alle Büsche tragen vielblütige Infloreszenzen. Auf Feldern mit infizierten Pflanzen kann man schon von weitem leere Flächen und Büsche mit unterentwickelten Infloreszenz erkennen.

1.1.1 Nachweis und Isolation des Virus aus Statice und Ackerbegleitflora

Blattproben, bezogen von einem dieser Felder (Stilgenbauer, Flohenheim Feld Autobahn), wurden auf Virussymptome untersucht und solche, mit einem deutlichen Mosaik (Abb. 7) für die Inokulation der *Nicotiana benthamiana* Pflanzen verwendet. Diese Tabakart zeigt eine hohe Sensität gegenüber einer Infektion mit einer Reihe von Viren und eignet sich sehr gut für eine problemlose Propagierung vieler Viren und eine Aufreinigung in großen Mengen.

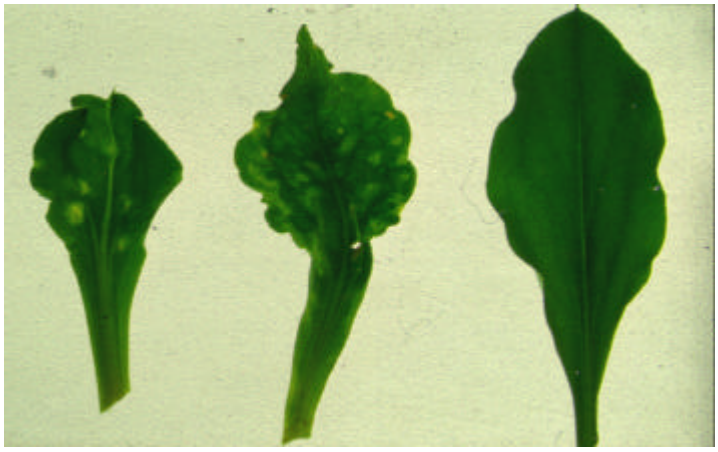


Abb. 7: Virussymptome an Staticenblättern die im Freiland gesammelt wurden.
links: 2 Blattexemplare von infizierten Staticen, die deutliche Symptome wie Deformation und Mosaikbildung aufweisen, rechts: Ein virusfreies Staticenblatt.

Um herauszufinden, ob auch Wildkräuter eines Feldes mit dem schädigendem Agenz befallen sind und dieses eventuell in den Wildkräutern persistieren kann, wurden auch diese gesammelt und einer Untersuchung unterzogen.
In einem der gesammelten Wildkräuter (n=6) dieses Feldes (Stilgenbauer Autobahn) wurde eine Virose ebenfalls detektiert (Tabelle 4). Das Wildkraut war Löwenzahn (*Taraxacum officinalis*). Die Extinktionsmessung des ELISA-Versuches von 0,5-0,6 bei 405 nm weißt allerdings auf einen

niedrigen Virusgehalt hin. Die Blattproben wurden für die Inokulation von *Nicotiana benthamiana* benutzt. Die inokulierte Pflanze zeigte nach 3 Tagen Virussymptome und nach ca. 10 Tagen systemische Infektion der apikalen Blätter (Abb. 8).

Tabelle 4: Elisa-Test; Auswertung der Feldproben, die im Betrieb Stilgenbauer gesammelt wurden
Angezeigt sind die Extinktionswerte bei 405 nm. Probe Nr.1 Löwenzahn wurde anschließend auf *N. benthamiana* abgerieben. Die Positivkontrolle lag weit über dem Messbereich. Negativkontrolle- nicht infizierte Gewächshausstatice, Positivkontrolle- Virus infizierter Tabak. Die Messwerte wurden jeweils zweimal erhoben. Die Antikörper, die für diesen ELISA benutzt wurden, erkennen das Hüllprotein eines *Tombusvirus* (PetMV).

Negativ-kontrolle	1. *Taraxacum officinalis*	2. *Chenopodium album*	3. *Conyza canadensis*	4. *Cirsium arvense*	5. *Sonochus asper*	6. *Convolvulus arvensis*	Positiv-kontrolle
0,170	0,550	0,194	0,204	0,209	0,183	0,170	****
0,172	0,600	0,208	0,207	0,243	0,196	0,163	****

Abb. 8: Symptome an virusinfizierten *Nicotiana benthamiana*.
Die Blätter des in Elisa-Test positiven Löwenzahns wurden zerrieben und auf 3 Blätter des Tabak mechanisch inokuliert. Das oberste Blatt ⟶ zeigte nach 3 Tagen eine systemische Infektion.

Aus den infizierten Tabakpflanzen (Inokulat: Statice Nr. 33 Stilgenbauer Autobahn) wurde eine Virusreinigung vorgenommen. Eingesetzt wurden 32,23 g symptomtragende Blätter. Eine photometrische Messung der Virussuspension bei 260 nm am Ende der Reinigung ergab eine Ausbeute von 0,1 mg Virus pro 1 g Pflanzenmaterial. Diese Ausbeute entsprach der Erwartung für eine gute Präparation, deshalb wurde diese Virussuspension für alle nachfolgenden Untersuchungen verwandt.

1.2 Infektionsversuche unter definierten Bedingungen

Um die Virose besser zu charakterisieren und als Ursache des Absterbens der Staticenpflanzen zu dokumentieren wurden Infektionsversuche unter definierten Bedingungen durchgeführt. 40 junge Staticenpflanzen wurden in einer abgeschlossenen Klimakammer mit definierter Temperatur, Licht und Luftfeuchte mit Virusmaterial (gereinigter Virussuspension 3,5 µg/ µl) inokuliert. Nach 4 Wochen bei 16°C zeigten sich die ersten Symptome, die nicht inokulierten 20 Staticenpflanzen zeigten keine auffallenden Veränderungen (Abb. 9). Da Daten aus einer 1994 durchgeführten Diplomarbeit (Diplomarbeit Britta Wegener, 1994) vorlagen, daß ein ELISA-Test mit Staticenpflanzen keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefert. Offensichtlich wird die Reaktion durch Inhaltsstoffe gestört, die beim zermörsern der Pflanze austreten. Deshalb wurde ein ELISA Test nur stichprobenartig durchgeführt und diese Beobachtung bestätigt (Tabelle 5). Die Symptomausprägung nach Rückinfektion bestätigt das isolierte Virus als Grund der Erkrankung der Statice.

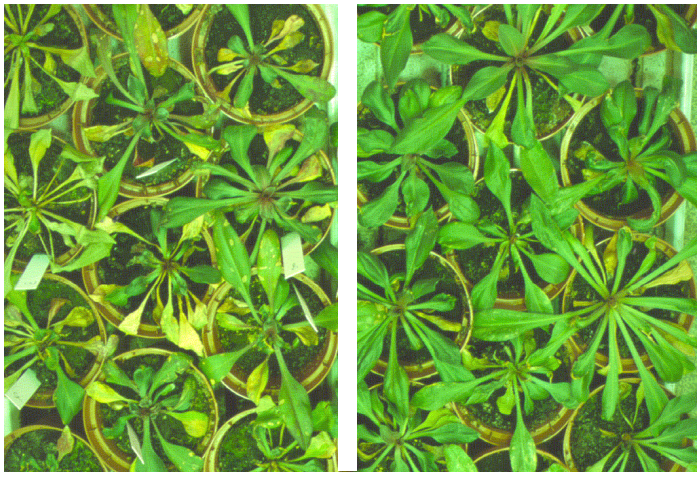


Abb. 9: Infektion junger Staticen-Pflanzen mit Virusisolat Nr. 33
Links: Infizierte Staticen, rechts virusfreie Staticen. Obwohl einige der Pflanzen im Elisa-Test keine Infektion aufwiesen, zeigten alle Pflanzen Symptome (Mosaik, Blattkrümmung, Absterben der Blätter).

Tabelle 5: Auswertung des Virusbefalls bei Staticen, die unter definierten Bedingung mit Virussuspension infiziert wurden, mit Hilfe des Elisa-Tests
Es wurden 16 Staticen getestet, davon wiesen 2 Pflanzen eine deutliche Infektion auf (Nr. 9 und 15). Die Positivkontrolle-Virus infizierter Tabak (PK), lag weit über dem Messbereich. Negativkontrolle (NK)- nicht infizierte Statice. Die Messwerte wurden doppelt bestimmt.

NK	**PK**	**1.**	**2.**	**3.**	**4.**
0,164	****	0,173	0,164	0,161	0,159
0,164	****	0,166	0,167	0,187	0,159
5.	**6.**	**7.**	**8.**	**9.**	**10.**
0,160	0,159	0,201	0,159	1,130	0,162
0,164	0,165	0,114	0,158	1,540	0,184
11.	**12.**	**13.**	**14.**	**15.**	**16.**
0,158	0,159	0,157	0,160	1,663	0,160
0,164	0,157	0,168	0,158	2,155	0,167

1.3 Elektronemikroskopische Untersuchungen

Die Virussuspension wurde benutzt, um die Viruspartikel in einer Negativkontrastierung mit Uranylacetat zu visualisieren. Die Partikel haben eine sphärische Form und einen 30 nm Durchmesser (Krczal und Beutel, 1994). Um den Kontrast zu erhöhen, wurde eine Dekoration mit einem Antikörper, der gegen das Hüllprotein der Viruspartikel gerichtet war, vorgenommen. (Immunelektronenmikroskopie)(Milne, 1970). Gleichzeitig konnten die Antikörper, die gegen das Hüllprotein hergestellt wurden, auf ihre Bindungseigenschaft geprüft werden (Abb. 10).

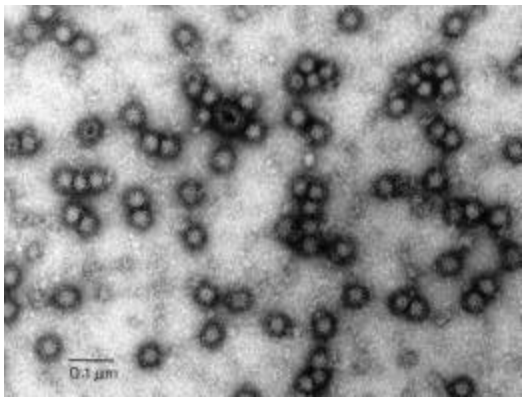
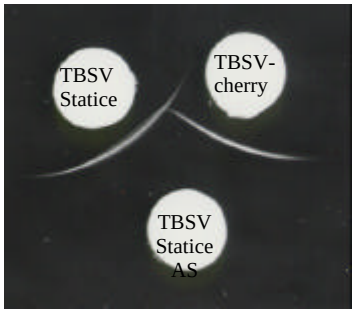


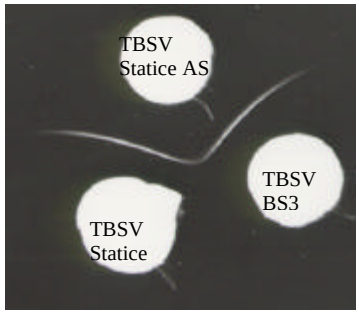
Abb. 10: Immunelekronenmikroskopische Aufnahme der Viruspartikel
Die Virussuspension wurde mit dem Antiserum, daß gegen das Hüllprotein gerichtet war, dekoriert und mit Uranylacetat negativ kontrastiert

Aufgrund der Morphologie der Viruspartikel und der Symptome die befallene Pflanzen ausbilden (Koenig und Kunze, 1982) wurde das Virus in die Gruppe der Tombusviren eingeordnet. Es gibt drei Hauptgruppen innerhalb der Gattung *Tombusvirus* die als Repräsentanten angesehen werden: Der TBSV, das aus infizierten Tomaten in England (Smith, 1935) isoliert wurde, das TBSV-BS3, das nach einer Anzahl unbekannter serieller Passagen des TBSV in verschiedenen Pflanzen isoliert wurde (Steere, 1953) und das TBSV-*cherry* (Allen und Davidson, 1967; Allen, 1968). Das TBSV und TBSV-BS3 infizieren gewöhnlich krautige Pflanzen (Das TBSV infizierte 52 von 157 Arten (Schmelzer, 1958)), wobei das TBSV-*cherry* sich auf holzige Pflanzen beschränkt. Um eine Einordnung des Staticenisolats Nr. 33 vorzunehmen, wurde ein Ouchterlonydoppeldiffusionstest durchgeführt.

1.4 Serologische Charakterisation

Eine serologische Charakterisierung ist nur möglich, weil die Hauptgruppen serologisch unterschieden werden können (Koenig und Gibbs, 1986). Eingesetzt wurden Antisera gegen TBSV-*cherry*, TBSV-BS3, und das Staticenisolat, wie auch die Virussuspensionen der Viren. Sind die Virusisolate serologisch verwandt aber nicht identisch, bildet sich in der Präzipitationslinie ein Spur (der Begriff als solcher wurde von Prof. Dr. König verwendet) (Abb. 11). Besitzen die Virus Isolate eine hohe serologische Identität wird eine kontinuierliche Prezipitationslinie gebildet (Abb. 12 und 13).





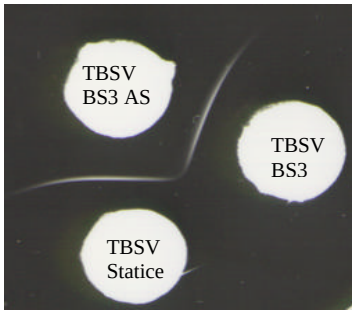


Abb. 11 **Abb. 12** **Abb. 13**

Abb. 11: Ouchterlonydoppeldiffusionstest durchgeführt mit Antiserum gegen das Hüllprotein von TBSV-BS3-Staticen Isolat
Eingesetzt wurde die unverdünnte Virussuspension und eine Verdünnung der Antiseren in einen Phosphatpuffer (1:16). Die Virussuspensionen wurden 4 h vor den Antiseren eingesetzt. Zwischen den beiden Viren (TBSV-BS3-Statice und TBSV-*cherry*) kommt es zur Bildung eines Spur, was auf einen serologischen Unterschied hinweist.

Abb. 12 und 13: Ouchterlonydoppeldiffusionstest durchgeführt mit Antiseren gegen TBSV-BS3 und TBSV-BS3-Statice
In beiden Kombinationen bilden die Virus-Serum-Prezipitate eine kontinuierliche Linie aus. Dies ist nur möglich wenn beide Viren serologisch hohe Identität aufweisen.

Anhand der durchgeführten Versuche wurde das Staticenisolat dem TBSV-BS3 zugeordnet, weil eine kontinuierliche Präzipitationslinie in beiden Kombinationen der Antisera (Serum gegen TBSV-Statice und Serum gegen TBSV-BS3) gebildet wurde. Da offensichtlich eine hohe Homologie der Oberflächenproteine vorhanden ist, wurde der vorläufige Name TBSV-BS3-Statice vergeben (TBSV-BS3-Stat.).
Die Ausformung des Spur in der Kombination TBSV-*cherry* und TBSV-Statice zeigt auf, daß die Verwandtschaft der Viren viel geringer ist, als die serologische Verwandtschaft des TBSV-BS3 und TBSV-Statice. Eine weitere Bestätigung der Annahme, daß das Staticenisolat der Gattung TBSV angehört, wurde von dem cytopathologischen Erscheinungsbild erwartet.

1.5 Cytopathologie der Virusinfektion

Ein intrazellulärer Indikator für eine Virusinfektion mit der Gattung TBSV ist das Erscheinen der *multi vesicular bodies* (MVB's). Diese bestehen aus einem Hauptkörper der von vielen sphärischen und ovalen Vesikeln mit 80-150 nm Durchmesser (Russo, 1987; Martelli et al., 1984) umgeben ist. Diese Vesikel enthalten dsRNA (Appiano et al., 1986), eine Zwischenform der RNA, die bei der Virusreplikation gebildet wird. Auch die Beobachtung, daß der Replikase-Komplex mit Membrankomponenten verbunden ist (Scholthof et al., 1995; Lupo et al., 1994) läßt vermuten, daß die MVB's unter dem Einfluß der Virusinfektion und später der Virusreplikation gebildet werden.

Um zu testen mit welchem der möglichen Membrankompartimenten der Replikationsvorgang verbunden ist, wurden in dem Institut des italienischen Kooperationspartners unter der Leitung von Prof. Dr. Marcello Russo elektonenmikroskopische Aufnahmen infizierter *Nicotiana benthamiana*-Gewebe erstellt und ausgewertet. In den Gewebeteilen wurden MVB's in verschiedenen Stadien gefunden (Abb. 14 und 15). In sehr frühen Stadium wird das MVB von nur einer Lage der Vesikel umlagert. In einem späterem Stadium stülpen die Vesikel nach innen, füllen so lange den Innenraum aus, bis das MVB kollabiert. Das Cytoplasma enthält gleichzeitig kleine Cluster elektronendichtes Material, das mit hoher Wahrscheinlichkeit das Hüllprotein des Virus ist (Appiano et al., 1981). Auch diese Befunde bestärken die vorherigen Untersuchungen und ergänzen das symptomatische und serologische Bild.

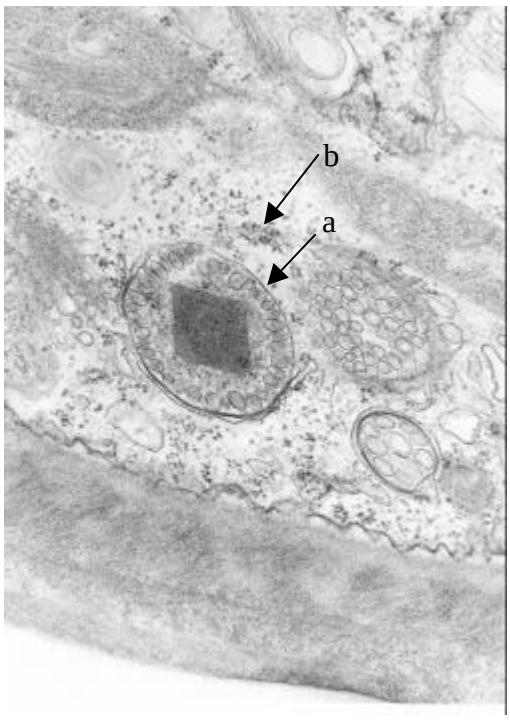


Abb. 14

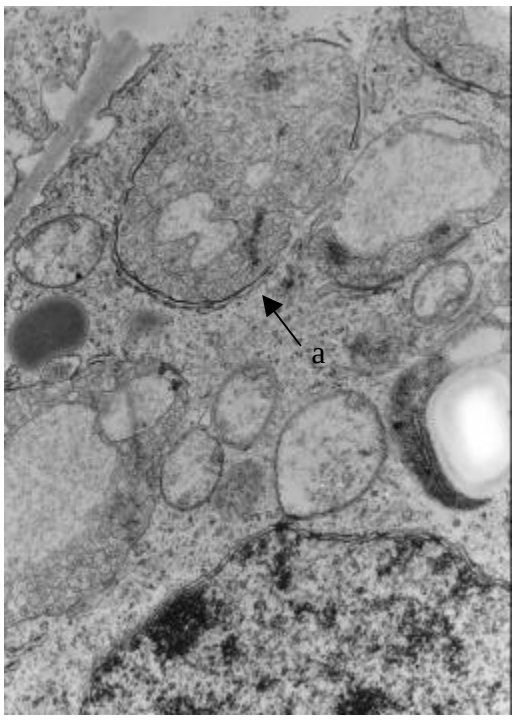


Abb. 15

Abb. 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer virusinfizierten *Nicotiana benthamiana* Zelle.
Mit einem a⟶ sind die MVB's als Orte der Virusreplikation angezeigt. Das Peroxisom enthält ein Katalasekristall und die erste Schicht der MVB-Vesikel. Mit einem b⟶ ist das elektronendichte Material angezeigt, das voraussichtlich das Hüllprotein ist.

Abb. 15: Spätes Stadium einer Virusinfektion einer *Nicotiana benthamiana* Zelle.
Mit einem a⟶ ist ein kollabierendes Peroxisom angezeigt. Das Peroxisom ist mit MVB-Vesikeln ausgefüllt.

1.6 Bestimmung der Virussequenz

In den letzten zehn Jahren sind in den Biowissenschaften auf dem Gebiet der Pflanzentransformation und Gentechnologie große Fortschritte erzielt worden. Diese Techniken erlauben einen neuen, ökologisch unbedenklicheren Ansatz bei Bekämpfung hartnäckiger Virosen. Es gibt einige interessante Ansätze, um eine Virusresistenz in Pflanzen zu induzieren. Durch das Einbringen von Teilen des Virus-Genoms in Pflanzen kann eine Virusresistenz oder eine weitgehende Toleranz erreicht werden (Russo et al., 1998; Rubino et al., 1993; Russo, 1995). Es lag daher nahe, eine transgene, virusresistente oder virustolerante Statice zu erzeugen. Um dieses zu tun, mußte erst die Sequenz und das Vorhandensein der Submoleküle (DI-; Sateliten-RNA), die einen Einfluß auf den Krankheitsverlauf haben, geklärt werden. Die cDNA-Sequenz (Abb. 17) wurde mit Hilfe vier sich überlappender Klone bestimmt und ist unter der Nr. AJ249740 in der EMBL Datenbank veröffentlicht. Die Klone wurden mit Hilfe der *random priming* Methode zur cDNA Herstellung erhalten. Die cDNA Fragmente wurden dann in einen *Sma* I geschnittenen pUC18 Vektor kloniert und sequenziert. Nach Erhalt der vollständigen Sequenz wurden die offenen Leserahmen (ORF) bestimmt. Fünf Proteine werden von dem TBSV-BS3-Stat. Genom kodiert. Das erste ORF am 5'Ende codiert für das 33 kDa Protein. Wird das Amber Stop Kodon überlesen, wird das Protein 92 kDa produziert. Das Hüllprotein befindet sich in der Mitte der Sequenz, die beiden Proteine 19 kDa und 22 kDa sind am 3'Ende lokalisiert. Die Expression der letzten drei Proteine erfolgt über zwei subgenomische RNA's, die in der Northern blot Analyse viraler RNA detektiert wurden (Abb. 18). Anhand der Literatur (Hillman et al.,1989) konnten die Startpunkte der subgenomischen RNA's auf die Sequenzdaten des TBSV-BS3-Statice übertragen werden (Abb. 16).

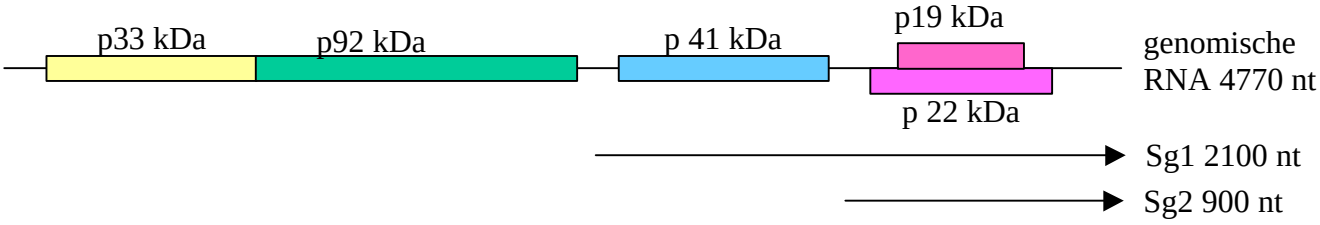


Abb. 16: Schematische Darstellung der genomischen RNA-Sequenz des TBSV-BS3-Statice
Die Expression des Hüllproteins und der Proteine für den Lang- und Kurzstreckentransport innerhalb der Pflanze erfolgt mit Hilfe der subgenomischen RNA 1 (Sg1) und der subgenomischen RNA 2 (Sg2).

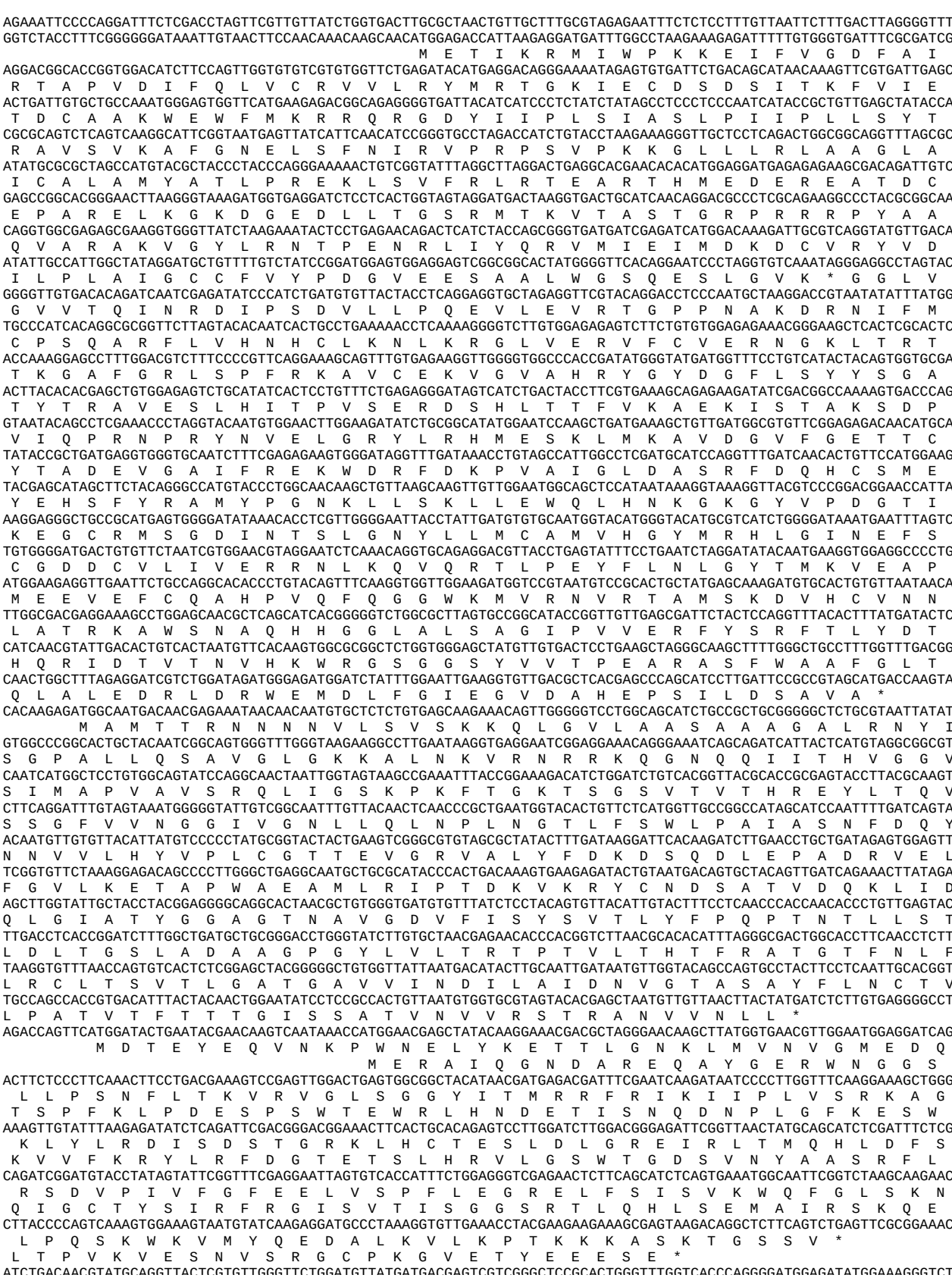


Abb. 17: Die komplette Nucleotidsequenz des TBSV-BS3-Statice

Aus einer Virussuspension wurde die RNA aufgereinigt, die cDNA wurde mit Hilfe der *random priming* Methode erhalten. Die daraus resultierenden DNA-Fragmente wurden in pUC 18 *Sma* I kloniert und sequenziert. Die translatierten Aminosäuren der ORF sind unter der Nukleotidsequenz als Einbuchstabencode dargestellt. Sterne bezeichnen die Terminationspunkte. Die Sequenz ist in der EMBL-Datenbank unter der Nr. AJ249740 veröffentlicht.

Eine *Northern blot* Analyse (Abb. 18), bei der als Sonde ein 1kb lange cDNA des 3'Ende des Virus benutzt wurde, bestätigt das Auftreten der subgenomischen RNA's und das Bilden von DI-RNA (siehe Kapitel 1.7.2). Die Sg1 und Sg2 Expression wird deutlich durch das Vorhandensein einer DI-RNA herabgesetzt, deshalb treten in der Abbildung 18 die Banden der genomischen RNA und die der DI-RNA deutlicher hervor.

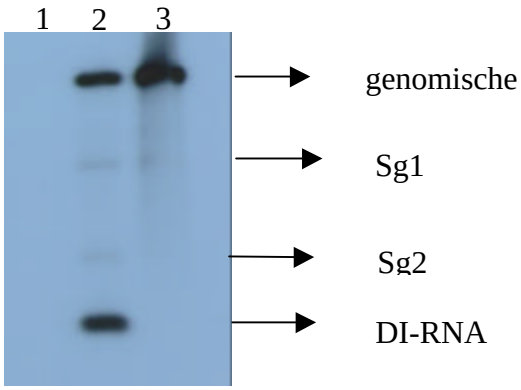


Abb. 18: *Northern blot* Analyse viraler RNA
RNA von nicht infizierten *N.benthamiana* -Pflanzen (1), infizierten *N. benthamiana* (2) und RNA aus Viruspartikeln wurde isoliert, denaturiert und auf einem 1%igem Glyoxalgel aufgetrennt. Anschließend mit einer digoxigenin markierten Sonde hybridisiert. Das Δ*Hin d*III 3'Ende der cDNA der Virussequenz in pUC18 wurde als Sonde eingesetzt. Sg1 und Sg2 bezeichnen die subgenomischen RNA's.

Um anhand der Sequenzdaten Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den TBSV-BS3-Statice und anderen Tombusvirusarten aufzuklären, war es notwendig, die Hüllproteinsequenzen auf Aminosäurenbasis zu vergleichen. Die Hüllproteine der einzelnen Viren zeigen die höchste Variabilität, wogegen die Proteine der Replikase und des Lang- und Kurzstreckentransports einer stärkeren Konservierung unterliegen. Bis jetzt standen von TBSV-BS3 Viren nur Sequenzdaten von p19 und p22 Proteinen (Luis-Arteaga, 1996) zur Verfügung. Deshalb war es für einen weitergehenden Vergleich notwendig, die Hüllproteinsequenzdaten des TBSV-BS3 (überlassen von Fr. Dr. König) zu erhalten. Die Sequenz wurde mit dem Primerpaar Cpp1 und Cpp3 amplifiziert, in einen *Sma* I geschnittenen pUC18 Vektor kloniert und sequenziert. Die Amplifikation wurde mit einer Polymerase vorgenommen, die eine sehr geringe Fehlerrate produziert (Vent Polymerase, Fa. Biolabs). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß bei der Sequenzierung der Plasmide Fehler aufgetreten sind. Die erhaltenen Sequenzdaten sind in der Datenbank EMBL unter der Nr. AJ271328 veröffentlicht. Mit Hilfe dieser Daten war es möglich, die Verwandschaftsbeziehungen des Staticenvirus mit dem TBSV-BS3 Virus und anderen Viren der Gattung *Tombusvirus* festzustellen. Die relativen Homologien sind in Tabelle 6 dargestellt und wurden mit dem GCG-Programm vorgenommen. Das Staticenvirus weist eine 96%ige Homologie zum Referenzisolat TBSV-BS3 auf (Abb. 19). Da ein Unterschied von 4% zu

gering ist, um eine neue Virusart zu definieren, wurde der Virus als TBSV-BS3-Isolat Statice eingeordnet.

Tabelle 6: Vergleich der Aminosäurensequenz der einzelnen Virusproteine mit den Proteinsequenzen des TBSV-BS3-Statice.
Die relativen Homologien sind in Prozent angegeben. Für das Replikase Protein des TBSV-BS3 liegen keine Daten vor.

Virus	**p33**	**p92**	**p41**	**p22**	**p19**
AMCV	93%	97%	71%	95%	87%
CIRV	62%	96%	57%	94%	87%
CNV	87%	94%	38%	87%	69%
CymRSV	87%	95%	50%	81%	71%
TBSV-BS3	-	-	96%	95%	94%
TBSV-*cherry*	94%	97%	73%	96%	90%
TBSV-*pepper*	93%	95%	73%	96%	90%

```
1   M A M T T R N N N N V L A I S K K Q L G V L A A S A A V G A L R N H I S E S S P A L L Q S A V G L G
1   M A M T T R N N N N V L S V S K K Q L G V L A A S A A A G A L R N Y I S E S G P A L L Q S A V G L G

51  K K A L N K V R N R R K Q G N Q Q I I T H V G G V G G S I M A P V A V S R Q L V G S K P K F T G R T
51  K K A L N K V R N R R K Q G N Q Q I I T H V G G V G G S I M A P V A V S R Q L I G S K P K F T G K T

101 S G S V T V T H R E Y L T Q V N N S S G F V V N G G I V G N L L Q L N P S N G T L F S W L P A I A S
101 S G S V T V T H R E Y L T Q V N N S S G F V V N G G I V G N L L Q L N P L N G T L F S W L P A I A S

151 N F D Q Y S F N S V V L H Y V P L C G T T E V G R V A L Y F D K D S Q D P E P A D R V E L A N F G V
151 N F D Q Y S F N N V V L H Y V P L C G T T E V G R V A L Y F D K D S Q D L E P A D R V E L A N F G V

201 L K E T A P W A E A M L R I P T D K V K R Y C N D S A T V D Q K L I D L G Q L G I A T Y G G A G T N
201 L K E T A P W A E A M L R I P T D K V K R Y C N D S A T V D Q K L I D L G Q L G I A T Y G G A G T N

251 A V G D V F I S Y S V T L Y F P Q P T N T L L S T R R L D L T G S L A D A I G P G Y L V L T R T P T
251 A V G D V F I S Y S V T L Y F P Q P T N T L L S T R R L D L T G S L A D A A G P G Y L V L T R T P T

301 V L T H T F R V T G T F N L S G G L R C L T S L T L G A T G A V V I N D I L A I D N V G T A S A Y F
301 V L T H T F R A T G T F N L F G G L R C L T S V T L G A T G A V V I N D I L A I D N V G T A S A Y F

351 L N C T V S S L P A T V T F T T T G I S S A T V N V V R G T R A N V V N L L
351 L N C T V S S L P A T V T F T T T G I S S A T V N V V R S T R A N V V N L L
```

Abb. 19: Vergleich der Aminosäuresequenzen des Hüllproteins zwischen TBSV-BS3-Statice und TBSV-BS3-Referenzisolates
Die obere Sequenz stammt vom Virus TBSV-BS3-Referenzisolat (freundlicherweise überlassen von Fr. Dr. Koenig).
Die untere Sequenz stammt von TBSV-BS3-Statice. Unterschiede in der Aminosäurensequenz sind mit Hilfe von schattierten Boxen gekennzeichnet.

Die Analyse der Aminosäurensequenz des p92 Proteins wies acht konservierte Motive auf, die typisch für RNA-abhängige-RNA-Polymerasen sind (O'Reilly et al., 1998). Die Motive, die in dem aktiven Zentrum der "Hand" des Proteins liegen sind, in Abb. 20 dargestellt. Diese Motive sind stark konserviert und kommen in vielen Klassen der Polymerasen vor (Hansen et al., 1997; Ollis et al., 1985). Ein typisches Motiv, charakteristisch für die Virusreplikasen, ist das GDD-Motiv (AS. 625), das auch im Protein p92 des TBSV-BS3-Stat. zu finden ist (AS 529-670). Die Aminosäure 296 ist mit einem Punkt gekennzeichnet. An dieser Stelle befindet sich das Amber Stop Kodon. Um diese Aminosäure zu bestimmen, müßte man eine Isolation der Replikase vornehmen und das Protein sequenzieren.

```
METIKRMIWP KKEIFVGDFA IGVNRTAPVD IFQLVCRVVL RYMRTGKIEC  50
DSDSITKFVI ELLKTDCAAK WEWFMKRRQR GDYIIPLSIA SLPIIPLLSY  100
TTRVRAVSVK AFGNELSFNI RVPRPSVPKK GLLLRLAAGL ALAPICALAM  150
YATLPREKLS VFRLRTEART HMEDEREATD CLVVEPAREL KGKDGEDLLT  200
GSRMTKVTAS TGRPRRRPYA AKIAQVARAK VGYLRNTPEN RLIYQRVMIE  250
IMDKDCVRYV DRDVILPLAI GCCFVYPDGV EESAALWGSQ ESLGVK.GGL  300
VRLPGVVTQI NRDIPSDVLL PQEVLEVRTG PPNAKDRNIF MVAGCPSQAR  350
FLVHNHCLKN LKRGLVERVF CVERNGKLTR TPQPTKGAFG RLSPFRKAVC  400
EKVGVAHRYG YDGFLSYYSG AKLRTYTRAV ESLHITPVSE RDSHLTTFVK  450
AEKISTAKSD PAPRVIQPRN PRYNVELGRY LRHMESKLMK AVDGVFGETT  500
CIKGYTADEV GAIFREKWDR FDKPVAIGLD ASRFDQHCSM EALQYEHSFY  550
RAMYPGNKLL SKLLEWQLHN KGKGYVPDGT ITYRKEGCRM SGDINTSLGN  600
YLLMCAMVHG YMRHLGINEF SLANCGDDCV LIVERRNLKQ VQRTLPEYFL  650
NLGYTMKVEA PVFQMEEVEF CQAHPVQFQG GWKMVRNVRT AMSKDVHCVN  700
NIRDLATRKA WSNAQHHGGL ALSAGIPVVE RFYSRFTLYD TPRKHQRIDT  750
VTNVHKWRGS GGSYVVTPEA RASFWAAFGL TGDEQLALED RLDRWEMDLF  800
GIEGVDAHEP SILDSAVA  818
```

Abb. 20: Aminosäurensequenz des p92 Replikase Proteins von TBSV-BS3-Stat
In Blau unterlegt sind die konservierten Motive, die typisch für viele Polymerasen (AS 529-670) sind, in Rot ist das GDD-Motiv eingezeichnet (AS 625), typisch für alle Virus-Replikasen. Die unbekannte Aminosäure (AS 296) die beim Überlesen des Stop Kodons eingesetzt wird, ist mit einem Punkt gekennzeichnet.

1.7 TBSV-BS3-Statice assoziierte Submoleküle

1.7.1 Satelliten-RNA

Die Bestimmung der Virussequenz war ein wichtiger Schritt, um eine Strategie zu entwickeln, die die Kontrolle der Virose ermöglicht. Im Zusammenhang mit anderen Viruserkrankungen in Nutzpflanzen verursacht von Tombusviren (Celix et al., 1997), wurde das Erscheinen von Submolekülen beschrieben. Es gibt zwei Klassen der Submoleküle, die anhand ihrer molekularen Struktur unterschieden werden können. Beide Klassen werden nur repliziert, wenn sie gleichzeitig mit einem Virus assoziiert sind. Da DI (*defective interfering* RNA) und Sat (Satelliten RNA) sehr oft einen Einfluß auf die Symptomausprägung ausüben (Roux et al., 1991; Roossinck et al., 1992; Arnada et al., 1993, 1997; Grieco et al., 1997), war es notwendig, eine mögliche Assoziation dieser Submoleküle mit

dem TBSV-BS3-Statice zu prüfen. Die Vermehrung der Parasiten Moleküle erfolgt mit Hilfe der Virus Replikase, die beiden Klassen der Moleküle fehlt. Die Übertragung ist nur möglich, wenn die Virushülle das Helfer Virus und die Submoleküle aufnimmt. Die Verpackung der *defective interfering* RNA in die Virushülle ist weitaus weniger effektiv im Vergleich zu Aufnahme der Satelliten RNA, die in der Kopienzahl fast dem des Helfer Virus gleicht. In natürlichen Systemen (Freiland) ist nur das Erscheinen von Satelliten RNA beschrieben worden, die ein Zufallsereignis darstellt. Die *defective interfering* RNA ist bis jetzt nur nach einer Subinokulation in Tabak beschrieben worden (Celix et al., 1997).

Isolierte RNA aus Viruspartikeln, denaturiert und aufgetrennt in einem TBE-Agarosegel, splittet sich im Falle von Vorhandensein der Satelliten RNA in zwei distinkte Banden (4,7 kb, und ca. 0,7-0,8 kB je nach Isolat), wobei die kleinere Bande die Sat-RNA darstellt (Abb. 21). Diese Bande kann aus dem Gel eluiert und die Sequenz der RNA somit bestimmt werden. Nach einer RNA Isolation aus Viruspartikeln der Isolate Statice Nr. 33 und Isolat Löwenzahn konnte das Vorhandensein, einer Satelliten RNA nicht detektiert werden (Abb. 21). Somit enthalten die Virus Isolate keine Satelliten RNA, die eventuell das Infektionsverhalten beeinflussen könnten.

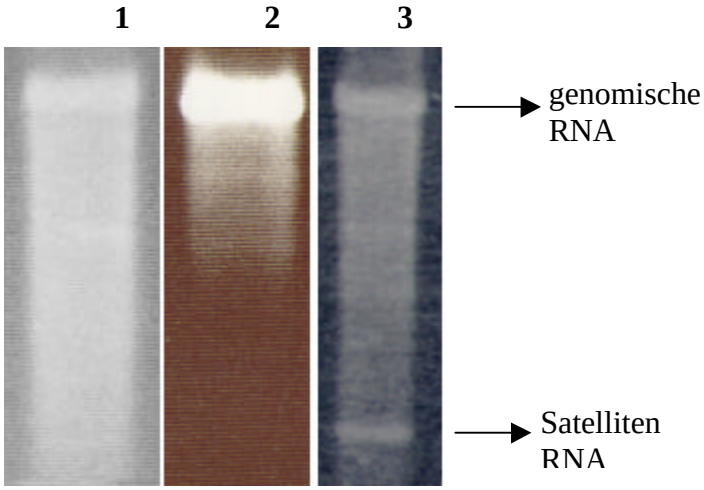


Abb. 21: Vergleich der Viruspartikel-RNA verschiedener Isolate.
Die RNA wurde isoliert, mit FDE-Lsg. versetzt und auf einem 1% TBE-Gel aufgetrennt.
1. Isolat Statice Nr.33. Neben genomischer RNA ist keine Satelliten RNA vorhanden.
2. Auch das Löwenzahnisolat enthält keine Satelliten RNA.
3. Referenzvirusisolat unbekannter Herkunft (pers. Mitteilung Wetzel), das neben der genomischen RNA zusätzlich ein Satellitensubmolekül repliziert.

1.7.2 DI-RNA

Defective interfering RNA ist ein Mosaikmolekül, das aus Teilen des Helfervirus Genoms besteht. Die einzelnen Segmente (Abb. 22) sind hoch konserviert, und das Erscheinen des Moleküls hat eine Reduktion der Replikation des Helfervirus zur Folge, wobei gleichzeitig die Molekülzahl der DI-RNA drastisch ansteigt. Da weniger genomische Virus RNA-Kopien hergestellt werden, ist die Symptomausprägung in der Pflanze geringer (Havelda et al., 1998). Die Verpackung in die Virushülle ist viel weniger effizient als bei Helfer Virus Genom oder Stelliten-RNA. Deshalb ist die Visualisation

der DI-RNA in einem TBE-Gel nicht möglich. Die Northern blot Analysen geben aber einen guten Hinweis auf das Vorhandensein eines DI-RNA Moleküls nach Vermehrung des Isolates in Tabakpflanzen (Abb. 19). Um die Existenz des Moleküls nachzuweisen, wurde die Sequenz der DI-RNA bestimmt. Die cDNA wurde mit Hilfe des IR28-Primers aus virusinfizierten *N. benthamiana* Pflanzen synthetisiert und anschließend eine PCR-Reaktion angeschlossen (Primer 5'Ende; IR28). Das PCR Produkt wurde kloniert und sequenziert. Die DI-RNA ist 521 bp groß (Abb. 22) und enthält die erwarteten Segmente (White, 1996), die charakteristisch für ein DI-RNA Molekül sind (Abb. 23)

5'AGAAATATCTCAGGATTTCTCGACCTAGTTCGTTGTTATCTGGTGACTTGCGCTAACTGTTGCTTTGCGTAGAGAATTTCTC

TCCTTTGTTAATTCTTTGACTTAGGGGTTTGAAGGTTGGGTCTACCTTTCTGGGGGGATAAATTGTAACTTCCAACAAACAA

GCAACATG*GAAAGCAGTTTGTGAGAAGGTTGGGGTGGCCCACCGACTAGGGTATGATGGTTTCCTGTCATACTACAGTGG

TGCGAAACTCCGTACTTACACACGAGCTGTGGAGAGTCTGCATATCACTCCTGTTTCTGAGAGGGATAGTCATCTGACTACC

TTCGTGAAAGCAGAGA*GTAAGACAGGCTCTTCAGTCTGAGTTCGCGGAAACGAGTGTGAATCTGACAACGTATG*TACGA

GAATCGGACGTCACTTGTGGAAACGTGCCCAGACACGGTTGATCTCACCCTTCGGGGGGGCTATAGAGATCGCTGGAAGCA

CTACCGGACAACCGGAACATTGCAGAAATGCAGCCC3'

Abb. 22: DI-RNA Sequenz, die aus virusinfizierten *Nicotiana benthamiana* Pflanzen mit Hilfe der PCR kloniert wurde
Die Total-RNA aus infizierten Tabak-Pflanzen wurde isoliert und in die reverse Transkriptions-PCR eingesetzt. Als Oligonukleotide wurden der 5'Ende- und der IR28-Primer eingesetzt. Das PCR Produkt ist in pUC18 *Sma* I kloniert worden. Die Sterne trennen die einzelnen, der genomischen Sequenz des Helfer Virus homologen Blöcke (I-IV) voneinander ab.

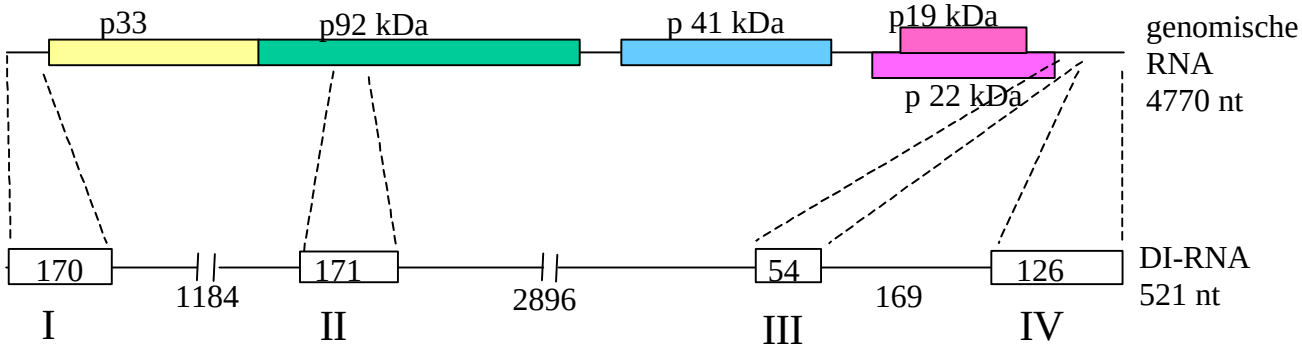


Abb. 23: Schematische Darstellung der genomischen RNA-Sequenz des TBSV-BS3-Statice und der assoziierten DI-RNA
Die DI-RNA entsteht durch eine stufenweise Deletion der genomischen RNA, bis ein stabiles Molekül entsteht. Römische Zahlen (I,II,III.IV) bezeichnen die einzelnen Segmente der DI-RNA, die homolog zur genomischen RNA sind. Die Zahlen, wenn nicht anders angegeben, geben die Nukleotidanzahl an.

Das Auftreten der DI-RNA Moleküle ist in natürlichen Systemen nie beschrieben worden. Da die DI-RNA Moleküle aber auf den Infektionsverlauf einen starken Einfluß haben, sollte im Rahmen dieser Arbeit das Auftreten der DI-RNA in infizierten Staticen geprüft werden. Versuche, die RNA, die aus infizierten Staticen gewonnen wurde, in PCR-Reaktionen einzusetzen schlugen fehl (Abb. 24). Die Virus-RNA, die aus Virussuspension gewonnen wurde, liefert in einer reversen Transkriptions-PCR die erwarteten Produkte. Wird aber dieser RNA-Fraktion isolierte Staticen-RNA zugefügt, wird die PCR-Reaktion behindert. Das erwartete Produkt kann nicht amplifiziert werden. Offensichtlich enthält die RNA Präparation Pflanzeninhaltsstoffe, die die Reaktion behindern.
Die RNA-DNA Hybridisationen (*Northern blot*) geben aber einen Hinweis auf das Vorhandensein des Moleküls (Daten nicht dargestellt).

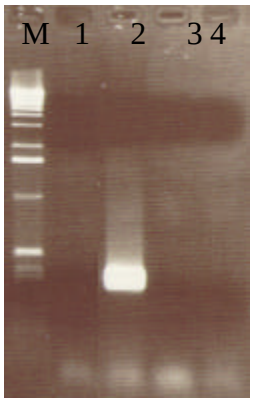


Abb. 24: Reverse Transkriptions-PCR der Virus-RNA und infizierter Staticen Pflanzen-RNA
Virus-RNA und RNA aus infizierten Staticen wurde in eine reverse Transkriptions-PCR eingesetzt (Titan Fa. Boehringer). Für die Amplifikation wurden Oligonukleotide homolog der Sequenz des Hüllproteins benutzt (Cpp2-Cpp3).
1. negativ Kontrolle 1µl H_20. **2**. Virus RNA 1µl der RNA-Präparation (1µg) (Material und Methoden). Das erwartete Produkt von 0,3 kB wird amplifiziert. **3**. Virus RNA 1µl+ Staticen RNA 1µl. Keine Amplifikation **4**. Staticen RNA 1µl. Keine Amplifikation.

1.8 Klonierung einer infektiösen cDNA Kopie des Virus

Um definierte Versuchsbedingungen für die späteren Transformationsversuche der Statice zu etablieren, war es notwendig, eine infektiöse Kopie der Virussequenz herzustellen. Ist eine solche Kopie virulent, geht man davon aus, daß die erhaltene Sequenz korrekt ist. Die gereinigte Virussuspension wurde für eine Virus-RNA Isolation eingesetzt. Diese wurde wiederum benutzt, um cDNA herzustellen. Die cDNA der kompletten Virussequenz wurde in zwei getrennten Schritten amplifiziert. Für die cDNA des 5'Ende des Virus wurde der Primer RepP5 benutzt und die erhaltene cDNA mit 5'Ende und RepP5 Primern in einer anschließenden PCR-Reaktion amplifiziert. Die Klonierung des Fragments in den pUC18 Vektor führte zum Klon Nr. 8. Die cDNA des 3'Ende des Virus wurde mit dem Primer JR28 hergestellt und das Fragment in einer PCR-Reaktion mit Primern 1610-1627 und IR28 amplifiziert. Das amplifizierte Fragment wurde ebenfalls in einen pUC18 Vektor kloniert. In beiden Fällen war der Vektor mit *Sma* I linearisiert und anschließend dephosphoryliert worden. Der resultierende Klon war der Klon Nr. 311.

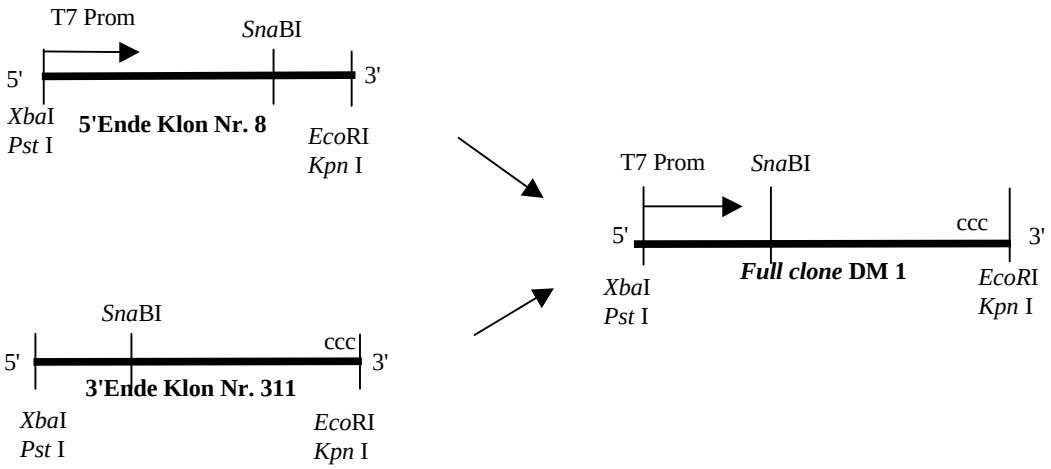


Abb. 25: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des infektiösen cDNA *full clone* DM1
Das 5' Ende des Klones Nr. 8, kloniert in pUC18 wurde mit *Sna*BI und *Xba* I geschnitten und das Fragment, das den T7 Promotor enthält, aus einem 0,8%igem *low-melting* TBE-Gel eluiert. Der 3' Ende Klon Nr. 311, ebenfalls in pUC18 kloniert, wurde mit *Sna*BI und *Xba* I aufgeschnitten und mit dem eluierten Fragment ligiert. Die Zeichnung *Full clone* DM1 gibt das Ergebnis der Klonierung wieder. Die Zeichnung ist nicht maßstabgetreu.

Die Klonierung der kompletten Sequenz des Virus erfolgte in zwei Schritten (Abb. 25), wobei das 5'Ende mit einem T7-Promotor versehen worden war (Primer 5'Ende), um mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase RNA-Transkripte herzustellen, die dann auf die Pflanzen appliziert werden sollten.
Um eine effektive Infektion zu erhalten, sollten die Transkripte mit der korrekten 3'Ende Sequenz terminiert sein. Die End-Sequenz der Tombusviren enthält drei CCC. Eine Klonierung der cDNA in einen *Sma* I geschnittenen Vektor (in diesem Falle pUC18) rekonstruiert die *Sma* I Schnittstelle. Wird dieses Konstrukt erneut mit *Sma* I geschnitten, führt das zu einem linearisiertem Molekül, das die pUC18 Sequenz und die cDNA mit dem korrekten Ende beinhaltet (Abb. 25). Die RNA Transkripte entsprechen dann exakt der Virus RNA die, auf die Pflanzen appliziert, zuerst lokale Läsionen verursacht und später zu einer systemischen Infektion der apikalen Blätter führt (Abb. 26).

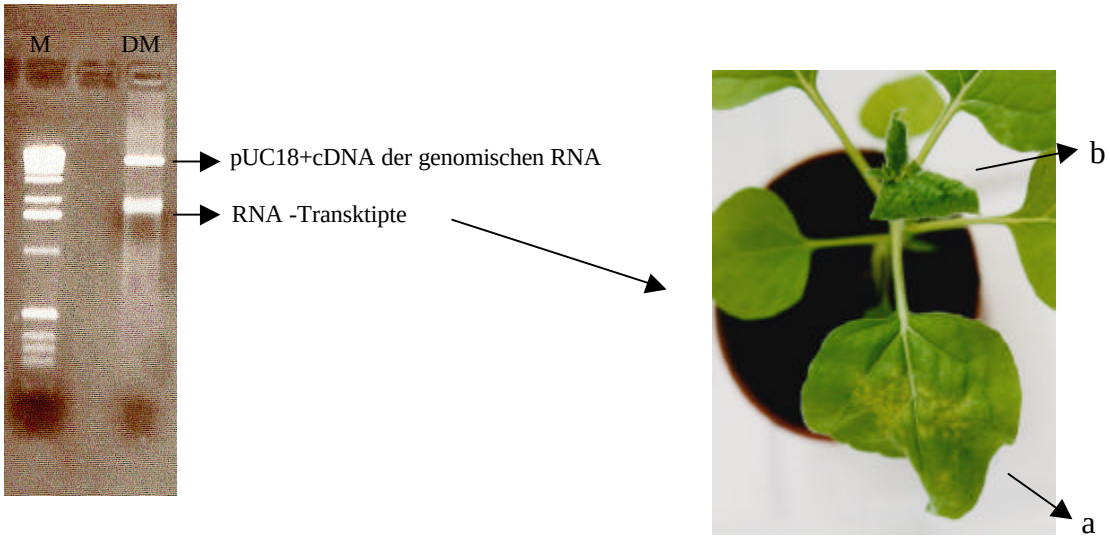


Abb. 26: Visualisation der Transkriptionsreaktion und die Symptomausprägung nach einer 10 tägigen Infektionszeit an *N. benthamiana* Pflanzen.
Der cDNA-Sequenz-Klon DM 1 des Virus TBSV-BS3-Stat. kloniert in pUC18 und geschnitten mit *Sma* I wurde in eine Transkriptionsreaktion eingesetzt (siehe Material und Methoden). Ein Aliquot von 2 µl, aufgetrennt in einem 1%igem TBE-Gel, zeigt den linearisierten DM 1 Klon und die dazu gehörenden RNA Transkripte. Je 30 µl der Reaktion werden auf eine *N. benthamiana* Pflanze appliziert. Diese zeigt nach ca. 3-4 Tagen typische Lokalläsionen (**a**) und später systemische Infektion der apikalen Blätter (**b**).

Die Symptomausprägung der mit den RNA-Transkripten infizierten Pflanzen (n=10) beweist, daß die sequenzierte Kopie des Virusgenomes korrekt ist. Der Klon DM 1 wird für die Subklonierung der Replikase in einen Pflanzentransformationsvektor benutzt. Das resultierende Konstrukt wird für die Pflanzentransformation verwendet.

1.9 Subklonierung der Replikase oder deren Fragmente in einen binären, Pflanzen-transformationsvektor

Virusresistenzversuche mit transgenen Tabakpflanzen, bei denen bestimmte Abschnitte des Virusgenoms in Pflanzengenome transformiert wurden, geben einen guten Hinweis auf die Verwendung der Replikase und deren Teile für eine Resistenzinduktion in Pflanzen (Rubino et al., 1993; Rubino et al., 1995 Russo et al., 1998;). Als binärer Vektor für die Transformation der Pflanzen sollte der PGJ357 dienen. Dieser Vektor enthält das *aadA* Gen, das eine Resistenz gegenüber Spectinomycin und Streptomycin verleiht. Diese Eigenschaft wurde für die Klonierungschritte in

E. coli benutzt. Des weiteren besitzt dieser Vektor die *left border* und *right border* Sequenzen, die eine multiple Klonierungsstelle und das *npt* II Gen flankieren. Das *npt* II Gen vermittelt eine Resistenz gegenüber Kanamycin. Diese wird bei der Transformation der Pflanzen als Selektionsmarker eingesetzt.

Um ein Gen in einer Pflanze exprimieren zu können, muß dieses Gen eine Promotor und eine Terminator Sequenz besitzen. Da die multiple Klonierungsstelle des PGJ357 Vektors und die Gene des TBSV-BS3-Stat. diese nicht besitzen, mußten diese erst eingebracht werden. Das Plasmid PRT101 besitzt den 35S Promotor und 35S Terminator des *cauliflower mosaic virus* (Töpfer et al., 1987). Diese Sequenzen gehören zu den am häufigsten benutzten Promotor und Terminator-Sequenzen. Die Sequenz des 35 S Promotor und die der Terminator Sequenz wurden in die multiple Klonierungsstelle des PGJ357 subkloniert. Der resultierende Vektor PGJPRT dient als Ausgangsvektor für alle nachfolgenden Konstrukte (Abb. 27).

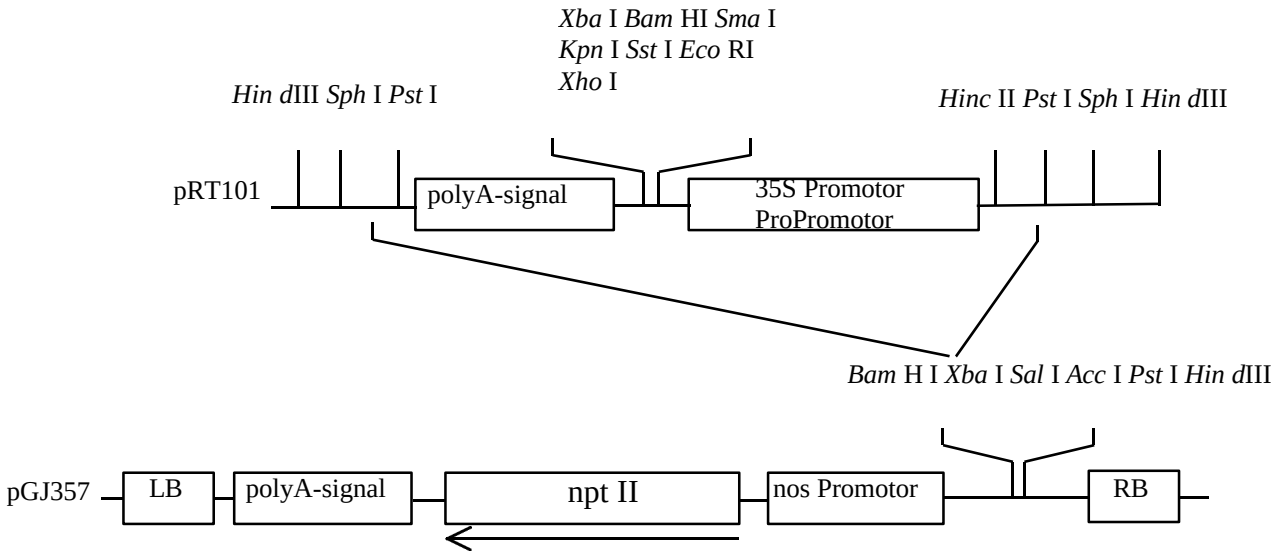


Abb. 27: Klonierungsstrategie für die Herstellung des binären Pflanzentransformationsvektors PGJPRT
Der Vektor PGJ357 wurde mit *Xba* I geschnitten. Mit Klenow in einer *blunt*-Reaktion wurden die überhängenden Enden aufgefüllt. Der Vektor pRT101 wurde mit dem Enzym *Pst* I geschnitten. Das Fragment das den 35S-Promotor+35S Terminator enthält, wurde eluiert und die Enden wurden mit Klenow aufgefüllt. Der resultierende Vektor nach der Ligation wurde PGJPRT genannt.

Von vielen Pflanzenviren ist bekannt, daß eine Transformation mit der Sequenz des Hüllproteins zu einer Virusresistenz führen kann. Da dies aber im Falle der Tombusviren zu keinem befriedigenden Ergebnis führte (Rubino et al., 1993; Ciuffreda et al., 1998) wurde diese Möglichkeit verworfen und der Fokus auf die Replikase-Transformation gelenkt. Eine Expression von *sense* und *antisense* RNA des betreffenden Virus führt auch zu einer Virusresistenz in Pflanzen (Waterhouse, 1998). Aus diesem Grunde wurden nicht nur Konstrukte der Replikase in *sense* sondern auch Konstrukte der Replikase in *antisense* hergestellt. Als Leader-Sequenz wurde die viruseigene, nicht kodierende 5'Ende-Sequenz

benutzt (Abb. 28), da man sich eine Verstärkung der Translation der Proteine erhofft. Infiziert das Virus die Pflanze, werden sofort Replikase Proteine hergestellt. Somit muß die nicht translatierte Sequenz am 5'Ende des Virus regulatorische Sequenzen besitzen, die die Stimulation der Translation verstärken.

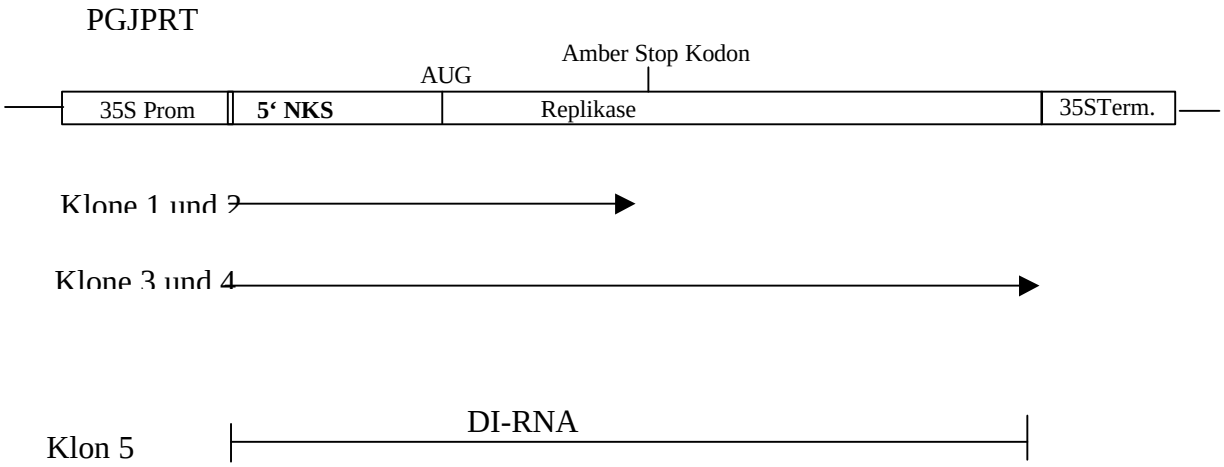


Abb. 28: Klone, die für die Transformation der Staticenpflanzen hergestellt wurden
Der Vektor PGJPRT wurde mit *Sma*I geschnitten und dephosphoryliert. Die Replikasesequenzen des Virus TBSV-BS3-Stat. wurden mittels PCR amplifiziert und die Fragmente in den vorbereiteten Vektor ligiert. Die Klone 1 und 2 wurden mit dem Primerpaar 5'Ende und Rep5'prt33 hergestellt, wobei der Klon 2 die *antisense* Orientierung gegenüber dem 35S Promotor aufwies. Die Klone 3 und 4 wurden mit dem Primerpaar 5'Ende und Rep3'prt55 amplifiziert. Der Klon 4 ist *antisense* orientiert im Bezug auf den 35 S Promotor. Der Klon 5 enthält die DI-RNA, die mit dem Primerpaar 5'Ende und IR28 amplifiziert wurde.

Die Transformation und Etablierung einer transgenen Staticen-Pflanze erfordert eine sterile Gewebekultur. Zur Transformation wird ein regenerierendes Gewebe, der Kallus benötigt, aus dem eine komplette Pflanze regeneriert werden kann. Da ein Regenerations- und Transformations-System für die Statice nicht etabliert war, mußte für die Transformation der Statice mit den Replikase Konstrukten dieser erarbeitet werden.

Teil 2. Regeneration und Transformation der Statice

2.1 Ausgangskultur

Der erste Schritt galt der Anzucht einer sterilen Ausgangskultur, die dann genügend Material für die Versuchsreihen liefern sollte. Diese Ausgangskultur wurde aus sterilen Samen aufgezogen. Die Sterilisation der Samen erwies sich als schwierig, da die Sterilisationsprotokolle, die z.B. für Raps-Samen angewendet werden, waren im Falle der Staticensamen nicht wirkungsvoll. Bei unzureichender Sterilisation der Samen wurde bei fast jedem der Samenkörner ein Pilzmycelwachstum beobachtet. Der Grund für die Schwierigkeiten bei der Sterilisation ist wahrscheinlich die raue Oberfläche der Samen. In die Vertiefungen können die Sporen der Bakterien und Pilze eindringen und relativ geschützt die Hypochlorid-Behandlung überleben. Eine Inkubation in 2%igem Hypochlorid (5 min.) ist in den meisten Fällen für Rapssamen ausreichend. Bei Statice mußte der Vorgang auf 2 Stunden unter Schütteln bei 150 rpm erhöht werden.. Nach Modifikation des Sterilisationsverfahrens konnte keine Verunreinigung mehr festgestellt werden. Die Samen wurden auf mit Keimungsmedium getränktem Filterpapier ausgelegt. Nach 3 Tagen kam es zum Bruch der Samenschale und Erscheinen der Keimwurzel. Später warfen die Kotyledonen die Samenschale ab. Die Keimlinge wurden bis zu einem Stadium von 5-6 Blättern kultiviert. Dies dauert durchschnittlich einen Monat. Die Pflanzen wachsen nicht synchron, deshalb mußte eine entsprechende Menge der Pflanzen herangezogen werden, damit genügend gleichwertiges Material für Versuche zur Verfügung stand. Als erstes Ziel galt es ein Kallusstadium des Gewebes zu induzieren. Um dies zu erreichen, mußte zuerst das Gewebe bestimmt werden, das die Fähigkeit zur Regeneration besitzt. Dieses Gewebe sollte dann mit Agrobakterien infiziert und die transformierten Zellen unter Selektionsbedingungen zu einer Pflanze herangezogen werden.

2.2 Bestimmung der regenerativen Pflanzenteile der Statice

Die Bestimmung des regenerativen Gewebes ist notwendig, um ein Transformationsprotokoll zu etablieren. Von anderen Pflanzen (Tabak, Raps) ist bekannt, daß Blätter ein gutes Regenerationsausgangsmaterial sind. Die ersten Versuche, Staticenblätter zur Kallusbildung, anzuregen schlugen fehl. Die Blätterstückchen wurden braun, die Agarareale um die Blattstücke wurden ebenfalls braun, später schwarz. Die Hormonkonzentrationen und Kombinationen, die verwendet wurden, waren die gleichen wie in Tabelle 7 aufgelistet. Da auf Informationen aus Fachliteratur im Falle der mehrjährigen Statice (*Goniolimon tataricum*) nicht zurückgegriffen werden konnte, wurde deshalb das Wachstum der Staticenpflanzen im Gewächshaus beobachtet. In einigen wenigen Fällen bildet die Statice einen neuen Sproßscheitelpunkt dicht neben dem Scheitelpunkt, der im Keimling angelegt worden war. Die Sproßachse der Statice ist sehr gestaucht, die Blätter bilden eine Rosette, deshalb war der Ursprung des neuen Sproßscheitelpunktes schwierig zu bestimmen. Aufgrund dieser Beobachtung wurden einige Pflanzen der sterilen Ausgangskultur (n=50) in ca. 1 cm

große Stücke zerschnitten und auf ein Medium (MS-Grundmedium), das keine Hormone enthielt, gelegt. Die Blätter wurden wieder braun, aber Teile der Sproßachse und die, Wurzel zeigten vereinzelt schwaches Kalluswachstum. Das Kalluswachstum kann mit einer geeigneten Phytohormonkonzentration verstärkt werden. Bewährt haben sich Kombinationen von Cytokininen mit Auxinen. Folgende Kombinationen wurden für die Kallusinduktion eingesetzt.

Tabelle 7: Hormonkombinationen die für die Kallusinduktion verwendet wurden
Die Konzentrationen der jeweiligen Hormone betrugen 1 mg/l. Die Explantate der Blätter wurden braun und starben ab. Die Sproßachsen- und Wurzel-Explantate konnten unter bestimmten Hormonkombinationen zum Kalluswachstum angeregt werden.

Hormonkombination	**Kallusentwicklung an Sproßachsen und Wurzeln**
IAA/KIN	Vereinzelt schwaches Kalluswachstum, Kallus eher braun
IAA/BAP	Kein Kalluswachstum
IAA/2,4D	Kallusbildung nur in wenigen Fällen, Kallus eher grün
NAA/KIN	Starkes Kalluswachstum, mit beginnender Differenzierung
NAA/BAP	Kein Kalluswachstum
NAA/2,4D	Kein Kalluswachstum

Die Kombination NAA/Kinetin zeigte das beste Ergebnis. Der Kallus war grün, rötlich und zeigte nach ca. 2-3 Wochen die ersten kleinen Blättchen. Beste Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Konzentration der Hormone von 0,1-2 mg/l eingesetzt wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8: Auswirkung der unterschiedlichen Hormonkonzentrationen auf die Kallusbildung bei Wurzel-Explantaten
Die Hormonkonzentrationen wurden als mg/l in einem MS Grundmedium angesetzt. Die Anzahl der Explantate pro Kombination betrug 50. Die Kombination 1mg/l der beiden Hormone wurde für weitere Experimente ausgewählt. Der Prozentsatz bezieht sich auf die Kallusbildung der Ausgangsexplantate.

KIN/NAA	**0,1**	**0,5**	**1**	**1,5**	**2**
0,1	60%	0%	17%	50%	0%
0,5	73%	68%	38%	64%	69%
1	26%	68%	**71%**	86%	38%
1,5	76%	61%	40%	100%	100%
2	93%	62%	100%	55%	73%

Obwohl in manchen Fällen die Kallusbildung 100% betrug, mußte auch die Beschaffenheit des Kallus berücksichtigt werden. Kalli, die zuviele Sproßachsenanlagen produzierten, zeigten später keine Differenzierung in Blätter und Sprosse. Deshalb wurde eine Kombination der Hormone NAA und

Kinetin von jeweils 1 mg/l gewählt, da diese, wenn Kalluswachstum erfolgte, dann noch die Differenzierung in Blätter und Sproße ermöglichte.

2.3 Kallusinduktion in Infloreszenzanlagen.

Eine der einjährigen Staticen-Arten (*Limonium cavanillesii*) wurde bei Verwendung von Influoreszenzanlagen erfolgreich regeneriert (Amomarco et al., 1998). Daher bot es sich an, auch für *G. tataricum* ein Protokoll ausgehend von Influoreszenzen als Explantate zu erarbeiten. Sollte die Transformation der Wurzel-Kallus-Anlagen nicht möglich sein, wäre es in diesem Falle möglich, auf ein anderes System auszuweichen.
Mitte Mai (witterungsabhängig) bildet die Staticen Pflanze eine Infloreszenzanlage, selten zwei aus. Dieser Blüttenstand ist rispig aufgebaut (Abb. 29).

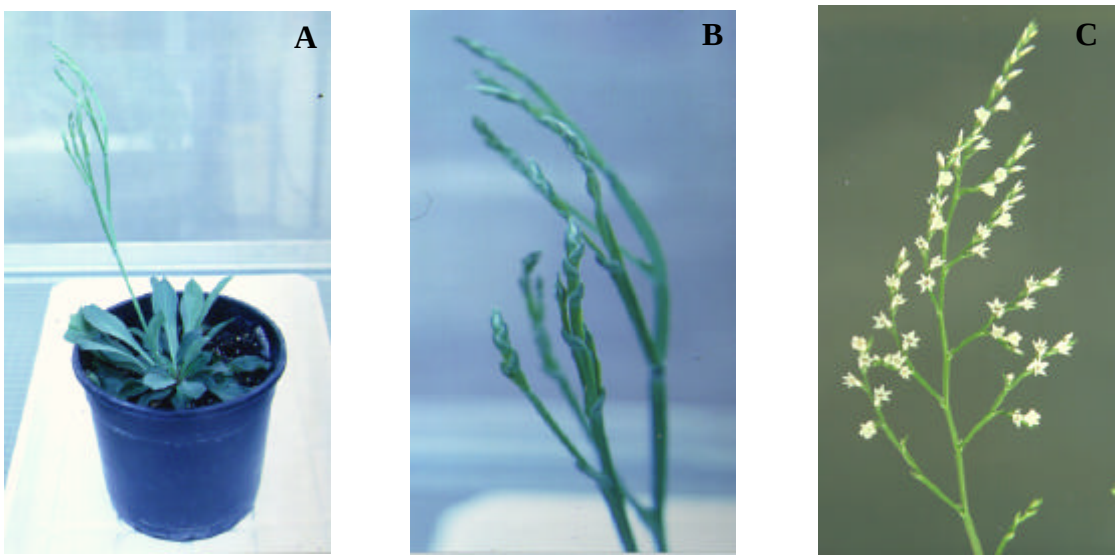


Abb. 29: Infloreszenzbildung der Statice.
A: Gewächshausstatice mit Infloreszenzanlage nach Vernalisation. Erkennbar sind die Blattrosette und die Infloreszenz. **B**: Detailaufnahme der Infloreszenz. **C**: Blütentragende Infloreszenz.

Für die Versuche wurden nur grüne, nicht vollständig entwickelte Infloreszenzanlagen verwendet. Diese wurden sterilisiert und in ca. 1 cm große Stücke zerschnitten und mit folgenden Hormonkonzentrationen, die der Literatur für die einjährige Statice (*Limonium cavanillesii*) entnommen wurden, behandelt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Hormone, die für die Kallusinduktion an Infloreszenzstücken eingesetzt wurden
Die Anzahl der Explantate betrug 100 pro Kombination.

Hormonkonzentration	**Regenerationsverhalten**
1 mg/l KIN+2 mg/l 2ip	Kein Kalluswachstum sondern Sproßbildung mit Blättern bei fast allen Explantaten.
0,5 mg/l KIN+1 mg/l 2,4D	Kallusbildung mit Sproßbildung und Blättern an fast allen Explantaten.
0,1-1,5 mg/l KIN/ + 0,1-1,5 mg/l NAA	Kallusbildung und Bildung von Sproßanlagen mit Blättern bei fast allen Explantaten.
1,5 mg/l KIN / + 1,5 mg/l NAA	Gute Regeneration bei fast allen Explantaten.

Zusätzlich wurden Versuche mit Infloreszenzanlagen und der Hormonkombination Kinetin und NAA durchgeführt. Die zusammengefaßten Ergebnisse des 1-monatigen Versuchs sind in der Tabelle 9 aufgelistet. Da der Einsatz der Kombination der Hormone Kinetin/NAA ähnliche Resultate erzielt hatte wie in den Wurzelexplantatversuchen, wurden die Transformationsversuche mit *Agrobacterium* unter Verwendung der Kombination 1 mg KIN/1 mg NAA durchgeführt.

Ein Nachteil der Infloreszenz-Kultur ist, daß sie saisonal begrenzt ist, d.h. nicht das ganze Jahr über durchgeführt werden kann, und die Kallusbildung mit Sproßanlagen und Blättchen im Vergleich zur Wurzel-Kallus-Kultur etwa doppelt so lange dauert.

2.4 Transformationsversuche der Statice mit *Agrobacterium tumefaciens*

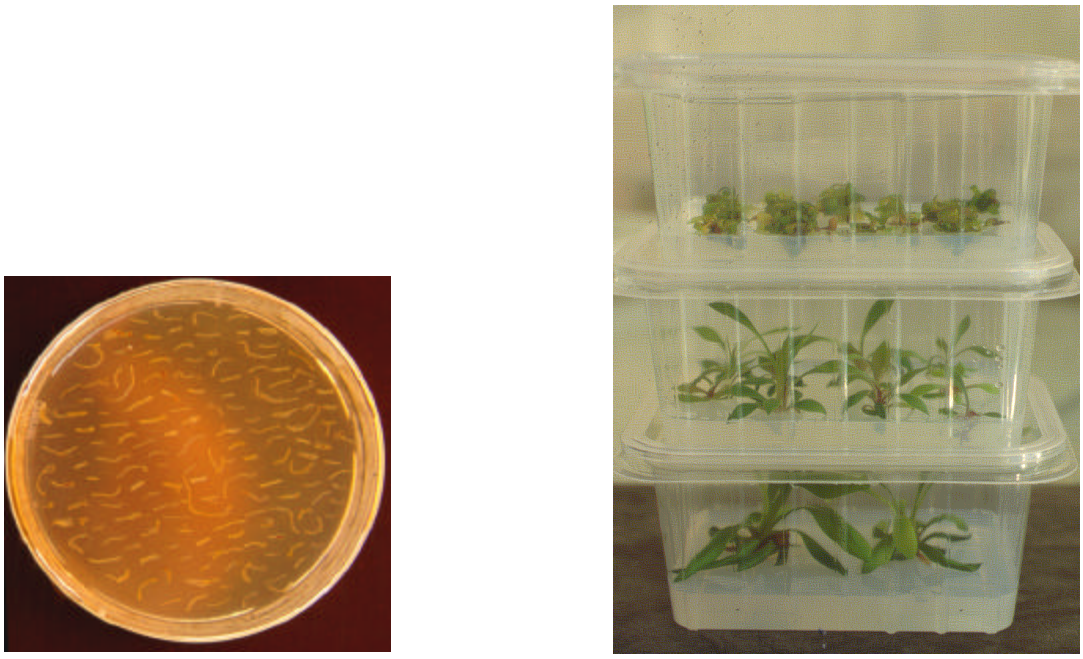
Die vorhergehenden Versuche haben eine Grundlage geschaffen, um ein Transformationsprotokoll für die DNA-Übertragung in die Statice zu erarbeiten. Da die Statice keine klassische Gewebekulturpflanze ist, müssen einige, für die agrobakteriumvermittelte Transformation wichtige Parameter ermittelt werden.

2.4.1 Ermittlung der Antibiotikakonzentrationen

Versuche zur Etablierung der Regenerationsprotokolle für die Statice (*Goniolimon tataricum*) haben es ermöglicht, ein Transformationsystem zu entwickeln. Agrobacteriumvermittelter Transfer ist den anderen Methoden (Protoplastenfusion, Beschuß mit Partikeln) immer vorzuziehen. Ein hochvirulenter Agrobakterium Stamm ATHV stand zur Verfügung, der bereits erfolgreich für die Transformationen anderer Kulturen (Raps, Rebe) eingesetzt wurde. Die Transformation und die Transformationseffizienz kann besser nachvollzogen werden, wenn ein sichtbarer Marker (Reporter-

Gen) benutzt wird. Als Reporter Gen wurde das Gen GUS-Intron benutzt. In dem Konstrukt GUS-Intron wird die genetische Information für die *ß-Glucoronidase* von einem eingebauten Pflanzenintron unterbrochen, deshalb wird das Enzym nur in Pflanzengewebe exprimiert, das transformiert wurde (Vancanneyt et al., 1990).

Als Ausgangsmaterial für die Transformationsexperimente wurden Wurzel oder Infloreszenzen genommen. Die Transformation erfolgte nach dem in Material und Methoden beschriebenen Protokoll. Die Infloreszenzen Explantate erwiesen sich als untauglich für die Transformation, da sie sehr empfindlich auf die Infektion mit Agrobakterien reagierten. Das Wachstum blieb aus, sie wurden braun und schließlich schwarz. Die Wurzelexplantate erwiesen sich als das bessere Ausgangsmaterial für die Transformation. Sie zeigten zwar ein verzögertes Wachstum des Kallusgewebes, blieben aber hellgelb und wurden an den kallusbildenden Stellen grün (Abb. 30). Aus diesem Grunde wurden alle weiteren Versuche auf das Wurzelsystem konzentriert.



A **B**

Abb. 30: Agrobakterieninfektion der Wurzelexplantate
A. Die Wurzelstücke werden mit Agrobakterien infiziert und nach 3 Tagen auf das Selektionsmedium überführt
B. In der oberen Box ist die Regeneration der untransformierten Statice nach 1 Monat, in der mittleren Box nach ca. 2 Monaten und in der unteren Box nach ca. 4-5 Monaten dargestellt.

Für eine erfolgreiche Transformation ist es notwendig, die toxischen Schwellenwerte des Pflanzengewebes gegenüber den Antibiotika, die einerseits zum Abtöten der Agrobakterien und anderseits zum Selektieren des transformierten Pflanzengewebes benutzt werden, zu ermitteln. Die eingesetzten Antibiotikakonzentrationen sind in der Tabelle 10 dokumentiert.

Tabelle 10: Auswirkungen der eingesetzten Antibiotika auf das Pflanzengewebe
Unterschiedliche Antibiotika, die in den Transformationsexperimenten eingesetzt wurden, wurden auf ihre Auswirkungen auf das Pflanzengewebe getestet. Da das Timentin das Pflanzengewebe weniger schädigt als Carbenicillin oder Cefatoxin, wurde für alle nachfolgenden Versuche das Timentin in einer 100 mg/l Konzentration verwendet.

Antibiotikum	**Konzentration**	**Wurzelstücke**	**Kallusbildung**	**Kallus-regeneration in %**
Cefatoxin	250 mg/L	40	8	20
Carbenicilin	500 mg/L	43	22	51
Timentin	100 mg/L	30	27	90
Kein Antibiotikum		30	28	93
Kanamycin	5 mg/L	20	5	25
	10 mg/L	20	1	5
	15 mg/L	21	0	0
	20 mg/L	24	0	0

Aufgrund der toxischen Wirkung von Carbenizilin und Cefatoxin auf das Pflanzengewebe wurde ein neues Antibiotikum eingesetzt, das Timentin. Dieses Antibiotikum tötet in einer Konzentration von 100 mg/l die Agrobakterien, schädigt aber nicht das Pflanzengewebe (Tabelle 10).
Ein Selektionsvorteil für die transformierten Staticen-Zellen sollte durch die Zugabe von Kanamycin erreicht werden. Nur die Zellen sollten überleben, die eine stabile Insertion der T-DNA etablieren konnten. Innerhalb der *left-* und *right-border* Sequenzen des Plasmids PGJPRT ist ein *npt*II-Gen integriert, das eine Resistenz gegenüber Kanamycin vermittelt. Eine konzentrationsabhängige Exposition des untransformierten Wurzelgewebes führte zu der toxischen Schwellenwertermittlung gegenüber diesem Antibiotikum.
Die empirisch ermittelten Konzentrationen der Antibiotika wurden eingesetzt, um Transformationsexperimente an Staticenwurzeln durchzuführen. Es wurden 100 mg/l Timentin und 20 mg/l Kanamycin für die Selektion der transformierten Wurzelstücke der Staticen eingesetzt.
Das nächste Problem, das geklärt werden sollte ist, eine Verifizierung des Transformationserfolges, d.h. der Intergration der Fremd-DNA ins Pflanzengenom.

2.4.2 Reportergentest unter Verwendung von *N. benthamiana* Blätter

Die Transformation der Statice sollte mit Hilfe eines Reportergens GUS-Intron etabliert werden. Da die Staticentransformation und Regeneration voraussichtlich ca. 3 Monate in Anspruch nimmt, war es sinnvoll das Konstrukt, das zur Verfügung stand, auf seine Expressionsfähigkeit in *N. benthamiana* zu testen. Als eine schnelle und effiziente Methode hat sich die Agrobakteriuminfiltration (Kapila et al.,

1997) bewährt. Bei dieser Methode werden Agrobakterien durch die Spaltöffnungen in die Blätter gepreßt. Der Infektionsvorgang findet an den Blattparenchymzellen statt. Die Inkubation der infiltrierten Blätter dauert 3 Tage, danach kann das komplette Blatt in die Substratlösung überführt werden und die exprimierte ß-Glucoronidase bewirkt die Umwandlung des Substrats in einen unlöslichen Farbstoff Indigo (siehe auch Teil Material und Methoden). Die Entwicklung des Farbstoffes dauert ca. 5 Stunden. Der gesamte Test dauert ca. 5 Tage und stellt ein gutes System dar, um jegliche Pflanzenexpressionskonstrukte zu testen. *N. benthamiana* Blätter eignen sich sehr gut zum Infiltrieren. Nach Entfärben durch 70% Ethanol ist der blaue Farbstoff gut zu sehen (Abb. 31). Mit dem getesteten Konstrukt GUS-Intron wurden die Transformationen an den Wurzeln der Statice vorgenommen.

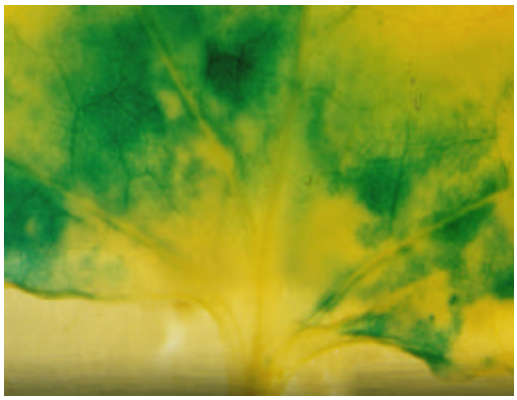


Abb. 31: Teile eines mit dem GUS-Intron Konstrukt infiltrierten *N. benthamiana* Blattes. Blau-grüne Färbung zeigt die transformierten Pflanzenzellen auf. Das Pflanzeneigene Chlorophyll ist mit 70% Ethanol entfärbt worden.

2.4.3 Ermittlung der Infektionseffizienz des Agrobakterienstammes ATHV in der Transformation der Staticenwurzel

A. tumefaciens ist ein Bakterium das Teile seiner Plasmid-DNA in die Pflanze überträgt. Diese DNA wird in das Pflanzengenom integriert. Die Stämme dieser Art infizieren hauptsächlich oberirdische Teile der Pflanze (Sprosse, Blätter, Achsen). Da die Infektion der Infloreszenzen der Statice nicht die erwünschten Ergebnisse erbrachten und das Wurzelgewebe eine gute Regenerationsfähigkeit besitzt, sollte ein Wurzeltransformationsprotokoll etabliert werden. Zur Verfügung stand ein hochvirulenter Stamm ATHV, der für die unter Material und Methoden beschriebene Transformation der Staticenwurzel, benutzt werden sollte. Wichtig war festzustellen, ob dieser Stamm die Wurzelexplantate infizieren und die T-DNA übertragen konnte.

Die Wurzelstücke wurden 3 Tage lang mit dem *Agrobacterium* ATHV, das das Plasmid GUS-Intron Konstrukt enthält, infiziert. Eine Woche nach der Infektion wurden die Infektionsereignisse anhand der blauen Färbung ausgezählt.

Von 50 Wurzelstücken wiesen 5 punktförmige blaue Areale auf (Abb. 32), die ein Infektionsereignis darstellen. Es ist also möglich, die Wurzelexplantate mit dem Stamm ATHV zu infizieren und Transformationen durchzuführen.

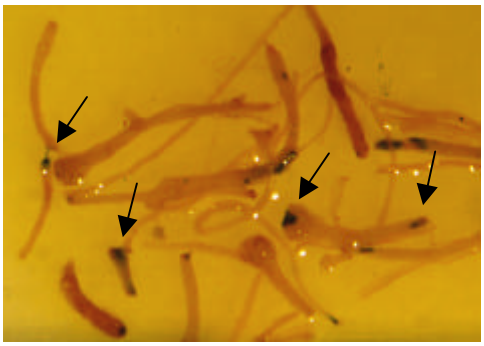


Abb. 32: Wurzelexplantate, die mit dem Reporter-Gen GUS-Intron tranformiert wurden
Angezeigt sind ➔ punktuelle Transformationsereignisse an Wurzelexplantaten der Statice. Die enzymatische Nachweisreaktion (siehe Material und Methoden) wurde eine Woche nach Infektion durchgeführt.

2.5 Transformantenregeneration

Ein Infektionsereignis bedeutet allerdings noch nicht, daß eine Regeneration von transformiertem Gewebe möglich ist. Aus diesem Grunde wurden die Transformationsversuche fortgesetzt, um die Regenerationsraten zu ermitteln. Als Marker-Konstrukt wurde abermals das GUS-Intron in dem Stamm ATHV benutzt. Nach Auswertung eines 2-monatigen Transformationsversuches konnten Blaufärbungen (GUS-Intron Intergration) an 23% (n=100) der Explantate gezählt werden. 17% der Explantate zeigten ein zumindest Ein-Blatt Regenerationsstadium (Kallus mit erstem gebildetem Blatt) auf (Abb. 33).

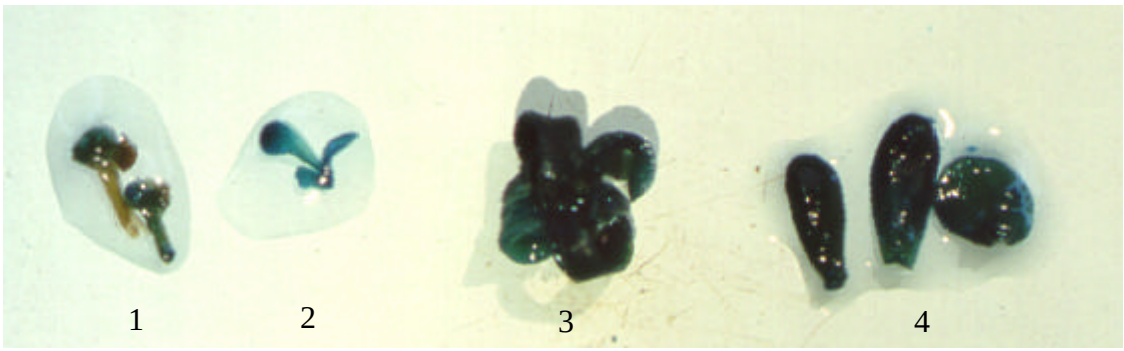


Abb. 33: Mit GUS-Intron transformierte Staticen-Explantate.
1. Wurzelexplantate mit einer deutlichen Blaufärbung entwickelt nach ca. 2 Wochen Selektion. 2. Eine transformierte Staticen-Pflanze nach 1 Monat Selektion. 3. Eine transformierte Staticen-Pflanze nach 2 Monaten Selektion. 4. Einige transformierte Staticen-Blätter. Das Pflanzen eigene Chlorophyll wurde mit 70%igem Ethanol entfärbt.

Die erarbeiteten Ergebnisse ermöglichen nun die Übertragung der viralen Konstrukte, um eine Virusresistente Staticenlinie zu etablieren. Unter den gegebenen Bedingungen ermöglicht die Selektion mit dem Antibiotikum Kanamycin, transformiertes Gewebe zu selektieren und eine mögliche Chimärenbildung aus transformierten und untransformierten Zellen zu unterdrücken.

V. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde, um eine virusresistente oder zumindest virustolerante Statice mit Hilfe der Gentechnik zu erzeugen, das Virus, welches aus kranken Staticen isoliert wurde, serologisch und molekularbiologisch charakterisiert. Die Klonierung der infektiösen DNA Kopie des Virus ermöglicht ihrerseits eine Reihe interessanter Versuche zur Wirt-Virus-Beziehungen. Diese werden im Abschluß der Diskussion als Ausblick behandelt.

Da die Statice (*Goniolimon tataricum*) keine typische Modellpflanze ist, gab es bis jetzt keine Regenerations- und Transformationsprotokolle für diese Pflanzenart. Im Rahmen der Aufgabenstellung wurden diese erarbeitet. Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen die Produktion einer gentechnisch veränderten Statice. Die Folgen dieses Vorhabens wie auch wissenschaftliche Teilaspekte dieser Arbeit werden im Nachfolgenden diskutiert.

Das Staticenvirus Isolat (TBSV-BS3-Stat.)

Aus symptomtragenden Staticen und aus einem Wildkraut (*Taraxacum officinalis*) wurde ein Virus isoliert und unter definierten Bedingungen untersucht. Die Inokulationsversuche an Staticenpflanzen wiesen dieses Virus als schädigendes Agens aus. Die anschließenden serologischen Versuche ermöglichten eine Klassifizierung des Staticenvirus-Isolats als einen nahen Verwandten des TBSV-BS3. Als Replikationsort wurden die Peroxisomen der Wirtspflanze identifiziert. Das cytopathologische Bild unterscheidet sich nicht von dem, das andere untersuchte Tombusviren verursachen (Martelli et al., 1988). Um eine eindeutige Einordnung anhand von Sequenzdaten vornehmen zu können, war es notwendig, im Bereich des Hüllproteins Sequenzdaten des TBSV-BS3 Referenzisolates (überlassen von Dr. König) zu ermitteln. Bis jetzt lagen nur Teilbereiche der Sequenz des TBSV-BS3 vor (Li et al., 1993). Mittels reverser Transkriptions-PCR war es möglich, den Hüllproteinabschnitt zu klonieren und zu sequenzieren. Nach Vergleichen der Aminosäure-Sequenzen des TBSV-BS3 und TBSV-BS3-Statice ergab sich eine 96%ige Homologie, was auch die in den serologischen Tests erhaltenen Resultate bestätigt. Die Bildung eines Spur in der Kombination TBSV-BS3-Statice mit dem TBSV-*cherry* Virus wird durch die niedrigere Homologie (73%) erklärt Nach den *guidlines of the demarcation of virus species* ist ein Unterschied von 10% in der Aminosäurensequenz des Hüllproteins notwendig um eine neue Virusart zu definieren. Das Staticenvirus ist also keine neue Virusart, sondern ein Isolat des TBSV-BS3 Virus. Die Proteine der Replikase (ORF1, ORF2) und die der Transport-Proteine (ORF4, ORF5) sind stärker konserviert und zeigen eine hohe Homologie zum TBSV-BS3 und TBSV-*cherry*. Eine Analyse des Replikase-Proteins p92 wies acht konservierte RNA-abhängige-RNA-Polymerase Motive auf (O'Reilly et al., 1998). Fünf dieser Motive sind in vielen Klassen der Polymerasen in dem katalytischen Teil der "Hand"-Domäne

vorhanden (Hansen et al., 1997; Ollis et al., 1985). Ebenfalls wurde in dem katalytischen Teil der Replikase das GDD-Motiv, daß typisch für alle Virus-Replikasen ist, bestimmt. Somit ist das Staticen Isolat ein typischer Vertreter der *Tombusvirus* Gattung. Es ist wichtig zu erwähnen, daß das Staticen Virus das erste der TBSV-BS3 ist, dessen Genom vollständig sequenziert und eine infektiöse Kopie erstellt wurde.
In der Natur kommt der TBSV-BS3 viel häufiger vor, als z.B. TBSV-*cherry*. Viele Plantagen und Gewächshäuser werden von Tombusviren Infektionen betroffen, deshalb ist die Aufklärung der Sequenz nicht nur von wissenschaftlicher Bedeutung.

Einige Isolate der Tombusviren enthalten Submoleküle (Satelliten; DI-RNA). Das Staticen Isolat enthält keine Satelliten-RNA, aber nach Inokulation von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen bilden sich DI-RNA Moleküle. In natürlichen Systemen sind DI-RNA Moleküle nicht gefunden worden. Es besteht der Verdacht, daß DI-RNA ein Artefakt der Subinokulation auf Tabak Pflanzen darstellt. Es könnte sein, daß die intrazellularen Zustände in Tabak anders sind als in Herkunftspflanzen (z.B. ist der pH-Wert des Zellsaftes in Staticenpflanzen niedriger als in Tabak), die Replikationsproteine finden daher veränderte Bedingungen vor und beginnen die Synthese von fehlerhaften Kopien des Genomes. Der Umstand, daß die DI-RNA schlechter in die Virushülle aufgenommen wird, könnte eine effiziente Ausbreitung der DI-RNA der Tombusviren in natürlichen Populationen verhindern (Russo et al., 1994). Eine andere Hypothese wird von Garcia-Arenal aufgestellt, der 57 Feldisolate untersucht hat (Celix et al., 1997). Demnach ist die Vermehrung der Tombusviren in Tabakpflanzen viel effizienter als in natürlichen Wirten. Wird die genomische RNA der Viren stärker repliziert, werden auch vorhandene DI-RNA Moleküle effizienter amplifiziert und sichtbar. Dagegen sprechen aber die Daten, die von Krczal und Beutel (1994) erhoben wurden. Demnach werden in den Staticenpflanzen viel höhere Titer erreicht als in Tabakpflanzen. Die Inhaltsstoffe (es sind wahrscheinlich Gerbstoffe) der Staticenpflanzen verhinderten eine PCR Amplifikation. Dies stellt ein wichtiges Problem dar, nicht nur für die molekulare Untersuchung der DI-RNA, sondern auch für die Transformation der Statice. Die PCR-Analyse ist ein wichtiges Auswahlkriterium der Transformanten. Da es mit konventionellen Reinigungsverfahren nicht möglich war, die Störstoffe abzutrennen, wird jetzt ein Mehrmembranen-System (BioTrap) für die Reinigung der RNA eingesetzt. Gelingt die Reinigung der RNA und die anschließende PCR, können eventuell auch im Falle der Staticenvirusinfektion Aussagen über das Vorhandensein von DI-RNA in Staticen gemacht werden.

Auswahl der Transformationssequenzen

Die infektiöse DNA-Kopie des TBSV-BS3-Stat. ermöglichte die Herstellung verschiedener Transformationskonstrukte. In einem in dieser Arbeit erstellten Pflanzentransformationsvektor wurden die Replikase, die *pre read through* und die *read through* Domänen in *sense* und *antisense*

Orientierung kloniert. Die DNA-Kopie der DI-RNA wurde ebenfalls in den Pflanzentransformationsvektor kloniert. Diese Plasmide stehen nun für die Transformation der Statice bereit. Die Entscheidung für gerade diese Konstrukte wurde durch die Arbeiten anderer Autoren beeinflußt und wird im Nachfolgendem erläutert.

Die Transformation der Pflanzen mit der Sequenz des Hüllproteins zeigte in den Versuchen mit CyRSV (Rubino et al., 1993), obwohl für andere Pflanzenviren erfolgreich, keinen viel versprechenden Ansatz. Die Pflanzen waren nicht resistent, zeigten aber abgemilderte Symptome.
Offensichtlich kann es im Falle der Tombusviren nicht zur einer Absättigung mit Hüllprotein kommen. Wertet man die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der virusinfizierten Tabakzellen aus, findet man sehr viele Viruspartikel. Diese überschwemmen praktisch das Cytosol. Eine transgene Pflanze ist offensichtlich nicht in der Lage, den Schwellenwert an Hüllprotein, der das Entpacken des Virus verhindert, zu überschreiten. Werden die hüllproteinexprimierenden, transgenen Pflanzen mit Virus RNA-Transkripten infiziert, zeigen diese überhaupt keine Resistenz, und die Symptomausprägung ist sehr stark. Das würde bedeuten, daß die RNA, nachdem sie ihre Hülle verloren hat, an Wirtsproteine gebunden an die Replikationsorte transportiert wird, wo sie sich einer erneuten Verpackung entzieht. Dies stützt die Annahme, daß die Infektion und die Replikation des Virus in geschützten Arealen in der Zelle an Membrankomponenten stattfinden und somit das Gleichgewicht zwischen dem Entpacken und Verpacken der Virus-RNA in Richtung der Virusreplikation verschoben wird. Ein homologieabhängiges Ausschalten der Gene ist in diesem Falle nicht beobachtet worden (siehe Einleitung). Alle diese Vermutungen sind schwer einzuordnen, da man den Weg, der von einem Viruspartikel innerhalb der Zelle beschritten wird, nicht kennt. Es ist nicht bekannt, wie das Virus die Zelle betritt, in welchem Zustand (nackte RNA oder noch verpackt in die Virushülle) es an den Replikationsort gelangt und dort repliziert wird. Die Prozessierung der Viruspartikel in der Zelle und die bei allen diesen Vorgängen möglicherweise beteiligten Wirtsproteine, sind bis jetzt noch nicht untersucht worden.

Die Transformationen mit den Replikase Sequenzen des CyRSV führen bei einigen Linien der transformierten *Nicotiana benthamiana* zur totalen Resistenz. Diese Resistenz war aber virusspezifisch. Transgene Pflanzen, die mit anderen Vertretern der Tombusvirusgattung infiziert wurden (AMC, CIRV) zeigten kein Resistenzverhalten. Transformiert man Pflanzen mit DNA-Konstrukten, die das 33 kDa Protein der Replikase kodiert oder Teilen dieser Sequenz, erhält man resistente Linien. Die Transformation mit dem *read through* Teil der Replikase (vom Amber Stop Kodon bis zum nächsten Stop Kodon) führten nicht zur Resistenz der Pflanzen (Russo, 1998), d.h. auch in diesem Falle konnte eine homologieabhängige Resistenz nicht ausgebildet werden. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens könnte sein, daß die Sequenzen am 5'Ende der Replikase für die Insertion der Replikase an die Membranen der Peroxisomen oder Mitochondrien verantwortlich

sind (Rubino et al., 1998). Dies bedeutet, daß Teile der Replikase (ca. 600 nt in ORF1) eine Deformation der Membranen bewirken können, die Orte der Replikation durch das Transgene besetzt werden, und eine Virusreplikase nicht mehr effizient an die Membran binden kann. Das Virus CIRV repliziert an der Mitochondrienmembran, die Pflanzen waren aber transformiert mit einem Konstrukt, das von einem an Peroxisomen replizierenden Virus (CyRSV) stammt. Dies würde auch das Fehlen der Kreuzresistenz erklären. Das Virus AMCV repliziert allerdings an Peroxisomenmembranen, womöglich werden von dem AMCV Virus andere Bereiche der Membranen für die Replikation benutzt. Viel wahrscheinlicher ist aber, daß das Ausbilden der Resistenz ein komplexes Phänomen ist und wahrscheinlich nicht monofaktoriellen Charakter besitzt.

Die Transformationen mit den vollständigen Proteinen des ORF5 und ORF4 (TBSV), die für den Transport des Virus innerhalb der Pflanze verantwortlich sind (Scholthof et al.,1995), führte in keiner der erhaltenen Linien zur Resistenz der Pflanzen. Das homologieabhängige Ausschalten der Gene ist auch in diesem Falle nicht beobachtet worden (Ciuffreda et al., 1998).

Eine Transformation mit Satelliten-RNA der Tombusviren im Zusammenhang mit Resistenzverhalten ist nicht berichtet worden. Ein Nachweis wäre in diesen Fall auch nicht möglich da das Isolat der Statice keine Satelliten-RNA enthält.

Neben den Replikasen-Konstrukten (TBSV-BS3-Stat.), die für die Transformation der Statice kloniert wurden, sind in dieser Arbeit auch Konstrukte mit der isolierten DI-RNA cDNA-Kopie erstellt worden. In einer der veröffentlichten Arbeiten (Rubio et al., 1999) wird über eine Resistenz berichtet, die sogar bei Infektionen mit verwandten Viren aufrechterhalten werden kann. Dies verstärkt die Vorstellung, daß die Virusreplikase bei der Amplifikation die kleineren DI-RNA-Moleküle bevorzugt.

Die Möglichkeiten, mittels Transformation Virusresistenz in Pflanzen zu erzeugen, ist stark mit der pflanzeneigenen Strategie zur Abwehr von Virusinfektionen gekoppelt. Offensichtlich unterliegen beide Systeme dem gleichen Mechanismus (Ratcliff et al., 1997; Al-Kaff et al., 1998; Covey et al., 1997; Voinnet et al., 1999). Betrachtet man speziell die Resistenzausbildung der Pflanze gegenüber im Cytosol replizierenden RNA-Viren, stellt sich die zentrale Frage, was ermöglicht es der Pflanzenzelle, zwischen eigener und fremder RNA zu unterscheiden? Wie wird diese Information gespeichert und wieder abgerufen?
Eine der Theorien hat als zentrale Idee die Bildung von *antisense*-RNA (Baulcombe, 1996 a/b), die dann von der Pflanze als Doppelstrang-RNA erkannt und abgebaut wird (Waterhouse et al., 1998). Diese Theorie erklärt aber nicht, warum Pflanzen, die mit *antisense* Konstrukten transformiert werden, nicht in jedem Falle resistent werden, und warum Bildung einer *antisense*-RNA überhaupt im Falle von Virusresistenz notwendig ist, da die replikative Form der meisten RNA-Viren ohnehin eine

Doppelstrang Form hat. Die Ausbildung einer *antisense* RNA erklärt auch nicht das "Gedächtnis" der Pflanzen gegenüber erneuten Infektionen (Ratcliff et al., 1997). Sollte die Pflanze einen immerwährenden Level an *antisense*-RNA exprimieren, wäre das energetisch sehr ungünstig, da die RNA irgendwann degradiert wird. Es gibt bis jetzt keine Untersuchungen darüber, ob es in auf natürliche Weise resistent gewordenen Pflanzen (Lindbo et al., 1993; Guo und Garcia, 1997) eine DNA-Kopie im Genom der Pflanzen gibt, die homolog zur RNA-Sequenz des Virus ist. Eine DNA Kopie wäre stabiler und wäre mehrmals abrufbar. Sie würde einen Vergleich zwischen fremder RNA und eigener RNA ermöglichen, vorausgesetzt die Integration der DNA-Kopie des RNA-Virus würde an einem bestimmten Ort im Genom der Pflanze stattfinden. Die Kopie der Virus-RNA in DNA könnte von einer Retrotransposase synthetisiert werden. Retrotransposons sind im Pflanzenreich sehr verbreitet (Suoniemi et al., 1989), und deren Aktivierung ist mit Pflanzen-Abwehr-Reaktionen eng gekoppelt (Grandbastien et al., 1997).

Bis heute wurden viele Hypothesen aufgestellt. Es ist allerdings bis heute nicht gelungen zu erklären warum die Transformation mit viralen Sequenzen in einigen Fällen eine Resistenz erzeugen kann.

Die Transformationsversuche mit dem Hüllprotein, dem *read through* Teil der Replikase oder mit den Transportproteinen (p22, p19) der Tombusviren erklären nicht, warum die homologieabhängige Resistenz (Mueller et al., 1995) nicht ausgebildet wird. Tombusviren müssen demnach Sequenzen besitzen, die diesen Mechanismus wieder aufheben oder verhindern. Angenommen wird, daß das Gen der Tombusviren, p19, eine Schlüsselfunktion bei der Aufhebung oder dem Verhindern der homologieabhängigen Resistenz besitzt (Voinnet et al., 1999).

Abschließend kann man sagen, daß Transformationen mit Teilen der genomischen Sequenz des Virus nur im Falle der Replikase (ORF1 und ORF2) und der DI-RNA zu resistenten Linien führen kann und, daß der Modus der Resistenz noch ungeklärt ist.
Die Transformation der Pflanzen mit der cDNA der DI-RNA wäre angesichts der neusten Daten besonders wirkungsvoll, da Kreuzresistenzen ausgebildet werden können (Rubio et al., 1999). Die Größe des Moleküls senkt das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen wie Rekombinationen, die zwischen dem Transgen und der Virus-RNA stattfinden können.

Transgene Statice-Risikobewertung

Rekombination zwischen viralen Sequenzen und homologen Sequenzen in transgenen Pflanzen ist mehrmals beobachtet worden (Greene et al., 1994; Wintermantel et al., 1996; Borja et al., 1999; Aaziz et al., 1999 a/b). Diese Beobachtung verstärkt die Sorge, daß bei einigen Rekombinationsereignissen mit Transgenen modifizierte Viren entstehen, die in die Virushülle verpackt in die Umwelt gelangen.

Die Wahrscheinlichkeit einer unerwünschten Rekombination steigt mit der Homologie des Transgenes zur Virussequenz des infizierenden Virus. Berücksichtigt man aber die Tatsache, daß der viralen Replikase jegliche *proof reading* Funktion fehlt, ist die Virusreplikation durch eine hohe Mutationsrate charakterisiert d.h. in der Natur finden ohnehin Veränderungen statt, die nicht kontrollierbar sind. Rekombinationsvorgänge dienen dem Virus dazu, eingebaute Replikationsfehler zu reparieren und helfen somit, eine genomische Struktur zu erhalten, die sich in der Umwelt bewährt hat. Eine virale Rekombination zwischen dem Transgenen und einem Virus wird sich in der Natur nur dann durchsetzen, wenn das Virus durch die Mutation einen entscheidenden Vorteil erhält. Angesichts der ausgeklügelten Interaktion zwischen Pflanze und Virus erscheint eine gravierende Veränderung in der genomischen Struktur unwahrscheinlich.

Ein anderer Aspekt, der bei der Erwägung einer Transformation mit viralen Sequenzen berücksichtigt werden sollte ist, in wie weit Synergismen mit anderen Viren möglich sind. Untersuchungen mit einem Potyvirus, dessen Sequenzen (Protease 1, *helper component protease*, Protein-3) die Replikation eines Potexvirus stimulieren können zeigten, daß eine transgene Pflanze, die diese Sequenzen exprimiert, die gleiche Auswirkung besitzt (Vance et al., 1995). In allen Systemen, die man untersucht hat, gibt es allerdings keine Hinweise auf eine synergistische Wirkung viraler Replikasen. Diese Möglichkeit kann aber nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Wird das komplette Replikase Gen transformiert und exprimiert, kann es eventuell fremde Virus-RNA replizieren, was nur von Bedeutung ist, wenn das fremde Virus in der Replikation defektiv ist. Um diese Probleme weitgehend zu umgehen, würde sich im Falle der Tombusviren eine Transformation mit der DI-RNA Kopie anbieten. Diese enthält keine funktionellen Gene (so weit bekannt) und ist, im Vergleich zur Replikase von TBSV-BS3-Stat. (2,6 kB), relativ klein (0,4-0,6 kB). Sie bietet also wenig Möglichkeiten für einen Rekombinationsvorgang.

Das Problem der Verbreitung des Transgenes in Wildpopulationen über Pollen ist bei der Statice weitgehend ausgeschlossen, da sie in ihren Anbaugebieten keine natürlichen Kreuzungspartner besitzt. Ein weiteres Problem könnte die Verwendung von Sequenzen sein, die für eine Antibiotikaresistenz kodieren. Es gibt Hinweise für Reversionsmutanten von Bakterien, die auf transgenen Kartoffeln ihre Antibiotikumresistenz durch Rekombinationsvorgänge wieder erlangten (De Vries et al., 1998; Gebhard et al., 1998). Dieser Vorgang, übertragen auf natürliche Umgebung erscheint aber eher unwahrscheinlich (Syvanen, 1999). Das Plasmid, mit welchem die Transformationen durchgeführt werden, enthält das *nptII*-Gen, das eine Resistenz gegenüber Kanamycin verleiht. Dieses Gen kommt ohnehin ubiquitär vor und sollte keine Probleme verursachen. Ein wichtiger Aspekt erscheint auch, daß die Staticen nicht für den Verzehr weder durch Menschen noch durch Tiere, vorgesehen ist.

Regenerations und Transformationsprotokoll für die Statice

Die mehrjährige Statice (*Goniolimon tataricum*) ist eine Trockenblume, die in die Familie der *Plumbaginaceae* eingeordnet wird. Sie wächst bevorzugt an trockenen Standorten. Einige Wildpflanzen dieser Gattung z.B. den Strandflieder kann man in Nordfrankreich und in Deutschland in der Küstenregion antreffen. Die in Deutschland wirtschaftlich genutzten Arten sind *Goniolimon sinnuatum* und *Goniolimon tataricum*, wobei *G. tataricum* die wirtschaftlich wichtigste Art ist.

Obwohl für manche Staticenarten Regenerationsprotokolle publiziert wurden, wurde in keiner der Veröffentlichungen die Art *Goniolimon tataricum* berücksichtigt (Kunitake et al., 1995; Matsumoto et al., 1997; Martin et al., 1995; Amomarco et al., 1998). Eine Regeneration von *Limonium cavanillesii* (Amomarco et al., 1998) zeigte die Möglichkeit auf, die Infloreszenzen als Ausgangsmaterial für die Regenerations- und Transformationsversuche zu benutzen. Bei der Übertragung des Protokolls wurde festgestellt, daß die in der Publikation verwendeten Hormonkombinationen nicht vollständig auf die Infloreszenzkultur von *G. tataricum* übertragen werden konnten. Wurde Kinetin und 2ip appliziert, wurden Sprosse und Pflanzen regeneriert, es kam jedoch nicht zur Kallusbildung. Die Kombinationen Kinetin und BAP führten nicht zur Regeneration. Hormonkombinationen, die in der Regeneration der Arten *L. dufourei, L. calaminare, L. gibertii, L. dichotomum und L. catalaunicum* zu einer erfolgreichen Regeneration führten, konnten in keinem Falle auf *G. tataricum* übertragen werden. Die für die agrobakteriumvermittelte Transformation notwendige Kallusphase wurde mit den Hormonkombinationen Kin/2,4D oder Kin/NAA erzeugt. Anschließende Infektionsversuche mit *Agrobakterien* haben nicht zu den erwünschten Ergebnissen geführt. Die Infloreszenzanlagen haben sehr empfindlich auf die Bakterien reagiert und starben ab. Die unterschiedliche Empfindlichkeit der Ausgangsgewebe gegenüber den Agrobakterien könnte damit erklärt werden, daß die Infloreszenzen der Pflanze in der Mitte der Blattrosette gebildet werden und oberirdisch in die Atmosphäre ragen, wo sie an eher trockene Bedingungen angepaßt sind. Die Infektion mit Agrobakterien kann nur in einer Umgebung mit hohem Wasserdruck stattfinden. Diese vertragen die Infloreszenzen wahrscheinlich nicht. Es ist aber durchaus denkbar, das Infloreszenzausgangsmaterial für andere Transformationssysteme *(Particle gun*) zu verwenden.

Bei der Ermittlung der zur Regeneration fähigen Gewebe der Statice ist das Wurzelgewebe und der Sproß als solche bestimmt worden. Wurzelregeneration ist z.B. bei Spinat (Knoll et al., 1997), *Datura meleloides* (Curtis et al., 1999) und *Arabidopsis thaliana* (Czako et al., 1993) beschrieben worden. Eine anschließende Transformation der oben genannten Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* führte zu Transformationsereignissen und im Falle von *Datura meleloides* zur Transformationsraten von 48%.

In keiner der zugänglichen Publikationen anderer Staticenarten wird von einer Regeneration über das Wurzelgewebe berichtet. Bei *G. tataricum* waren Versuche mit dem Wurzelgewebe jedoch sehr erfolgreich. Bei Anwendung von 1mg/L Kinetin und NAA ist es nahezu aus jedem Wurzelexplantat möglich, Pflanzen zu regenerieren. Diese Konzentration wurde empirisch ermittelt und bei den Entscheidungen, welche Bedingungen für die Regeneration verfolgt werden und welche nicht, spielten, z.B. das Aussehen des Kallus, die Anzahl der gebildeten Vegetationspunkte und die Fähigkeit zur Bewurzelung eine Rolle. Eine anschießende Infektion der Wurzelexplantate führte nicht zum Absterben des Gewebes. Beim Vergleich der Versuche zur Konzentrationsbestimmung der Hormone und der Antibiotikaverträglichkeit fällt eine unterschiedliche Regenerationsfähigkeit der Wurzelstücke auf. Diese Werte resultieren aus der Tatsache, daß die Wurzeln für den ersten Versuch aus einer älteren Kultur stammen und die Antibiotika Versuche mit sehr frischen Wurzelstücken durchgeführt wurden. Abschließend ist anzumerken, daß für Transformationsexperimente nur Wurzeln der zweiten Generation (Wurzeln, die gebildet werden, wenn die ersten abgeschnitten wurden) verwendet werden sollen. Diese Wurzeln sollten möglichst jung und weiß sein. Dies führt zu höheren Regenerationsraten. Die Regenerationszeit bis zur bewurzelungsfähigen Pflanze beträgt ca. 3-4 Wochen je nach Güte des Ausgangsmaterials. Ein Problem der Staticengewebekultur ist die fehlende Synchronisation des Materials. Jede *in vitro* propagierte Pflanze unterliegt einem eigenem Entwicklungsrhythmus. Das bedeutet, daß man über eine ausreichende Menge an Pflanzen (ca. 30-40 Pflanzen) verfügen muß, die genügend Wurzelmaterial liefern. Dieses Material, gesammelt von verschiedenen Pflanzen, ist von unterschiedlicher Qualität und liefert keine statistisch verwertbare Ergebnisse.

Da das Wurzelregenerationssystem für die Transformation mit Agrobakterien geeigneter erschien, wurden Transformationen mit dem Reportergen GUS-Intron durchgeführt. Nach Auswertung eines 2-monatigen Versuches konnten Blaufärbungen (GUS-Int. Integration) an 23% (n=100) der Wurzelstücke beobachtet werden. 17% der Wurzelstücke zeigten ein zumindest Ein-Blatt-Regenerationsstadium (Kallus mit gebildetem Blatt) auf. Auch hier sind Bewertungen schwierig, denn die Explantate entwickeln sich nicht synchron. Es ist zu erwarten, daß die Regenerationsrate weiter sinkt, denn die Antibiotika und die Transformationsereignisse, die die Genomstruktur der Pflanzen belasten, verhindern eine rasche und kontinuierliche Regeneration des Gewebes. Die Regenerate der GUS-Intron Transformation benötigen mehr als 3 Monate bis zur bewurzelungsfähigen Pflanze. Manche recht gut entwickelten Transformanten werden gelb, dann braun und sterben ab. Um gesicherte Aussagen zu treffen, müssen noch weitere Transformationsexperimente durchgeführt werden. Zum einen könnte man auf die Inkubation der zu transformierenden Wurzeln auf dem Initialmedium verzichten, zum anderem durch verschiedene Behandlungen der Agrobakterien deren Infektiösität steigern. Eine Modifikation des Regenerationsmediums (weniger Agar) könnte eventuell bewirken, daß die Wirkstoffe von der Wurzel besser aufgenommen werden und die Regeneration gesteigert werden kann. Interessant könnte auch die Senkung der Kanamycinkonzentration auf 15 mg/l

sein. Das ist aber nur dann sinnvoll, wenn weiterhin die Chimärenbildung ausbleibt. Das Herabsetzen der Temperatur, bei der die Regenerate kultiviert werden, ist ein weiterer Ansatz, der versucht werden kann. Bei Staticen, die in dem Institut der SLFA Neustadt im Gewächshaus und in dem Institut LPP in Mainz gezogen wurden, wurde beobachtet, daß diese besser bei niedrigeren Temperaturen (ca. 18°C-16°C) wachsen. Derzeit werden die Regenerate in der Klimakammer bei 24°C kultiviert.
Ein weiteres Problem der Regeneration der Statice ist das Bewurzeln der Regenerate. Befindet sich die regenerierte Statice in einem 5-6 Blattstadium kann diese auf ein hormonfreies Medium gelegt werden. 30% der Pflanzen bildeten spontan Wurzeln aus. Um diesen Vorgang zu unterstützen würde sich eine Behandlung mit geeigneten Phytohormonen (IBA; NAA; IAA) anbieten.

In dieser Arbeit wurde ein Regenerations-und Transformationsprotokoll erarbeitet, der eine Transformation mit viralen Konstrukten dienen kann. Bei der Fortführung der Arbeiten wird es sicher optimiert. Es bietet aber jetzt schon ein sicheres Grundgerüst, auf dem eine Transformation mit viralen Konstrukten aufgebaut werden kann.

Ausblick

Die angestrebten Ziele der Arbeit wurden mit der Klonierung und Erstellung der viralen Transformationskonstrukte erfüllt. Das Regenerations- und Transformationsprotokoll für die Staticenpflanzen stellt ein Grundgerüst dar, auf dem eine Transformation mit viralen Sequenzen begonnen werden kann.
Die Bestimmung der Virussequenz, die notwendig war um die Transformationskonstrukte zu erstellen, ermöglicht eine Reihe von Experimenten, die die Vorgänge während einer Virusinfektion klären können. Die infektiöse Kopie des Virus liefert standardisierte RNA-Virusinokulate, die nur die genomische RNA enthalten im Gegensatz zu Viruspartikeln, die zusätzlich DI-RNA enthalten können. Eine Subklonierung der Sequenz in einen Vektor, der den 35S Promotor und 35S Terminator enthält, würde eine problemlose und billigere Pflanzen- und Protoplasten-Inokulation erlauben (Scholthof, 1999). Das Hüllprotein kann durch das GUS-Gen (Chapman et al., 1992) oder durch das grün-fluoreszierende Protein ersetzt werden (Verver et al., 1998). Dieses Konstrukt würde daher eine Aussage ermöglichen, ob der infektiöse Klon als Vektor benutzt werden kann. Diese Möglichkeit besteht, die Stabilität eines derartigen Vektors müßte jedoch eingehender geprüft werden. Eine Beurteilung der Stabilität wäre nach Durchlaufen mehrerer Inokulationspassagen möglich (Joelson et al., 1997). Ein anderes Modell für die Expression von Proteinen in Pflanzen bietet der Einsatz von DNA Kopie der DI-RNA. Stellt man transgene Tabakpflanzen her, die die Replikase des Virus exprimieren und inokuliert diese Pflanzen mit Transkripten der DI-RNA, wird diese sehr stark amplifiziert. Inseriert man funktionelle DNA Sequenzen zwischen Block I und Block II der DI-RNA, ist dieses Konstrukt mehr oder weniger stabil und könnte ebenfalls als ein Expressionssystem genutzt

werden (Burgyan et al., 1994). Derartige Modelle eignen sich, um eine Wirkung von Proteinen zu untersuchen, die in Stoffwechsel oder anderen regulatorischen Vorgängen der Pflanzen eingreifen. Diese Untersuchungen haben gerade begonnen und definitive Aussagen über die Möglichkeiten der Nutzung eines derartigen Systems stehen noch aus.

Des weiteren wurde mit der *in vitro* Expression der einzelnen Virusproteine begonnen, um spezifische Antikörper zu erhalten, die in die Untersuchungen des Infektionszyklus des Virus einfließen. Die Antikörper können sowohl für die immunoelekronenmikroskopischen Untersuchungen des Infektionszyklus in der Zelle verwendet werden, als auch für die Immunprezipitation. Die Immunprezipitation sollte eingesetzt werden, um eventuelle Wirtsproteine, die mit Virusproteinen interagieren, zu detektieren und zu bestimmen (Aponte et al., 1996).

Die besondere Eigenschaft der Tombusviren, daß sie an Organellmembranen replizieren, macht eine Untersuchung der Wirtsproteine, die bei der Replikation mit hoher Sicherheit beteiligt sind (Hayes et al, 1994; Schaad et al., 1997), möglich. Aus den Untersuchungen an dem Tabak Mosaik Virus weiß man, daß die gereinigte RNA-Polymerase ein Pflanzenprotein enthält, das dem Hefe Translationsinitiationsfaktor eIF3 entspricht (Buck, 1999). Andere Studien belegen, daß noch mehr Pflanzenproteine an dem Replikationsvorgang beteiligt sein müssen (Ham et al., 1999). Die Replikation der Tombusviren findet in Vesikeln, die aus Peroxisomenmembranen gebildet werden, statt. In Tabakpflanzen schnüren sich die Vesikel so lange ins Innere des Peroxisoms ab, bis das Organell kollabiert. Sind Pflanzenproteine an der Replikation beteiligt, werden diese mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Vesikeln eingeschlossen. Theoretisch wäre eine Aufreinigung der infizierten Pflanzenperoxisome möglich (Reumann, 1996). Wobei man beachten muß, daß die Vesikelbildung die Stabilität der Peroxisome negativ beeinflussen könnte. Die Isolation der Peroxisomen und die Auftrennung der Proteinfraktion in zweidimensionalen Elektrophoresen müsste neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Pflanzenproteine, die in den Replikationskomplex eingreifen, liefern.

Der Mechanismus der Replikation der positiven einzelsträngigen RNA-Viren ist wenig erforscht. In dem für Tombusviren postuliertem Modell stellt sich die Frage, warum beide Proteine, p33 und p92, für die Replikation notwendig sind. P92 enthält die konservierten Sequenzen, die für RNA-abhängige RNA Polymerasen charakteristisch sind. Interagieren p33 und p92 unmittelbar miteinander? Diese Frage könnte unter Einsatz des *two-hybrid yeast* Systems erhellt werden. Ein anderer Ansatz wäre die Immunprezipitation. Bei beiden Ansätzen muß beachtet werden, daß die Replikationsproteine an Membranensysteme gebunden sind, und exprimiert in Hefe sehr wahrscheinlich stabil in die Peroxisomenmembranen der Hefe integrieren würden, was die Versuchsansätze negativ beeinflussen könnte.

Eine Alternative könnte das *Phagen display* darstellen. Mit diesem System würde man eine eventuelle Integration der Replikaseproteine in die Membran umgehen (Gough et al., 1999).

Ein weiteres Projekt betrifft die Replikase und deren Wirkungsort. Gelänge es, an den Orten der Replikation rekombinante Antikörper gegen die Replikase zu exprimieren, würde man die Replikation des TBSV-BS3-Stat. wirkungsvoll verhindern (Conrad und Fiedler, 1994). Wäre der Antikörper spezifisch gegen die konservierten Regionen der Replikase (acht Motive) gerichtet, könnte eine Pflanze unabhängig von der Sequenz der Viren gegen sehr viele RNA-Viren geschützt werden. Eine Suche nach protektiven Sequenzen würde entfallen. Die Gefahr des Ausschaltens der Transgene durch homologieabhängige Suppression wäre erheblich gemindert und die homologieabhängige Rekombination unmöglich. Dieses Projekt wird in einer Kooperation mit einer anderen Arbeitsgruppe verfolgt.

VI. Literatur

Aaziz, R., Tepfer, M. (1999). Recombination between genomic RNA's of two cucumoviruses under conditions of minimal selection pressure. *Virology* **263**, 282-9.

Aaziz, R., Tepfer, M. (1999). Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *J. Gen. Virol*. **80**, 1339-46.

Al-Kaff, N. S., Covey, S.N., Kreike, M. M, Page, A. M., Pinder, R., and Dale, P. J. (1998). Transcriptional and post-transcriptional plant gene silencing in response to a phatogen. *Science* **279**, 2113-2115.

Amomarco, J. B., Ibanez, M. R. (1998). Micropropagation of Limonium cavanillesii erben, a threatened statice, from influorescence stems. *Plant Grow Regulations* **24**, 49-54.

Aponte, C., Poncet, D., and Cohen, J. (1996). Recovery and Characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. *J. of Virol.* **70**, 985-991.

Appiano, A., D'Agostino, G., Bassi, M., Barbieri, N., Viale, G. and Dell'Orto, P. (1986). Origin and function of tomato bushy stunt virus-induced inclusion bodies. II. quantitative electron microscope autoradiography and immunogold cytochemistry. *J. of Ultrastruct. Research* **97**, 31-38.

Appiano, A., D'Augustino, G., Redolfi, P., and Pennazio, S. (1981). Sequence of cytological events during the process of local lesion formation in tomato bushy stunt virus- Gomphrena globosa hypersensitive system. *Journal of Ultrastructure Research* **76**, 173-180.

Aranda, M. A., Fraile, A., and Gracia-Arenal, F. (1993). Genetic variability and evolution of the satellite RNA of cucumber mosaic virus during natural epidemics. *J. Virol*. **67**, 5896-5901.

Aranda, M. A., Fraile, A., Dopazo, J., Malpica, J. M., Gracia-Arenal, F. (1997). Contribution of mutation and RNA recombination to the evolution of plant phatogenic RNA. *J. Mol. Evol.* **44**, 81-88.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1995). Short protocols in molecular biology: *John Wiley & Sons, Inc*.

Baulcombe, C. D., (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. in Plant Biol.* **2**, 109-113.

Baulcombe, D. C. (1996). Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* **8**, 1833-1844

Baulcombe, D. C. (1996). Mechanisms of phatogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* **8**, 1833-1844.

Beachy, R. N. (1997). Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in plants. *Curr. Opin. Biotechnol*. **8**, 215-220.

Bleve-Zacheo, T., Rubino, L., Melillo, M. T. and Russo, M. (1997). The 33K Protein encoded by Cimbidium Ringspot Tombusvirus localizes to modified peroxisomes of infected cells and of uninfected transgenic plants. *J. gen. Virology* **79**; 197-202.

Boogaart, van den T., Lomonossoff, P. G., and Davies, J. W. (1998). Can we explain RNA-mediated virus resistance by homology-dependent gene silencing. *Molecular Plant- Microbe Interactions* **11**, 717-723.

Borges, M. d. L., Sequeira, J. C., and Louro, D. (1979). Aparcimento em Portugal do virus do emanjericado do tomateiro (tomato bushy stunt virus). Hospedeiros, morfologia e localizacao nas celulas de Pimenteiro. *Phytopathology Mediterr*. **18**, 118-122.

Borja, M., Rubio, T., Scholthof, H. B., Jackson, A. O. (1999). Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene. *Mol. Plant Microbe Interact*. **12**, 153-62.

Boulton, M. I., Buchholz, W. G., Marks, M. S., Markham, P.G., and Davies, J. W. (1989). Specificity of Agrobacterium-mediated delivery of maize streak virus DNA to members of the gramineae. *Plant. Mol. Biol*. **12**, 31-40.

Buck, K.W. (1999). Replication of tobacco mosaic virus RNA. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. **354**, 613-27.

Burgyan, J., Salaniki, K., Dalmay, T., Russo, M. (1994). Expression of homologous and heterologous viral coat protein-encoding genes using recombinant DI-RNA from cymbidium ringspot tombusvirus. *Gene* **138**, 159-63.

Celix, A., Rodriguez-Cerezo, E., and Gracia-Arenal, F. (1997). New Satellite RNAs but no DI RNAs, are found in natural populations of Tomato Bushy Stunt Tombusvirus. *Virology* **239**, 277-284.

Chan, M. T., Lee, T. M., and Chang, H. H. (1992). Transformation of indica rice (Oryza sativa L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Cell Physiol*. **33**, 577-583.

Chapman, S., Kavanagh, T., Baulcombe. D. C. (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J*. **2**, 549-57.

Cherif, C., and Spire, D. (1983). Identification du virus de rabougrissement buissoneux de la tomate (tomato bushy stunt virus) en Tunisie sur tomate, piment et aubergine: Quelques caracteristiques de la souche tunisienne. *Agronomie* **3**, 701-706.

Ciuffreda, P, Rubino, L., and Russo, M. (1998). Full-lenght or truncated movement proteins of cymbidium ringspot Tombusvirus do not confer resistance on transgenic *Nicotiana* plants. *J. of Plant Pathology* **80**, 59-62.

Clark, W. G., Fitchen, J., Nejidat. A., Deom, C. M., Beachy, R. N. (1995). Studies of coat protein-mediated resistence to tobacco mosic virus (TMV). II. Chalenge by mutant with altered virion surface does not overcome resistance conferred by TMV coat protein. *J. Gen. Virol*. **76**, 2613-7.

Collmer, C. W., Stanzler, L., Fay, N., Howel, S. H. (1991). Nonmutant forms of the avirulent satellite D of turnip crinkle virus are produced following inoculation of plants with mutant forms synthesized in vitro. *Virology* **183**, 251-9.

Conner, A. J., and Dommisse, E. M. (1992). Monocotyledonous plants as hosts for *Agrobacterium*. *Int. J. Plant Sci*. **153**, 550-555.

Conrad, U., and Fiedler, U. (1994). Expression of engineered antibodies in plant cells. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1023-1030.

Covey, S. N., Al-Kaff, N. S., Langara, A., and Turner, D. S. (1997). Plants combat infection by gene silencing. *Nature* **385**, 781-782.

Dalmay, T., Rubino, L., Burgyan, J., Kollar, A., and Russo, M. (1993). Functional Analysis of Cymbidium Ringspot Virus genome. *Virology* **194**, 697-704.

Dijkstra, J., van Dike, H. D. (1981). Line pattern in *Limonium latifolium* caused by tabacco rattle virus. *Neth. J. Pl. Pathology* **87**, 42-44.

English, J. J., Mueller, E., and Baulcombe, D. C. (1996). Suppression of virus accumulation in transgenic plants exibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* **8**, 179-188.

Fischer, H. U., and Lockhart, B. E. L. (1977). Identification and comparison of two isolates of tomato bushy stunt virus from pepper and tomato in Marocco. *Phytopathology*. **67**, 1352-1355.

Gallitelli, D., and Hull, R. (1985). Charakterisation of satellite RNAs assoziated with tomato bushy stunt virus and five other defintive tombusviruses. *J. Gen. Virology* **66**, 1533-1543.

Gebhard, F., Smalla, K. (1998). Transformation of *Acinetobacter sp*. Strain BD413 by transgenic Sugar Beet DNA. *App. and Environ. Microbiol.* **64**, 1550-1554.

Gerik, J. S., Duffus, J. E., Perry, R., Stenger, D. C., and Van Maren, A. F. (1990). Ethiology of tomato plant decline in the California desert. *Phytopathology* **80**, 1352-1356.

Gerlach, W L., Llewellyn, D., and Haseloff, J. (1987). Construction of a plant disease resistance gene from satellite RNA of tabacco ringspot virus. *Nature* **328**, 802-805.

Goud, J., Devey. M., Hasewaga, O., Ulian, E. C., Peterson, G., and Smith, R. H. (1991). Transformation of Zea mays L. unsing *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol*. **95**, 426-434.

Gough, K. C., Cockburn, W., Whitelam, G. C. (1999). Selection of phage-display peptides that bind to cucumber mosaic virus coat protein. *J. of Virol. Meth.* **79**, 169-180.

Grandbastien, M. A., Lucas, H., Morel, J. B., Mhiri, C., Vernhettes, S., Casacuberta, J. M. (1997). The expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon is linked to plant defense responses. *Genetica* **100**, 241-52.

Green, P. J. (1993). Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Physiol*. **102**, 1065-1070.

Greene, A. E., Allison, R. F. (1994). Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science* **263**, 1423-5.

Grieco, F., Burgyan, J., Russo, M. (1989). The nucleotide sequence of cymbidium ringspot virus RNA. *Nucl. Acid. Res*. **17**, 6383-6398

Grieco, F., Lanave, C., and Galliteli, D. (1997). Evolutionary dynamics of cucumber mosaic virus satellite RNA during natural epidemics in Italy. *Virology* **229**, 166-174.

Guo, H. S., and Gracia, J. A. (1997). Delayed resistance to plum pox potyvirus mediated by mutated RNA replicase gene: Involvement of gene silencing mechanism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 160-170.

Haerne, P. Q., Knorr, D. A., Hillman, B. I., and Morris, T. J. (1990). The Complete Genome Structure and Synthesis of Infectious RNA from Clones of Tomato Bushy Stunt Virus. *Virology* **177**, 141-151.

Hajdukiewicz, P., Svab, Z. Malinga, P. (1994). The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol*. **25**, 989-994.

Ham, B. K., Lee, T. H., You, J. S., Nam, Y. W., Kim, J. K., Paek, K. H. (1999). Isolation of a putative tobacco host factor interacting with cucumber mosaic virus-encoded 2b protein by yeast two-hybrid screening. *Mol. Cell* **9**, 548-55.

Hansen, J. L., Long, A. M. and Schulz, S. C. (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **5**, 1109-1122.

Harrison, B. D., Finch, J. T., Gibbs, A.J., Hollings, M., Shepherd, R. I., Valenta, R. J., and Wetter, C. (1971). *Virology* **45**, 356-363.

Harrison, B. D., Mayo, M. A., and Baulcombe, D. C. (1987). Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature* **328**, 799-802.

Havelda, Z., Szittya, G., and Burgyan, J. (1998). Characterisation of the molecular mechanism of defective interfering RNA-mediated symptom attenuation in tombusvirus-infected plants. *Journal of Virology* **72**, 6251-6256.

Hayes, R. J., Brunt, A. A., and Buck K. W. (1988). Gene Mapping and Expression of Tomato Bushy Stunt Virus. *J. gen. Virology* **69**, 3047-3057.

Hayes, R. J., Pereira, V. C., Buck, K. W. (1994). Plant proteins that bind to the 3`-terminal sequences of the negative-strand RNA of three diverse positive-strand RNA plant viruses. *FEBS Lett*. **352**, 331-4.

Hein, A., Lesemann, D. E., Querfurth, G. (1977). Das *Broad bean witl virus* in *Limonium*- Kulturen in Süddeutschland. *Phytopathologische Zeitschrift* **89**, 340-346.

Hillman, B. I., Hearne, P., Rochon, D., and Morris, T. J. (1989). Organisation of tomato bushy stunt virus genome: Characterization of the coat protein gene and the 3' terminus. *Virology* **169**, 42-50.

Hood, E., Helmer, G. L., Frayley, T. R., and Chilton, M. (1986). The hypervirulence of Agrobacterium tumefaciens A281 is encoded in a Region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. of Bacteriol.* **168**, 1291-1301.

Iino, N., Inouye, N., Maeda, T. (1987). turnip mosaic virus and cucumber mosaic virus infecting statice *(Limonium sinuatum)*. *Nogaku Kenkyu* **61**, 171-184.

Joelsen, T., Akerblom, L., Oxelfelt, P., Strandberg, B., Tomenius, K., and Morris, T. J. (1997). *J. of Gen. Virol.* **78**, 1213-1217.

Johnston, J. C., and Rochon, D. M. (1990). Translation of cucumber necrosis virus RNA *in vitro*. *J. gen. Virology* **71**, 2233-2241.

Jones, A. L.; Thomas, C. L., Maule, A. J. (1988). De novo methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *EMBO J*. **17**, 6385-93.

Kapila, J., Rycke, R., Van Montagu, M., and Angenon, G. (1996). An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* **122**, 101-108.

Koenig, R., und Kunze, L. (1982). Identification of tombusvirus isolates from cherry in Southern Germany as petunia asteroid mosaic virus. *Phytopathol. Zeitschrift* **103**, 361-368.

Koenig. R, and Gibbs, A. (1986). Serological relationships among tombusviruses. *J. Gen. Virol*. **67**, 75-82.

Kollar, A., Dalmay, T., and Burgyan, J. (1993). Defective interfering RNA-mediated resistance against cymbidium ringspot tombusvirus in transgenic plants. *Virology* **193**, 313-318.

Koonin, E, V. (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virology* **72**, 2197-206.

Krczal, G., Beutel, M. (1994). A new soilborne virus disease in statice (*Goniolimon tataricum*). Symposium on virus diseases in ornamentals, *Acta Horticulturae*. **377**, 115-122.

Kunitake, H., Koreeda, K., Mii, M. (1995). Morphological and cytological characteristics of protoplast- derived plants of statice (*Limonium perezii hubbard*). *Scientia Horticulturae* **60**, 305-312.

Laird, E. F., Dickson, R. C. (1972). Turnip mosaic virus-vector relationsships in field grown statice, *Limonium perezii*. *Plant Disease Reporter* **56**, 722-725.

Lawson, C., Kaniewski, W. K., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P., and Tumer, N. E. (1990). Engineering resistance to mixed virus infection in a comercial potato cultivar: Resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Biotechnology* **8**, 127-134.

Li, Y., Bachmann, S., Maiß, E., Commandeur, U., Breyel, E., Timpe, U., and Koenig, R. (1993). Nucleotid sequence of the coat protein gene of pelargonium leaf curl virus and comparison of the deduced coat protein amino acid sequence with those of other tombusviruses. *Archives of Virology* **129**, 349-356.

Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M., and Dougherty, W. G. (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* **5**, 1749-1759.

Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M., and Dougherty, W. G. (1993). Induction of highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistence. *Plant Cell* **5**, 1749-1759.

Lomonossoff, G. P. (1995). Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol*. **33**, 323-343.

Luis-Areteaga, M., Rodriguez-Cerezo, E., Fraile, A., Saez, E., and Garcia-Arenal, F. (1996). Similarity to other Tombusviruses core protein p22/p19. *Phytopathology* **86**, 535-542.

Luis-Arteaga, M., Rodriguez-Cerezo, E., Fraile, A., Saez. E., and Garcia-Arenal, F. (1996). Different tomato bushy stunt virus strains that cause disease outbreaks in solanaceous crops in Spain. *Etiology* **86**, 535-542.

Lupo R., Rubino L., Russo M. (1994). Immunodetection of the 33 K/92 K polymerase proteins in cymbidium ringspot virus-infected and transgenic plant tissue extracts. *Arch. Virol*. **138**, 135-42

Martelli, G. P., Di Franco, A., and Russo, M. (1984). The origin of multivesicular bodies in tomato bushy stunt virus-infected Gomphrena globosa plants. *J. of Ultrastr. Research* **88**, 275-281.

Martelli, G. P., Gallitelli, D. and Russo, M. (1988). Tombusviruses. In The Plant Viruses. Polyhederal Virions with Monopartite RNA Genomes, pp. 13-72. *Edited by R. Koenig. New York: Plenum Press.*

Martin, C., Perez, C. (1995). Micropropagation of five endemic species of Limonium from the iberian peninsula. *J. of Horticult. Science* **70**, 97-103.

Matsumoto, T., Nako, Y., Takahashi, C., Sakai, A. (1997). Induction of in vitro cultured masses of shoot primordia of hybrid statice and its cryopreservation by vitrification. *Hortscience* **32**, 309-311.

Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Crameri, A., Angelis, K., Redei, G. P., Schell, J., Hohn, B., Koncz, C. (1991). T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO J.* **10**, 697-704.

Milne, R. G. (1970). An electron microscope study of tomato spotted wilt virus in sections of infected cells and negative stain preparations. *J. Gen. Virol*. **6**, 267-276.

Mooney, P. A., Goodwin, P.B., Dennis, E. E., and Llewellyn, D.J. (1991). Agrobacterium tumefaciens-gene transfer into wheat issues. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **25**, 209-218.

Mueller, E., Gilbert, J. E., Davenport, G., Brigneti, G., and Baulcombe, D.C. (1995). Homology-dependent resistance: Transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *Plant J*. **7**, 1001- 1013.

Müller-Westermeier, G. (1990). Klimadaten der Bundesrepublik Deutschland, Zeitraum 1951-1980. *Selbstverlag des Deutschen Wetterdienstes*, Offenbach am Main.

Niblett, C. L., Paulus, A. O., Semancik, J. S. (1969). A mosaic disease of statice caused by turnip mosaic virus. *Phytopathology* **59**, 1166-1167.

Nicholson, A. W. (1996). Structure, reactivity, and biology of doublestranded RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **52**, 1-65.

Ollis, D. L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N. G., and Steitz, T. A. (1985). Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature* **313**, 762-766.

O'Reilly, E. K., Wang, X., French, R., and Kao, C. C. (1998). Interactions between the structural domains of the RNA replication proteins of plant-infecting RNA viruses. *J. Virology* **70**, 8564-8570.

Pontis, R. E., Gracia, O., and Feldman, J. M. (1968). Tomato bushy stunt virus on tomato crops in Argentina. *Plant. Dis. Rep*. **52**, 676-677.

Powel, A. P., Nelson, R. S., Hoffman, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., and Beachy, R. N. (1986). Delay of deasise development in transgenic plants that express the tabacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**, 738-743.

Powel, A. P., Sanders, P. R., Tumer, N. E., Fraley, R. T., and Beachy, R. N. (1990). Protection against tabacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Virology* **175**, 124-130.

Raineri, D. M., Bottino, P., Gordon, M. P., and Nester, E. W. (1990). *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (Oryza sativa L.). *Biotechnology* **8**, 33-38.

Raineri, D. M., Boulton, M. I., Davies, J. W., and Nester, E. W. (1993). VirA, the plant-signal receptor, is responsible for the Ti-plasmid-specific transfer of DNA to maize by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **90**, 3549-3553.

Ratcliff, F., Harrison, B. D., and Baulcombe, D.C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**, 1558-1560.

Reumann, S. (1996). Nachweis, Charakterisierung und Aufreinigung eines Porins pflanzlicher Peroxisomen. (*Dissertation*). Goettingen.

Reusken, C. B., Neeleman, L., and Bol, J. F. (1994). The 3' untranslated region of alfalfa mosaic virus RNA-3 contains at least 2 independent binding- sites for viral coat protein. *Nucleic Acids Res*. **22**, 1346-1353.

Rochon, D. M., Tremaine, J. H. (1989). Complete nucleotid sequence of cucumber necrosis virus genome. *Virology* **169**, 251-260.

Rossinck, M., Sleat, D., and Paulukaitis, P. (1992). Satellite RNA's of plant viruses: Structure and biological effects. *Microbiol. Rev*. **56**, 265-279.

Roux, L., Simon, A. E. and Holland, J. J. (1991). Effects of defective interfering viruses on virus replication and pathogenesis in vitro and in vivo. *Adv. Virus Res.* **40**, 181-211.

Rubino L., Capriotti G., Lupo R., Russo M. (1993). Resistance to cymbidium ringspot tombusvirus infection in transgenic plants expressing the virus coat protein gene. *Plant Mol. Biol*. **21**, 665-672

Rubino, L., and Russo, M. (1998). Membrane Targeting Sequences in Tombusvirus Infections. *Virology* **252**, 431-437.

Rubino, L., Burgyan, J., Grieco, F., and Russo, M. (1990). Sequence analysis of cymbidium ringspot virus satellite and defective interfering RNAs. *J. Gen. Virology* **71**, 1655-1660.

Rubino, L., Lupo, R., and Russo, M. (1993). Resistance to Cymbidium Ringspot Tombusvirus infection intransgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing a full-lenght viral replicase gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**, 729-734.

Rubio, T., Borja, M., Scholthof, H. B., Feldstein, P. A., Morris, T. J., Jackson, A. O. (1999). Broad-spectrum protection against tombusviruses elicited by defective interfering RNA's in transgenic plants. *J. Virology* **73**, 5070-8.

Russo, M., Burgyan, J. and Martelli, G. P. (1994). Molecular biology of Tombusviridae. *Adv. in Virus Research* **44**, 381-428.

Russo, M., Burgyan, J., Carrington, J. C., Hillman, B. I., and Morris, T. J. (1988). Complemementary DNA cloning and characterization of Cymbidium ringspot virus RNA. *J. Gen. Virology* **69**, 401-406.

Russo, M., Di Franco, A., and Martelli, G. P. (1987). Cytophatology in the identification and classification of tombusviruses. *Intervirology* **28**, 134-143.

Russo, M., Lupo, R., Ciuffreda, P., and Rubino, L. (1998). Nicotiana benthamiana plants transformed with the complete pre-readthrough domain or the N-proximal region of the replicase gene from cymbidium ringspot virus RNA are resistant to virus infections. *J. of Plant Pathology* **80**, 71-75.

Sahi, S. V., Chilton, M. D., and Chilton, W. S. (1990). Corn metabolites affect growth and virulence of Agrobacterium tumefaciens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 3879-3883.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual (*Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).*

Schaad, M., Jensen, P. E., and Carrington, C. J. (1997). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J.* **16**, 4049-4059.

Schiebel, W., Haas, B., Marinkovic, S., Klanner. A., and Sanger, H. L. (1993a). RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. II. Catalytic in vitro properties. *J. Biol. Chem.* **268**, 11858-11867.

Schiebel, W., Haas, B., Marinkovic, S., Klanner. A., and Sanger, H. L. (1993b). RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. I. Purification and physical properties. *J. Biol. Chem.* **268**, 11851-11857.

Scholthof, H. (1999). Rapid delivery of foreign genes into plants by direct rub inoculation with intact plasmid DNA of a tomato bushy stunt virus gene vector. *J. of Virology* **73**, 7823-7829.

Scholthof, H. B., Scholthof, K. G., Kikkert, M., and Jackson, A.O. (1995). Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology* **213**, 425-438.

Scholthof, H. B., Scholthof, K.-B. G. and Jackson, A. O. (1995). The tomato bushy stunt virus replicase proteins are coordinately expressed and membran associated. *Virology* **208**, 365-369.

Scholthof, K. B., Scholthof, H. B., and Jackson, A. O. (1993). Control of plant virus diseases by pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Plant Physiol*. **102**, 7-12.

Sijen, T., Wellink, J., Hendriks, J., Verver, J., and Van Kammen, A. (1995). Replication of cowpea mosaic virus RNA1 or RNA2 is specifically blocked in transgenic *Nicothiana benthamiana* plants expression the full-lenght replicase or movement protein genes. *Mol. Plant-Microbe Interact*. **8**, 340-347.

Simon, A. E., Howel, S. H. (1987). Synthesis in vitro of infectious RNA copies of the virulent satellite of turnip crinkle virus. *Virology* **156**, 146-52.

Stanley, J., Frischmuth, and Ellwood, S. (1990). Defective viral DNA ameliorates symptoms of geminivirus infection in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6291-6295.

Suoniemi, A., Tanskanen, J., Schulman, A. H. (1998). Gypsy-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom. *Plant J.* **13**, 699-705.

Syvanen, M. (1999). In search of horizontal gene transfer. *Nature Biotechnology* **17**, 833.

Taschner, P. E., Van Merle, G., Brederode, F. T., Tumer, N. E.; and Bol, J. F. (1994). Plants transformed with a mutant alfalfa mosaic virus coat protein gene are resistant to the mutant but not to wildtype virus. *Virology* **203**, 269-276.

Thal, J. (1986). Warum es in Rheinhessen viele Trockenblumen gibt. *Gärtnerbörse und Gärtnerwelt* **43**, 1602-1603.

Tinland, B., Hohn. B. (1995). Recombination between prokaryotic and eucaryotic DNA: integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. *Genet. Eng.* **17**, 209-29.

Tinland, B., Schoumacher, F., Gloeckler, V., Bravo-Angel, A. M., Hohn, B. (1995). The Agrobacterium tumefaciens virulence D2 protein is responsible for precise intergration of T-DNA into the plant genome. *EMBO J.* **14**, 3585-95.

Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., and Steinbiss, H.-H. (1987). A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucl. Acids Res*. **15**, 5890.

Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., Rocha-Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* **220**, 245-50.

Vance, V. B., Berger, P. H., Carrington, J. C., Hunt, A. G., Shi, X. M. (1995). 5'proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* **206**, 583-90.

Verver, J., Wellink, J., Lent, van J., Gopinath, K., and Kammen, van A. (1998). Studies on the movement of cowpea mosaic virus using the jellyfish green fluorescent protein. *Virology* **242**, 22-27.

Voinnet, O., Pinto, Y. M., and Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 14147-14152.

Vries, de J., Wackernagel, W. (1998). Detection of npt II (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Mol. Gen. Genet.* **257**, 606-13.

Waterhouse, P. M., Graham, M. W., and Ming-Bo Wang. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 13959-13964.

Wegener, B. (1994). Biologische Charakterisierung und molekularbiologische Untersuchungen eines neuen Tombusvirus in Statice (Goniolimon tataricum). *Diplomarbeit* Mainz.

White, K. A. (1997). Formation and evolution of Tombusvirus defective interfering RNA's. *Semin. Virol.* **7**, 409-416.

White, K. A., and Morris, T. J., (1994). Nonhomologous RNA recombination in tombusviruses: generation and evolution of defective interfering RNAs by stepwise deletions. *J. gen. Virology* **68**, 14-24.

Wintermantel, W. M., Scoelz, J. E. (1996). Isolation of recombinant viruses between cauliflower mosaic virus and viral gene in transgenic plants under conditions of moderate selection pressure. *Virology* **223**, 156-64.

Zaccomer, B., Cellier, F., Boyer, J. C., Haenni, A. L. , and Tepfer, M. (1993). Transgenic plants that express genes including the 3' untranslated region of the turnip yellow mosaic virus (TYMV) genome are Partially protected against TYMV infection. *Gene* **136**, 87-94.

Dank

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. G. Krczal bedanken, für die Aufgabenstellung, Anregungen, unermüdliche Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und Förderung jeder Art.

Ich danke Dr. Lorenz für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut anfertigen zu dürfen.

Ich möchte mich herzlich bedanken bei Luisa Rubino und Marcello Russo für deren Investment in meine Person. Ich danke für die Unterstützung in wissenschaftlicher als auch in persönlicher Hinsicht. Danke auch an die Laborbesatzung in Bari und die freundliche, zuvorkommende Aufnahme. Con tanti cari saluti e baci.

Ich möchte mich bedanken bei allen ZGG-lern. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Fühlt Euch umarmt.

Bedanken möchte ich mich bei Johannes, Goetz, Michael, Annette und Anja für die Korrekturen und eine ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich möchte mich bei PD. Dr. R. Fischer für die Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Ich möchte mich bei meinen Eltern bedanken, Sie haben mir ermöglicht zu studieren und zu promovieren. Dziekuje bardzo kochani rodzice.

Eine Frau ist nur so stark wie der Mann der neben ihr steht. Ich danke für die Unterstützung in schlechten Zeiten wie in guten meinem Freund Joachim Mörbel. Danke für alles.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Danuta Galetzka
Geburtsdatum	11.01.67
Geburtsort	Gliwice
Anschrift	Ruländerweg 13, 67435 Neustadt an der Weinstraße Tel: 06321/968163 (priv.); 06321/671427 (dienstl.)

Schulbildung

Aug. 1973-Juni 1980	Volksschule Polen in Gliwice
Aug. 1980-Juni 1983	Gymnasium der Ursulinen in Wipperfürth
Aug. 1983-Juni 1986	Gustav-Heineman-Gesamtschule in Mülheim an der Ruhr
2 Juni 1986	Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung

Aug. 1987-Juni 1990	Kaufmännische Lehre als Steuerfachgehilfin im Steuerbüro May und Matthes in Mülheim an der Ruhr
30 Mai 1990	Fachgehilfinnen Brief

Hochschulbildung

Okt. 1986- Mai 1987	Studium der Chemie an der Ruhr Universität Bochum
Okt. 1990- Apr. 1994	Studium der Biologie an der Ruhr Universität Bochum
Apr. 1994- Juni 1996	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
12 Juni 1996	Diplom der Biologie Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Genetik, Biochemie, Tierphysiologie

Berufliche Tätigkeiten.

Sep. 1996- Dez. 1996	Dipl. Biologin in Entwicklungsabt. Eiskrem der Langnese- Iglo GmbH in Heppenheim
Jan. 1997- Sept. 1997	Technische Assistentin in der Abt. Hämatologie in der Universitätsklinik Mainz
Okt. 1997- Dez. 1999	Anfertigung einer Dissertation im Labor von Dr. Krczal in der Staatlichen Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau (SLFA) unter der Leitung von Herrn Dr. Lorenz

Auslandsaufenthalte

Okt. 1998- Dez. 1998	Laboraufenthalt im Rahmen der Doktorarbeit, betreut von Prof. Dr. Marcello Russo. Institut Centro di Studio sui Virus e le Virosi delle Colture Mediterranee Bari (Italien).