Klonierung und partielle Charakterisierung eines unbekannten Erregers der Ringfleckigkeit der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.) anhand doppelsträngiger RNA

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Wynja Benthack aus Hamburg

Hamburg 2001

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg Auf Antrag von Herrn Professor Dr. H.-P. Mühlbach

Dissertation Erstgutachter: Professor Dr. H.-P. Mühlbach Zweitgutachter: Professor Dr. C. Büttner Dissputation Erstgutachter: Professor Dr. H. Lörz Zweitgutachter: PD. Dr. B. Ziegenhagen Datum der mündlichen Prüfung: 06.04.2001

Hamburg den 17.05.2001

Inhaltsverzeichnis:

I. Abkürzungsverzeichnis	8
II. Abkürzungen für Viren und Bakterien	10
1. Einleitung	11
1.1 Die Bedeutung der Eberesche	11
1.2 Die Erkrankung der Eberesche	12
1.3 Die Bedeutung der Erkrankung der Eberesche	14
1.4 Charakterisierung von unbekannten Viren auf der Basis doppelsträngiger	
RNA (dsRNA)	15
1.5 Zielsetzung	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Ebereschen	19
2.1.2 Krautige Pflanzen	19
2.1.3 Verwendete Bakterien und Viren	20
2.1.4 Verwendete Chemikalien	20
2.1.5 TMV-spezifische Dig-markierte RNA-Sonden	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Mechanische Infektion von Tabakpflanzen mit TMV	21
2.2.2 Ernte und Lagerung von Ebereschen Blatt- und Rindenproben	21
2.2.3 Nukleinsäureisolierung	22
2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA	22
2.2.3.2 Etablierung der Isolierung von doppelsträngiger RNA (dsRNA)	23
Folgende Modifikationen der dsRNA-Isolierung nach FÜHRLING (1994)	
wurden getestet:	26
2.2.3.3 Isolierung von genomischer DNA	30
2.2.3.4 Plasmidisolierung	30
2.2.4 cDNA-Synthese auf der Basis von dsRNA	32
2.2.4.1 Klonierung von cDNA-Fragmenten mit dem	
"TOPO TA Cloning [®] "-Kit (Invitrogen)	32
2.2.5 PCR mit degenerierten Oligonukleotid Primern (DOP-PCR)	33
2.2.5.1 Reverse-Transkription-DOP-PCR	35
2.2.6 TOPO-TA-Cloning	35

2.2.7 Kolonie-Screening:

		36
	2.2.8 Lagerung von virusspezifischen TOPO-TA Klonen:	37
	2.2.9 Sequenzierung	37
	2.2.10 RT-PCR mit den virusspezifischen Primern	38
	2.2.11 RT-PCR-Untersuchungen zum Verbinden von Klon V272_33 und V283_2/1	42
	2.2.12 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	44
	2.2.13 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren:	45
	2.2.13.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA:	45
	2.2.13.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und dsRNA	46
	2.2.14 Eluierung von Nukleinsäure aus Agarosegelen	48
	2.15 Herstellung von DNA- und RNA-Sonden	48
	2.15.1 Herstellung von Dig-markierten DNA-Sonden	48
	2.2.15.2 Herstellung von Dig-markierten RNA-Sonden durch In-vitro Transkription	49
	2.2.15.3 Gewinnung von ECL-markierten dsRNA-Sonden	50
	2.2.16 Hybridisierung	50
	2.2.17 Restriktion genomischer DNA	51
	2.2.18 Chloroform/Phenol Extraktion	51
	2.2.19 Nukleinsäure-Fällung	52
	2.2.20 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	52
3	. Ergebnisse	53
	3.1 Beschreibung der virusverdächtigen Symptome an erkrankten Ebereschen	53
	3.2 Isolierung von doppelsträngiger RNA (dsRNA)	56
	3.2.1 Isolierung von dsRNA aus TMV-infiziertem Tabak	56
	3.2.2 Überprüfung der Wirkung unterschiedlicher RNaseA- und MgCl ₂ -Konzentratio	n auf
	die Stabilität von TMV-dsRNA	59
	3.2.3 dsRNA-Isolierung aus Ebereschen-Blattproben	61
	3.2.4 Aufarbeitung von einem Gemisch aus TMV-infiziertem Tabak und Blättern	
	erkrankter Ebereschen zur Überprüfung, ob weitere sekundäre	
	Pflanzeninhaltsstoffe die dsRNA-Isolierung erschweren.	62
	3.3 Zeitlicher Verlauf der dsRNA-Akkumulation in Blättern erkrankter Ebereschen	63
	3.4 dsRNA-Isolierung aus Blattproben erkrankter und symptomloser Ebereschen von	
	verschiedenen Standorten in Deutschland	65
	3.5 Isolierung von dsRNA aus Rindenproben erkrankter Ebereschen	70

	3.6 Gewinnung und Klonierung von cDNA	
		71
	3.6.1 Synthese von cDNA aus TMV-dsRNA mit anschließender	
	EcoRI-Adapter-Ligation und PCR	72
	3.6.2 Analyse der TOPO-TA-Klone durch PCR, Southern-Blot-Analysen und	
	Sequenzierung	72
	3.7 Reverse-Transkriptions PCR mit degenerierten	
	Oligonukleotid Primer (RT-DOP-PCR)	75
	3.7.1 DOP-PCR	75
	3.7.2 RT-DOP-PCR unter Verwendung der TMV-dsRNA	76
	3.7.3 RT-DOP-PCR unter Verwendung der dsRNA aus Ebereschenblättern	77
	3.8 Klonierung der RT-DOP-PCR-Fragmente	79
	3.8.1 Screening der rekombinanten Klone	80
	3.8.1.1 Kolonie-Filter-Hybridisierung	80
	3.8.1.2 Northern-Blot-Analysen	81
	3.8.1.3 Southern-Blot-Analysen zum Nachweis der Virus-Spezifität	
	der Klone V272_33 und V283_2/1	84
	3.8.1.4 Sequenzierung der Klone V272_33 und V283_2/1	84
	3.9 Virusspezifische Polymerase Kettenreaktionen	85
	3.10 RACE-Untersuchungen	87
	3.10.1 Sequenzierung des Klons V492_21	89
	3.11 RT-PCR zur Verbindung des Alignments_1 mit dem Klon V283_2/1	91
	3.11.1 Klonierung und Sequenzierung des ca. 2,6 kb großen PCR-Produktes	93
	3.13 Untersuchung der zweiten Primerbindungsstellen	101
	3.14 Northern-Blot-Analysen mit den Dig-markierten RNA-Sonden der Klone V492	_21
	und V571_10 und gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA aus Blattproben	102
	3.15 RT-PCR-Untersuchungen mit der Gesamt-RNA aus Blattproben von Eberescher	n
	verschiedener Standorte in Deutschland.	103
	3.16 Northern-Blot-Analysen mit der RNA-Sonde vom Klon V492_21 Gesamt-RNA	L
	aus einer Rindenprobe	104
4	. Diskussion	106
	4.1 Isolierung von doppelsträngiger RNA (dsRNA)	106
	4.2 Das dsRNA-Muster aus Blatt- und Rindenproben erkrankter Ebereschen	111
	4.3 cDNA-Synthese und RT-PCR aus dsRNA	118

4.4 RT-PCR und RACE-Analysen auf der Basis der Klone V272_33 und V283_2/1	
	122
4.5 RT-PCR zum Nachweis des potentiellen Zwischenstückes zwischen dem Klon	
V283_2/1 und dem Alignment_1 und Charakterisierung des Klons V571_10	124
4.6 Das Agens der Eberesche und seine möglichen Eigenschaften	130
4.7 Ausblick	131
5. Zusammenfassung	132
6. Literatur	134
7. Anhang	144
7.1 Vektorkarte	144
7.2 Sequenzen	145
7.3 Lage der verwendeten Sonden	150
8. Lebenslauf	151
9. Danksagung	152

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Baden-W.	Baden-Württemberg
bp	Basenpaare
cDNA	copy DNA
CsCl	Cäsiumchlorid
Db.	Doppelbande
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP's	Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DOP-PCR	Degenerate oligonucleic primer polymerase chain reaction
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescens
EDTA	Ethylendiamntetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FA.	Forstamt
f.c.	final concentration
FD.	Forstdienststelle
FP	Forward Primer
g	Gramm
GPS	Glycin-Phosphat-Natirumchlorid
GSP	Gen Specific Primer
GTC	Guanidinthiocyanat
IPTG	Isopropylthiogalactosid
H ₂ O	Wasser
kb	Kilobasen
KD	Kilodalton
L.	Linnee
LB	Luria Bertani
LiCl	Lithiumchlorid
LP	Lower Primer
L-RNA	Large RNA
М	Molar
mM	Millimolar

MCS	multiple cloning site
min.	Minuten
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
M-RNA	middle RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOAC	Natriumacetat
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RdRP	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RF	Replikative Form
Rfö.	Revierförsterei
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Reverse Primer
rpm.	Umdrehung pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
S	Svedberg Konstante
Schleswig-H.	Schleswig-Holstein
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
S-RNA	small RNA
SPAT	Single Primer Amplification Technique
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
ssRNA	einzelsträngige RNA
Std.	Stunden
STE	Natrium-Tris-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u	units
UP	Upper Primer

Universal Primer Mix
Vakuum
Volumen
Virus protein genome linked
Volumen/Volumen
Gewicht/Volumen
$5\text{-}Brom\text{-}4\text{-}chlor\text{-}3\text{-}inolyl\text{-}\beta\text{-}D\text{-}galactopyranosid$
Microgramm
Microliter

II. Abkürzungen für Viren und Bakterien

ACLSV	Apple Chlorotic Leafspot Trichovirus	
ApMV	Apple Mosaic Ilarvirus	
ASPV	Apple Stem Pitting Foveavirus	
BUNYW	Bunyamwera Bunyavirus	
BSBV	Beet Soil Born Furovirus	
CLRV	Cherry Leaf Roll Nepovirus	
CMV	Cucumber Mosaik Cucumovirus	
CTV	Citrus Tristeza Closterovirus	
CGRMV	Cherry Green Ring Mottle Virus	
E. coli	Echerichia coli	
GVX	Garlic Virus X	
IABEI	Influenza A Paramyxovirus Strain A/Memphis 8/88	
IAME8	Influenza A Paramyxovirus Strain A/Beijing 11/56	
PPV	Plum Pox Potyvirus	
SDV	Satsuma Dwarf Virus	
ShVX	Shallot Virus X	
Taq	Thermus aquaticus	
TMV	Tobacco Mosaic Tobamovirus	
TSWV	Tomato Spotted Wilt Tospovirus	

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung der Eberesche

Der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.) kommt aus forstlich-waldbaulichen und ökologischen Gründen eine große Bedeutung zu (EBERT, 1973; GREGER, 1987; HILLEBRAND und LEDER, 1995; HILLEBRAND und ROSENBERG, 1996, Pressemitteilung SDW, 1997). Sie ist eine der anspruchslosesten Baumarten, gilt als sehr frosthart und leidet kaum unter Schneebruch (LEDER, 1989; WEIHS, 1995). Aufgrund ihrer Anspruchslosigkeit, der meist reichlichen Fruchtbildung, des raschen Jugendwachstums und der verstärkten vegetativen Vermehrung ist die Eberesche zur schnellen Erstbesiedlung von degenerierten Freiflächen befähigt. Sie wird daher besonders auf Kahlschlägen, Bergstürzen, Schutthalden und Moorrändern angepflanzt. Sie ist zudem eine bodenpflegende Baumart, die durch ihre humusbildenden Eigenschaften nährstoffarme und versauerte oder belastete Standorte für anspruchsvollere Baumarten vorbereitet (NAMVAR und SPETHMANN, 1985; DE CUVELAND, 1996). Besonders in hohen Lagen des Erzgebirges, dem Harz und dem Fichtelgebirge ist die Eberesche oft die einzige Baumart, deren Bestände der starken Luftverschmutzung standgehalten haben und so die Flächen vor Windabtrieb sowie Erdrutsch und Lawinenabgängen schützen (DE CUVELAND, 1996).

Auch als Vorwaldbaum ist die Eberesche gut geeignet. Unter ihr verjüngen sich Fichte, Tanne, Lärche, Kiefer und Eiche (EBERT, 1973; NAMVAR und SPETHMANN, 1985; GREGER, 1987). Zusätzlich schützt die Eberesche das Wertholz vor Verbißschäden durch das Wild. Zudem wird angestrebt, die in natürlichen Verjüngungen eingemischten Ebereschen verstärkt in den Aufbau struktur- und artenreicher Mischbestände einzubeziehen und ROSENBERG. 1996: ROLOFF, 1997). (HILLEBRAND Auch in der Landschaftsgestaltung ist die Eberesche heutzutage zudem nicht mehr weg zu denken. So wird sie, aufgrund ihrer schönen Doldenblüten und der reichhaltigen Fruchtbildung bevorzugt als Park-, Allee- und Gartenbaum eingesetzt.

Als typische Nebenbaumart spielt die Eberesche dagegen auf dem Holzmarkt eine untergeordnete Rolle (AAS und HOLDENRIEDER, 1992), obgleich ihr Holz als Wagner-, Drechsler-, Schnitz- und Tischlerholz verwendet wird und auch für die Faserplattenindustrie sowie die Halbzellstofferzeugung gut geeignet ist (NAMVAR und SPETHMANN, 1985). Nach HILLEBRAND und LEDER (1995) dürfte die Eberesche zudem bei entsprechender Pflege in Zukunft eine stärkere Rolle in der Nutzholzproduktion spielen, da ihre Holzeigenschaften denen der Wirtschaftsbaumarten wie z. B. der Eiche ähneln.

11

1.2 Die Erkrankung der Eberesche

Aufgrund der ökologischen Bedeutung ist ihr Gesundheitszustand von großer Relevanz. Neben verschiedenen pilzlichen Erkrankungen sowie dem Einwirken unterschiedlicher Schädlinge ist vor allem die chlorotische Ringfleckigkeit der Blätter von Ebereschen eine weit verbreitete Krankheit, die in ganz Europa beobachtet werden kann (KEGLER, 1960; SCHMELZER, 1977; POLÁK et al., 1990, BÜTTNER und FÜHRLING, 1993; BÜTTNER, 1993; COOPER, 1993; FÜHRLING, 1994, POLÁK und ZIEGLEROVA, 1996; BENTHACK, 1998). Als charakteristische Symptome weisen die erkrankten Bäume chlorotische Ringflecke und Blattscheckungen sowie Blattdeformationen auf. Sie haben nur noch einen geringen Jahreszuwachs, und vielfach kommt es zum Verkahlen von Zweigen und Ästen, die in den nachfolgenden Jahren häufig absterben (FÜHRLING und BÜTTNER, 1998). Die Fruchtreife ist zudem meist unvollständig. Der unbekannte Erreger dieser Erkrankung ist pfropfungsübertragbar (FÜHRLING und BÜTTNER, 1995), wobei eine Infektion durch Phytoplasmen, die ebenfalls durch Pfropfung übertragen werden können, nach BENTHACK (1998) auszuschließen ist. Nach BÜTTNER und FÜHRLING (1993) besteht der Verdacht, daß der Erreger aus der Eberesche zusätzlich samenübertragbar ist, da die Autoren eine starke Infektion von Sämlingen sowie Jungbäumen in Naturverjüngungen und Baumschulen beobachtet haben.

Die charakteristischen Blattsymptome sowie die Pfropfungsübertragbarkeit sprechen für eine Infektion der Eberesche durch ein noch unbekanntes Virus. Bis heute war es jedoch noch nicht möglich, Viruspartikel zu isolieren oder elektronenoptisch nachzuweisen (FÜHRLING, 1994, BENTHACK, 1998), und auch eine mechanische Übertragung des Agens konnte noch nicht erzielt werden (FÜHRLING, 1994; BENTHACK, 1998). In Untersuchungen von FÜHRLING (1994) wurden allerdings erste Hinweise auf doppelsträngige RNA in erkrankten Ebereschen gefunden, was den Verdacht der Virusinfektion erhärtet. Die Blattsymptome unterscheiden sich jedoch deutlich von den von BAUR (1907) als "Buntblättrigkeit der Eberesche" beschriebenen Symptomen, die äußerlich einer Infektion durch das Apfelmosaikvirus (Apple Mosaic Ilarvirus, ApMV) ähneln. SCHIMANSKI et al. (1987) und FÜHRLING (1994) konnten zudem durch ELISA-Untersuchungen in Ebereschen mit chlorotischen Ringflecken und Scheckungen kein ApMV nachweisen.

Aufgrund des Verdachtes der Virusinfektion wurde die Eberesche bereits mehrfach auf Viren hin untersucht. So berichten SWEET und CAMPBELL (1976) sowie SWEET (1980) über einen Nachweis des chlorotischen Blattfleckenvirus des Apfels (Apple Chlorotic Leafspot Trichovirus, ACLSV) in, durch Okulation infizierten Ebereschensämligen. Auch POLÁK und

ZIEGLEROVA (1996) wiesen ACLSV in erkrankten Ebereschen mit chlorotischen Ringflecken und Blattscheckungen durch ELISA-Untersuchungen nach. Nach SCHIMANSKI et al. (1987) und FÜHRLING (1994) war ein Nachweis dieses Erregers in natürlich infizierten Ebereschen dagegen nicht möglich. EBRAHIM-NESBAT und IZADPANAH (1992) beobachteten in Ultradünnschnitten erkrankter Ebereschen virusähnliche sphärische Partikel 80 mit einem mittleren Durchmesser von was morphologisch nm. dem Tomatenbronzefleckenvirus (Tomato Spotted Wilt Tospovirus, TSWV) entspricht. In serologischen Untersuchungen konnten die Autoren zudem eine Reaktion des Antigens aus der erkrankten Eberesche mit dem Antiserum gegen TSWV beobachten. Auch in den ELISA-Untersuchungen von FÜHRLING (1994) sowie FÜHRLING und BÜTTNER (1998) wurde eine Ähnlichkeit des Agens aus der Eberesche mit den Tospoviren beobachtet. Jedoch konnte in molekularbiologischen Untersuchungen von BENTHACK et al. (1998) keine eindeutige Bestätigung dieses Verdachtes erzielt werden. Auch in Untersuchungen zum Nachweis des in Waldökosystemen weit verbreiteten Tabakmosaikvirus (Tobacco Mosaic Tobamovirus, TMV) liegen keine eindeutigen Ergebnisse vor. So war nach BENTHACK et al. (1998) ein Nachweis von TMV durch ELISA-Untersuchungen nicht möglich, während FÜHRLING und BÜTTNER (1998) TMV durch ELISA-Untersuchungen in Blattmaterial erkrankter Ebereschen in den Monaten April und Mai und in Rindenmaterial in den Monaten März und April nachweisen konnten. In den molekularbiologischen Untersuchungen von MIELKE (unveröffentlicht, 2000) konnte eine Infektion von Ebereschen durch TMV dagegen ausgeschlossen werden.

Ein Nachweis des ebenfalls in Waldökosystemen weit verbreiteten Kirschenblattrollvirus (Cherry Leaf Roll Nepoviurs, CLRV) war dagegen eindeutig weder durch ELISA-Untersuchungen noch durch PCR-Analysen möglich (FÜHRLING, 1994; POLÁK und ZIEGLEROVA, 1996; WERNER¹ persönliche Mitteilung, 1997; BENTHACK et al., 1998; FÜHRLING und BÜTTNER, 1998). Und auch das Tabak Nekrosevirus (Tobacco Necrotic Necrovirus, TNV) konnte durch ELISA-Untersuchungen in erkrankten Ebereschen nicht nachgewiesen werden (FÜHRLING und BÜTTNER, 1998).

¹ Universität Hamburg, Institut für Allgemeine Botanik, Hamburg

1.3 Die Bedeutung der Erkrankung der Eberesche

Aufgrund der großen ökologischen Bedeutung der Eberesche und ihrer Nutzung in der Holzproduktion ist die Charakterisierung des unbekannten Krankheitserregers von großer Wichtigkeit (FÜHRLING und BÜTTNER, 1998). Viruserkrankungen verringern die Widerstandskraft der erkrankten Bäume, wodurch sie gegenüber anderen abiotischen und biotischen Streßfaktoren anfälliger sind. Zudem können sie sich nach Einwirkung zusätzlicher Stressoren häufig nur noch schwer oder gar nicht regenerieren (BÜTTNER, 1994). So beobachteten KONTZOG et al. (1990) am Wirts-Virus-Modell CLRV/Betula pendula Roth ein reduziertes Wachstum infizierter Birkensämlinge gegenüber gesunden Sämlingen nach der Einwirkung von Schadgasen (Ozon, Schwefeldioxid). Auch HAMACHER (1994) konnte eine stark reduzierte Zuwachsleistung (Trieblängenwachstum und Trockengewichtszunahme) bei CLRV-infizierten Hängebirken, die mit einem Schadgasgemisch belastet wurden, gegenüber der Reduktion der Zuwachsleistung, die durch den jeweils einzelnen Streßfaktor verursacht wurde, beobachten. Ähnliche Ergebnisse konnten auch an Populus sp., die mit dem Pappelmosaikvirus (Poplar Mosaic Carlavirus, PoMV) infiziert waren, nach der Exposition von Schadgasen, Trockenheit sowie extremen Temperaturen beobachtet werden (FÖRSTEL-NEUHAUS, 1991). Untersuchungen in Europa und Nordamerika zeigten zudem, daß Viren in Einzelfällen auch die primäre Ursache für Degenerationen bei Forstgehölzen sein können (NIENHAUS, 1985). Eine Virusinfektion kann somit zu einer starken Beeinträchtigung der ökologisch bedeutsamen Eigenschaften der Eberesche führen und ihre Nutzung stark eingrenzen.

Aber auch aus epidemiologischer Sicht ist die Erkrankung der Ebereschen von großer Relevanz. Nach NIENHAUS und CASTELLO (1989) stellen virusinfizierte Gehölze ein Virusreservoir dar, von dem aus eine Infektion durch Vektoren, Samen und Pollen, aber auch vektorlos durch Boden und Wasser erfolgen kann. Besonders im Hinblick auf die große Verbreitung der Eberesche in fast ganz Europa (mit Ausnahme von Süditalien, Südgriechenland und der iberischen Halbinsel), sowie in Kleinasien, West-Sibirien, dem Kaukasus und Indien (LEDER, 1992; MORY, 1997), und ihrer Vergesellschaftung mit vielen anderen Baumarten (LEDER, 1992; ZERBE, 1993), kommt virusinfizierten Ebereschen eine große Bedeutung als Virusreservoir zu. In Untersuchungen von BÜTTNER und FÜHRLING (1993) konnten im Hamburger Staatsforst an nahezu 80 % aller untersuchten Ebereschen chlorotische Ringflecke und Scheckungen beobachtet werden, und auch in Schleswig-Holstein traten diese Symptome verstärkt auf (BÜTTNER, 1993). Diese hohe Infektionsrate stellt ein starkes Infektionspotential für andere Gehölzarten dar, besonders wenn das Virus aus

der Eberesche leicht übertragbar ist. So diskutierte FÜHRLING (1994) die Rolle erkrankter Ebereschen als Virusreservoir für die sehr oft vergesellschaftet wachsende, wirtschaftlich wichtige Eiche. Demnach wiesen die Eichen in solchen Mischbeständen dann ebenfalls verstärkt ähnliche virusverdächtige Blattsymptome auf. Aufgrund der Zugehörigkeit der Eberesche zu der Familie der Rosengewächse ist auch eine Übertragung des Virus von der Eberesche auf Obstgehölze nicht auszuschließen. Diese potentielle Infektionsgefahr ist besonders im "Alten Land", dem Obstanbaugebiet Hamburgs gegeben, da erkrankte Ebereschen hier in unmittelbarer Nachbarschaft zu den kultivierten Obstgehölzen wachsen. Die Erhaltung gesunder Ebereschenbestände ist somit eine wichtige Voraussetzung im Hinblick auf die ökologische Nutzung der Eberesche als Pionier- und Vorwaldbaum, aber auch als Landschaftsbaum sowie zur Prophylaxe anderer wirtschaftlich wichtiger Baumarten. Besonders die von BÜTTNER und FÜHRLING (1993) beobachtete hohe Infektionsrate in Ebereschensämlingen und Baumschulen stellt eine Gefahr für die Ebereschenbestände dar, denn häufig ist der sichtbare Nachweis einer Infektion an Junggehölzen oft erst nach mehreren Jahren möglich. So konnte FÜHRLING (1994) in Forstbaumschulen weder bei den 1-3 jährigen noch bei den 10 jährigen Ebereschen Symptome beobachten. In dieser Zeit kann aber bereits die Verbreitung der infizierten Ebereschen erfolgt sein. Zudem besteht die Möglichkeit, daß bereits in den Baumschulen eine Übertragung des Agens auf andere wirtschaftlich wichtige Gehölze erfolgt. Nur bei Kenntnis des unbekannten Erregers der Eberesche ist es möglich, durch die Entwicklung spezifischer Diagnose-Verfahren die potentielle Gefahr einer Virusübertragung von erkrankten Ebereschen auf wirtschaftlich Gehölze ermitteln. Aufgrund der Tatsache. daß wichtige zu die einzige Bekämpfungsmöglichkeit einer Viruserkrankungen die Vermeidung derselben ist, sind geeignete Diagnose-Verfahren zudem die einzige mögliche Voraussetzung für frühzeitige phytosanitäre Maßnahmen. Nur so kann die Verbreitung der erkrankten Bäume sowie die mögliche Infektion anderer Gehölzarten verhindert und die Funktion der Eberesche als ökologisch wichtige Baumart gewährleistet werden.

1.4 Charakterisierung von unbekannten Viren auf der Basis doppelsträngiger RNA (dsRNA)

Die Charakterisierung eines unbekannten Virus erfolgt normalerweise auf der Basis der viralen Nukleinsäure, die im Anschluß an eine Viruspartikel-Isolierung aus den Partikeln gewonnen werden kann. Ist es nicht möglich Viruspartikel zu isolieren, kann alternativ eine Charakterisierung auf der Basis isolierter dsRNA vorgenommen werden. Der Nachweis von

dsRNA wird allgemein bei einer Untersuchung von Pflanzenkrankheiten herangezogen, wenn eine Virusetiologie vermutet wird, eine Isolierung von Viruspartikeln aber bislang nicht möglich war. Isolierte dsRNA wird dabei als Hinweis auf eine vorliegende Virusinfektion der untersuchten Pflanze angesehen (JORDAN et al., 1983, DODDS et al., 1984; VALVERDE et al. 1986; VALVERDE et al., 1990).

Doppelsträngige RNA entsteht im Verlauf der Replikation eines Viruses mit einem RNA-Genom (MATTHEWS, 1991). Während die normale Replikation viraler RNA über das Replikative Intermediat, eine partiell basengepaarte Struktur aus Template- und Tochterstrang und RNA-abhängigen RNA-Polymerasen (RdRP) erfolgt, können im Zuge der Replikation auch immer wieder sogenannte Replikative Formen (RF) beobachtet werden (Abb. I). Es handelt sich hierbei um vollständig basengepaarte dsRNA-Moleküle aus Template- und Tochterstrang, die in keiner Verbindung mit RdRPs stehen. Die Replikativen Formen werden, je nach Replikationsstrategie der einzelnen Viren, nicht nur von der oder den genomischen RNAs, sondern auch von verschiedenen subgenomischen RNAs gebildet (Plant Viruses oneline Datenbank, 1998).



Abb. I: Replikative Zwischenformen von ssRNA-Viren (MATTHEWS, 1991)

A) Replikative Form (RF), B) Replikatives Intermediat (RI), C) mögliche Struktur während der Replikation *in vivo*. Der schwarze Kreis stellt die RNA-abhängige RNA-Polymerase dar.

Da über 90 % der Pflanzenviren ein RNA-Genom aufweisen, stellt die Isolierung von dsRNA einen sicheren Weg dar, um einen ersten Hinweis auf ein unbekanntes Virus zu erzielen. Doch wurde in verschiedenen Untersuchungen der letzten 20 Jahre auch verstärkt auf die Anwesenheit von dsRNA-Molekülen in gesunden, symptomlosen Pflanzen wie Luzerne (FAIRBANKS et al., 1988) Gerste (ZABALGOGEAZCOA et al., 1992), Reis (FUKUHARA et al., 1993; MORIYAMA et al., 1995, 1999), Pfeffer (VALVERDE, und FONTENOT, 1990), Bohne (WAKARCHUK und HAMILTON, 1985) oder Erbse (*Vicia faba* cv. 447,

GRILL und GARGER, 1981; LEFEBRE, et al., 1990; PFEIFFER, 1998) hingewiesen, welche die dsRNA-Untersuchung erschweren können. Mit Ausnahme der dsRNA in *V. faba*, die mit der cytoplasmatischen männlichen Sterilität in Verbindung gebracht wird (PFEIFFER, 1998), zeigen die übrigen dsRNA-Moleküle keinen phänotypischen Einfluß auf ihre Wirtspflanzen. MORIYAMA et al., (1996, 1999) bezeichnen diese dsRNAs als endogene dsRNAs. Sie besitzen keine Proteinhülle, weisen Größen von mind. 10 kb auf und werden nicht von ihrer Wirtspflanze kodiert (GIBBS et al., 2000). Sie liegen in einer konstant niedrigen Konzentration in sämtlichen Geweben der Wirtspflanze außer in den Pollen vor und replizieren unter Verwendung ihrer eigenen RdRP. Diese ist in dem einzigen vorhandenen (großen) Leserahmen zusammen mit einer RNA-Helikase codiert. Die Verbreitung von endogenen dsRNAs erfolgt ausschließlich vertikal (MORIYAMA et al., 1999; GIBBS et al., 2000). Da sie nicht mit der Wirts-DNA hybridisieren, werden sie als RNA-Replicons angesehen (MORYAMA et al., 1995).

Neben den endogenen dsRNA können in symptomlosen Pflanzen wie z. B. Hopfen oder Klee (LUISONI et al., 1987) häufig auch kleinere dsRNA-Moleküle beobachtet werden. Diese werden den cryptischen Viren zugeordnet. Hierbei handelt es sich um sphärische virusähnliche Partikel mit einem multipartiten Genom aus 2-3 kb großen dsRNA-Molekülen (GIBBS et al., 2000). Die cryptischen Viren haben ebenfalls keinen Einfluß auf den Phänotyp ihrer Wirtspflanzen, weisen einen sehr niedrigen Titer in den Wirtsgeweben auf und werden wie die endogenen dsRNA nur vertikal verbreitet (BOCCARDO et al., 1983).

Auch wenn die Anwesenheit von dsRNA in gesunden, symptomlosen Pflanzen eine dsRNA-Untersuchung erschweren kann, ist es möglich, durch den Vergleich der dsRNA-Muster zwischen den erkrankten und gesunden Pflanzen Hinweise auf eine Virusinfektion zu erhalten. So müssen sich die dsRNA-Muster unterscheiden, wenn in der erkrankten Pflanze, neben endogenen bzw. cryptischen dsRNAs noch virale dsRNA vorliegt. Ein Hinweis auf die Natur des Agens der Eberesche kann somit, durch die Isolierung von dsRNA in jedem Fall erzielt werden.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die virale Natur des unbekannten Ebereschenagens zu bestätigen und eine nähere Charakterisierung des Virus auf der Basis molekularbiologischer Verfahren zu ermöglichen. Da in den bisherigen ELISA- und RT-PCR-Untersuchungen keine eindeutigen Hinweise auf ein mögliches Virus erzielt werden konnten, mußte von einem unbekannten Virus ausgegangen werden. Da es bis heute nicht gelungen war, Viruspartikel aus erkrankten Ebereschen zu isolieren sollten die Arbeiten auf der Basis isolierter dsRNA erfolgen. Erste Hinweise auf dsRNA in erkrankten Ebereschen lagen zudem bereits durch die Arbeiten von FÜHRLING (1994) vor, weswegen die Isolierung von dsRNA eine gute Ausgangsposition für die weiteren Arbeiten darstellt. Die Bestätigung der viralen Natur des Ebereschenpathogens sollte durch den Nachweis von dsRNA in erkrankten Ebereschen erfolgen. Auf der Basis isolierter dsRNA sollten dann anschließend durch cDNA-Synthese, Klonierungen und Sequenzierungen Hinweise auf das putative Virus erzielt werden. Als Modellsystem zur Optimierung der angewendeten Methoden sollte TMV-infizierter *Nicotiana tabacum* L. var. Samsun verwendet werden, da dieser, aufgrund der systemischen Infektion durch TMV, eine hohe Ausbeute an dsRNA gewährleistet.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Ebereschen

Es wurden Blatt- und Rindenproben von erkrankten und symptomlosen Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) verschiedener Freiland-Standorte verwendet. Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Standorte der erkrankten und symptomlosen Ebereschen in Deutschland, sowie deren Erntetermine. Die Einteilung der Ebereschen in erkrankt und symptomlos erfolgte nach einer visuellen Bonitur. Erkrankte Ebereschen wiesen chlorotische Ringflecke, Blattscheckungen und Blattdeformationen auf. Der Fruchtansatz war häufig erhöht, die Fruchtreife jedoch meist unvollständig.

T abelle 1a: Üt	bersicht über die Standorte erkrankter und symptomloser Ebereschen	in
De	eutschland, sowie die Erntetermine:	

Standorte	Ernte 1999	Ernte 2000
Tarpenbek (Hamburg)	April	April
Rfö. Klövensteen (Hamburg)	Mai	April
FD. Niendorfer Gehege (Hamburg)	Mai	Mai
Botanischer Garten (Hamburg)	Mai	Mai
Insel Amrum (Schleswig-H.)	Mai	Mai
Fa. Hasloh (Schleswig-H.)	Mai	Juni
Fa. Karpak (Schleswig-H.)	Mai	Juni
Fa. Hahnheide (Schleswig-H.)	Mai	Juni
Ravenna Schlucht (Baden-W.)	Juni	Juni
Fa. Breitnau (Baden-W.)	Juni	Juni
Grunewald (Berlin)	Juni	Juni

2.1.2 Krautige Pflanzen

Es wurden *Nicotiana tabacum* L. *var. Samsun*-Pflanzen aus Samen, die freundlicher Weise von Frau Prof. Dr. Büttner² überlassen wurden, im Gewächshaus unter natürlichen Lichtverhältnissen, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-70% und einer Raumtemperatur von 16-25°C bis zum 5-8 Blattstadium angezogen und anschließend mechanisch mit TMV infiziert (Kapitel 2.2.1). Zur Überprüfung des TMV-infizierten Inokulationsmaterials wurden einige der infizierten Tabakpflanzen bis zum Auftreten des charakteristischen Blattmosaiks kultiviert.

²Humbold Universität Berlin Institut für Gartenbauwissenschaften, FG. Phytomedizin, Berlin

2.1.3 Verwendete Bakterien und Viren

Für das TOPOTM TA Cloning[®] System (Invitrogen; Kapitel 2.2.6) wurde der dem Kit zugehörige kompetente *Echerichia coli* (*E. coli*) Stamm TOP10F' verwendet. Für die Herstellung der Digoxigenin (Dig)-markierten TMV-spezifischen RNA Sonde wurde der *E. coli* Plasmidklon DK80 verwendet, der freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Maiß³ zur Verfügung gestellt wurde. Die Optimierung der Doppelstrang RNA (dsRNA)-Isolierung und cDNA-Synthese aus dsRNA erfolgte mit dsRNA des Tabak Mosaik Tobamovirus (Tobacco Mosaic Virus, TMV), das freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Büttner zu Verfügung gestellt wurden.

2.1.4 Verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders im Text angegeben, von den Firmen Biomol (Hamburg), Bio Rad (München), Roche (Mannheim), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen und entsprachen dem Reinheitsgrad "zur Analyse". Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Ionenaustauscheranlage (Milli-Q-Water-Systems, Millipore) angesetzt und bei Bedarf durch Autoklavieren für 20 min. bei 120 °C und 1,2 bar oder durch Filtration (0,2 µm Porendurchmesser) sterilisiert. Für die Arbeiten mit Nukleinsäuren wurden die Lösungen, Puffer sowie Wasser vor dem Autoklavieren mit 0,1 % Diethylpyrocabonat (DEPC) behandelt und über Nacht gerührt. Sofern das Autoklavieren einer Chemikalie nicht möglich war, wurden die Puffer und Lösungen mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt und steril filtriert (0,2 µm Porendurchmesser).

2.1.5 TMV-spezifische Dig-markierte RNA-Sonden

Die verwendete TMV-spezifische Dig-markierte RNA-Sonde wurde durch *in-vitr*o Transkription (Kapitel 2.2.15.2) hergestellt. Die 1276 bp große Sonde richtet sich gegen das 30 KD Protein-Gen von TMV und ist über eine *Hinc* II Schnittstelle in die Multiple Cloning site des Vektors pT7T3 19U (Roche) einkloniert.

³Universität Hannover, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Molekulare Phytopathologie, Hannover

2.2 Methoden

2.2.1 Mechanische Infektion von Tabakpflanzen mit TMV

Für die mechanische Infektion wurden Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. *var. Samsun*) verwendet, die sich im 5-8 Battstadium befanden.

wenig Caborundum (Körnung P320) gleichmäßig auf den Blattoberfläche verteilen ↓ 50 mg TMV-infiziertes Blattmaterial in einem sterilem Mörser mit 2 ml Inokulationspuffer homogenisieren ↓ Homogenat mit einen sterilem Pinsel vorsichtig auf der Blattoberflächen abreiben ↓ Blätter mit Leitungswasser vorsichtig abspülen

Die Ernte des Blattmaterials von *Nicotiana tabacum* L. *var. Samsun* erfolgte 10 Tage nach der Infektion vor dem Auftreten der Symptome. Das Blattmaterial wurde im Anschluß an die Ernte je nach Verwendung bei –70°C gelagert, oder über Calciumchlorid eine Woche lang bei 4°C getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Das getrocknete, infizierte Pflanzenmaterial diente der späteren mechanischen Inokulation von *Nicotiana tabacum* L. *var. Samsun* Jungpflanzen.

Verwendeter Puffer:

Inokulationspuffer:

0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,0 hergestellt aus Mischung äquimolarer Mengen von Kaliumdihydrogenphosphat und Dikaliumhydrogenphosphat.

2.2.2 Ernte und Lagerung von Ebereschen Blatt- und Rindenproben

Bei Blattproben wurde ausschließlich Blattmaterial geerntet, das keine Vergilbung oder Nekrosen sowie Infektionen durch andere Pathogene, wie zum Beispiel Rostpilze aufwies. Blattproben die von Ebereschen aus dem Botanischen Garten der Universität Hamburg, dem Klövensteen und dem Niendorfer Gehege geerntet wurden, wurden sofort auf Eis gelagert und gekühlt transportiert. Um Blattproben von entfernteren Orten zu nehmen wurden immer ganze Zweige geschnitten und dann in einem mit Wasser gefüllten Eimer transportiert Die Entnahme der Blätter erfolgte erst im Institut. Auch für die Ernte von Rindenproben wurden ganze Zweige geschnitten und in Wassereimern transportiert. Ihnen wurde im Institut vorsichtig mit einem Skalpell die Rinde entfernt und soweit wie möglich das Kambium isoliert. Blatt- und Rindenproben wurden, sofern sie nicht direkt verwendet wurden, sofort bei -70 °C gelagert.

2.2.3 Nukleinsäureisolierung

Die Isolierung von einzelsträngiger Gesamt-RNA (ssRNA) und doppelsträngiger RNA (dsRNA) sowie von DNA erfolgte durch verschiedene, für die jeweilige Art der Nukleinsäure optimierte, Isolierungsmethoden.

2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Ebereschen wurde in Anlehnung an CHIRGWIN et al. (1979) wie folgt durchgeführt. Für die Aufarbeitung wurde sowohl frisch geerntetes als auch bei – 70 °C gelagertes Pflanzenmaterial verwendet.

5 g Blattmaterial in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerkleinern \downarrow in 50 ml Denaturierungspuffer (4°C) auftauen lassen und homogenisieren Homogenat im Ultra Turrax 3 x 15 sec. dispergieren \downarrow Homogenat zentrifugieren; 10 min., 4000 rpm, 4°C (Haereus Sepatech, Minifuge RF) Überstand durch Nylongaze (45 µm Maschenweite, Calbiochem) filtrieren \downarrow Filtrat zentrifugieren, 10 min., 4000 rpm, 4°C (Haereus Sepatech, Minifuge RF) \downarrow Überstand auf ein 8 ml Cäsiumchloridkissen (5,4 M CsCl in 0,1 M EDTA_{DEPC}) schichten und zentrifugieren; 22 Std., 25.000 rpm, 18 °C (L7-55 Beckmann, Rotor SW 28) T Überstand bis zur Hälfte des CsCl-Kissen vorsichtig abnehmen, restliche Lösung durch schnelles Dekantieren entfernen Sediment 5 min. bei Raumtemperatur durch "Überkopfstellen" des Zentrifugenröhrchens trocknen \downarrow 300 µl Chloroform und Phenol (1:1) Gemisch in sterilem Eppendorf Reaktionsgefäß vorlegen \downarrow

Boden des Zentrifugationsröhrchen abschneiden, Sediment mit 300 µl H₂O_{DEPC} waschen und in vorbereitetes Eppendorf Reaktionsgefäß überführen \downarrow RNA mit Chloroform/Phenol extrahieren (Kapitel 2.2.18) und aus der wäßrigen Phase fällen, über Nacht, - 20 °C (Kapitel 2.2.19) zentrifugieren; 40 min., 13.000 rpm, 4°C (Sigma 3K20, Rotor 12154) Sediment 2 x mit 70 % Ethanol_{DEPC} waschen und im Speed vac. Concentrator (Savant) 2 min. trocknen in 20 µl H₂O_{DEPC} resuspendieren und Isolierung überprüfen: Ţ RNA Konzentration photometrisch bestimmen (Kapitel 2.2.20) RNA gelelektrophoretisch auftrennen (Kaptitel 2.2.13.1) RNA bei –20°C lagern Verwendeter Puffer: Denaturierungspuffer: M Guanidinthioacetat (GTC)

 $0,1 \text{ M}\beta$ -Mercaptoethanol

1 (w/v) % Natriumdodecylsulfat (SDS)

2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (unlöslich)

2.2.3.2 Etablierung der Isolierung von doppelsträngiger RNA (dsRNA)

Für die Isolierung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) wurden verschiedene Methoden (LAULHERE und ROZIER, 1976; FALK und TSAI, 1984; COFFIN und COUTTS, 1992; FÜHRING, 1994) erst an TMV-infizierten Tabakblättern etabliert und anschließend auf ihre Eignung für die Isolierung von dsRNA aus Ebereschen getestet. Alle verwendeten Methoden basierten dabei auf der Methode von MORRIS und DOODS (1979), unterschieden sich aber unter anderem aber in den verwendeten Homogenisierungspuffern. Es wurde zunächst die Methode von FÜHRLING (1994) mit verschiedenen Änderungen verwendet, da diese Methode bereits für die dsRNA-Isolierung aus Eichen und Ebereschen beschrieben worden war (FÜHRLING, 1994).

dsRNA-Isolierung nach FÜHRLING (1994):

20 g Pflanzenmarterial (frisch oder gelagert bei -70 °C) in flüssigem Stickstoff homogenisieren \downarrow Zugabe von Homogenisierungslösung: 40 ml STE_{DEPC} (2 x) 10 ml SDS (10 %) 30 ml STE_{DEPC}-gesättigtes Phenol 30 ml Chloroform $0,4 \text{ ml} \beta$ -Mercaptoethanol durch kurzes kräftiges Rühren homogenisieren und schütteln, (KL2, Edmund Bühler); 30 min., Raumtemperatur Homogenat zentrifugieren; 20 min. 4000 rpm (Haereus Sepatech, Minifuge RF) \downarrow Überstand mit 96 % Ethanol (f.c. 16 %) und CF11-Celluslose (1 g/15 ml, Sigma) versetzten und schütteln, 30 min., Raumtemperatur \downarrow zentrifugieren, 10 min., 4000 rpm, Raumtemperatur (Haereus Sepatech, Minifuge RF) Überstand verwerfen, Cellulose in 80 ml STE_{DEPC}-Ethanol (16%) resuspendieren und schütteln, 30 min., Raumtemperatur zentrifugieren, 10 min., 4000 rpm, Raumtemperatur J Überstand verwerfen, Cellulose in 80 ml STE_{DEPC}-Ethanol (16%) resuspendieren und schütteln, 30 min., Raumtemperatur \downarrow Gemisch in eine 20 ml sterile Einmalspritze (Henke) überführen, Cellulose trocken laufen lassen und Restflüssigkeit auspressen dsRNA in drei Schritten mit 15 ml (3, 7 und 5 ml) 1 x STE_{DEPC}-Puffer eluieren, Restflüssigkeit nach jedem Schritt auspressen \downarrow Inkubation des Eluats mit DNAse I (2 u/ml Eluat, Roche), 30 min. 37 °C \downarrow Zugabe von 0,3 Vol 1 M MgCl₂-Lösung_{DEPC} (v/v) und Inkubation mit RNase T₁ (2 u/ml Eluat, Roche), 30 min., 37 °C

 \downarrow

Eluat mit 0,5g Cellulose, 96 % Ethanol (f.c. 16%) und 0,03 Vol 0,5 M EDTA versetzen und schütteln, 20 min., Raumtemperatur Gemisch in eine 20 ml sterile Einmalspritze überführen, Cellulose trocken laufen lassen und Restflüssigkeit auspressen Ţ Cellulose mit 25 ml 1 x STE_{DEPC}-Ethanol (16%) waschen, anschließend trocken pressen dsRNA eluieren mit 2 ml STE_{DEPC}-Puffer in 5 Schritten a 400 µl, dsRNA aus dem Eluat fällen über Nacht, -20°C (Kapitel 2.2.19) \downarrow zentrifugieren, 40 min., 13.000 rpm, 4°C (Sigma 3K20, Rotor 12154) \downarrow Sediment 2 x mit 70 % Ethanol_{DEPC} waschen und im Speed vac. Concentrator (Savant) 2 min. trocknen \downarrow dsRNA in 20 μ l H₂O_{DEPC} resuspendieren und Isolierung überprüfen: \downarrow a) dsRNA-Konzentration photometrisch bestimmen (Kapitel 2.2.20) b) gelelektrophoretische Auftrennung (Kaptitel 2.2.13.2)

Die dsRNA wurde bei – 20 °C gelagert.

Verwendete Puffer und Lösungen:

<u>STE_{DEPC} (10 x):</u> 0,5 M Tris 1 M NaCl 10 mM EDTA mit 0,1 % DEPC versetzten, über Nacht rühren und autoklavieren

<u>STE-Puffer (1 x):</u> 100 ml 10 x STE_{DEPC} mit H₂O_{DEPC} auf 1000 ml auffüllen

<u>STE-Ethanol (16%):</u> 100 ml 10 x STE_{DEPC} 174 ml 96 % Ethanol

mit H₂O_{DEPC} auf 1000 ml auffüllen

<u>STE (2 x) Puffer:</u> 200 ml STE_{DEPC} (10 x) mit H₂O_{DEPC} auf 1000 ml auffüllen

Folgende Modifikationen der dsRNA-Isolierung nach FÜHRLING (1994) wurden getestet:

1) Verwendung der RNase A* (3,5 μ g/ ml, Roche) anstelle der RNase T₁

2) Zugabe von 0,5 % (w/v) PVP (unlösliche hochmolekulare cross-link Form von PVP, Sigma) zum Homogenat.

3) Unterstützung der dsRNA-Fällung mit 1 µl Glycogen (20mg/ml, Roche) auf 100 µl Fällungsansatz

4a) Erhöhung der Cellulose-Konzentration auf 2 g/20 ml, Verwendung von 0,5 % PVP und der RNaseA sowie Durchführung des DNA- und RNA-Verdau im Anschluß an die Isolierung in 200 μl einer 300 mM MgCl₂-Lösung.

4b) zusätzlich zu 4a: Verringerung der Viskosität des Homogenates durch eine variable Erhöhung der Homogenisierungspuffermenge

*Vor Verwendung der RNaseA wurde zunächst die Stabilität der dsRNA bei unterschiedlichen RNaseA- und MgCl₂-Konzentrationen überprüft und dabei gleichzeitig die optimale RNaseA- und MgCl₂-Konzentration für einen effektiven Verdau einzelsträngiger RNA ermittelt. Hierfür wurden 50 ng TMV-dsRNA verwendet, die mit der Methode von FÜHRLING (1994) unter Ausschluß des RNA-Verdaus isoliert wurden. Die Inkubation (1 Std. bei 37 °C) der dsRNA erfolgte mit unterschiedlichen RNaseA-Konzentrationen (0,35 $\mu g/\mu l$, 3,5 $\mu g/\mu l$ und 35 $\mu g/\mu l$) bei konstanter MgCl₂-Konzentration von 300 mM, sowie unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen (0 mM, 30 mM, 100 mM 300 mM) bei konstanter RNaseA-Konzentration (3,5 $\mu g/\mu l$).

dsRNA-Isolierung nach LAULHERE und ROZIER (1976):

Homogenisierungspuffer:

40 ml Puffer bestehend aus: 0,5 M NaCl

0,2 M Tris pH 7,5 0,01 M MgCl₂

 $5 \ ml \ H_2O_{DEPC}$

 $0,8 \text{ ml} \beta$ -Mercaptoethanol

3 % SDS (w/v)

Das Homogenat wurde 10 min bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 1 Vol Chloroform versetzt, 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und weiter entsprechend der Angaben von FÜHRLING (1994) bearbeitet.

dsRNA-Isolierung nach FALK und TSAI (1984):

Homogenisierungspuffer:

40 ml STE (1x)

8 ml SDS (10 %)

40 ml frisch angesetztes Wasser-gesättigtes Phenol (pH 7,0) mit 0,1 % (v/v) 8-Hydroxy-chinoline

Der Verdau von RNA und DNA wurde im Anschluß an die Isolierung in einer 300 mM MgCl₂-Lösung durchgeführt. Ansonsten entspricht diese Methode der Methode von FÜHRLING (1994).

dsRNA-Isolierung nach COFFIN und COUTTS (1992):

Homogenisierungspuffer:

30 ml GPS-Puffer (4 °C) bestehend aus 200 mM Glycin

100 mM Na₂PHO₄

600 mM NaCl

pH 9,5

30 ml GPS-gesättigtes Phenol

30 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

7,5 ml SDS (10 %)

0,75 ml β -Mercaptoethanol

Das zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde 1 Std. bei 4 °C im Homogenisierungspuffer gerührt und anschließend weiter nach den Angaben von FÜHRLING (1994) bearbeitet. Der Verdau von RNA und DNA wurde dabei im Anschluß an die Isolierung in einer 300 mM NaCl-Lösung durchgeführt.

Für die Isolierung von dsRNA aus Ebereschen konnte ein Verfahren etabliert werden, das auf der Modifikation 4 der Methode von FÜHRLING (1994) und der Methode von LAULHERE und ROZIER (1976) beruht und nachfolgend beschrieben ist:

20 g Pflanzenmarterial (frisch oder gelagert bei -70 °C) in flüssigem Stickstoff pulverisieren Ţ in 40 ml Homogenisierungspuffer (37 °C) durch kurzes kräftiges Rühren homogenisieren und inkubieren; 10 min., 37°C T 40 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugeben und rühren; 30 min. Raumtemperatur Homogenat zentrifugieren; 20 min. 4000 rpm (Haereus Sepatech, Minifuge RF) .|. schleimige Oberphase vorsichtig entfernen und den restlichen Überstand mit 2 g CF11-Celluslose (Sigma) und 96 % Ethanol (f.c. 16 %) versetzen und schütteln (KL2, Edmund Bühler); 30 min., Raumtemperatur .|. zentrifugieren, 10 min., 4000 rpm, Raumtemperatur (Haereus Sepatech, Minifuge RF) Ţ Überstand verwerfen, Cellulose in 80 ml STE_{DEPC}-Ethanol (16%) resuspendieren und schütteln, 10 min., Raumtemperatur zentrifugieren, 10 min., 4000 rpm, Raumtemperatur Überstand verwerfen, Cellulose-Waschritt sechs mal wiederholen Gemisch in eine 20 ml sterile Einmalspritze (Henke) überführen, Cellulose trocken laufen lassen und Restflüssigkeit auspressen Ţ dsRNA in drei Schritten mit 15 ml 1 x STE_{DEPC}-Puffer (3, 7 und 5 ml) eluieren, Restflüssigkeit nach jedem Schritt auspressen ↓ Eluat mit 0,5g Cellulose 96 % Ethanol (f. c. 16%) versetzen und schütteln, 30 min., Raumtemperatur Gemisch in eine 20 ml sterile Einmalspritze überführen, Cellulose trocken laufen lassen und Restflüssigkeit auspressen J Cellulose mit 50 ml 1 x STE_{DEPC}-Ethanol (16%) waschen, anschließend trocken pressen dsRNA eluieren mit 2 ml STE_{DEPC}-Puffer in 5 Schritten a 400 µl und fällen über Nacht, -20°C (Kapitel 2.2.19

 \downarrow

zentrifugieren, 40 min., 13.000 rpm, 4°C (Sigma 3K20, Rotor 12154) Sediment 2 x mit 70 % Ethanol_{DEPC} waschen und im Speed vac. Concentrator (Savant) 2 min. trocknen T in 138 μ l H₂O_{DEPC} resuspendieren 60 µl 1 M MgCl₂-Lösung_{DEPC} (f.c. 300 mM) und 2 µl RNase A (3,5 µg/ml) zugeben und inkubieren, 40 min, 37 °C \downarrow 20 u DNase I RNase free (Roche) zugeben und inkubieren, 40 min, 37 °C Ţ dsRNA mit Chloroform/Phenol extrahieren (Kapitel 2.2.18) und aus der wäßrigen Phase über Nacht fällen, - 20°C (Kapitel 2.2.19) \downarrow dsRNA in 20 µl H₂O_{DEPC} resuspendieren und Isolierung überprüfen: \downarrow a) dsRNA-Konzentration photometrisch bestimmen (Kapitel 2.2.20) b) gelelektrophoretische Auftrennung (Kaptitel 2.2.13.2) Die dsRNA wurde bei -20 °C gelagert

Verwendete Puffer und Lösungen:

<u>STE_{DEPC} (10 x):</u> Siehe Methode von FÜHRLING (1994)

<u>2 x STE_{DEPC}-SDS Puffer:</u>
200 ml 10 x STE_{DEPC}
3 % (w/v) SDS
mit H₂O_{DEPC} auf 1000 ml auffüllen, steril filtrieren

Homogenisierungspuffer 40 ml 2 x STE_{DEPC}-SDS-Puffer 1% (w/v) PVP (unlöslich) 0,8 ml β-Mercaptoethanol <u>STE_{DEPC}-Puffer (1 x):</u> Siehe Methode von FÜHRLING (1994)

<u>STE_{DEPC}-Ethanol (16%):</u> Siehe Methode von FÜHRLING (1994)

2.2.3.3 Isolierung von genomischer DNA

Genomische-DNA wurde mit dem "Invisorb Spin Plant-Kit" von Invitek entsprechend der Angaben des Herstellers aus Blättern erkrankter und symptomloser Ebereschen isoliert und in Aliquots von 20 μ l bei – 20 °C gelagert. 1/10 Vol des Ansatzes wurde zur Überprüfung der Isolierung gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.2.13.2).

2.2.3.4 Plasmidisolierung

Es wurden die Plasmide von zwei verschiedenen E. coli-Kulturen isoliert (vgl. Kapitel 2.1.3).

I. Anzucht des E. coli-Stammes TOP10F´ und des Plasmidklons DK80 :

Der Plasmidklon DK80 wurde zur Isolierung einer Reinkultur aus Glycerol Stammkulturen auf LB III-Ampicillin (150 mg/ml) Festagar-Platten (als Verdünnungsausstrich) mit einer sterilen Impföse übertragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien dieser Platten wurden in Erlenmeyerkolben mit 20 ml LB III-Ampicillin (150 mg/ml) Flüssigmedium überführt und ebenfalls über Nacht bei 37 °C im Thermoschüttler GFL inkubiert. *E. coli* TOP10F´ Zellen wurden als kompetente Zellen von der Firma Invitrogen mit dem "TOPO-TA Cloning[®]"-Kit erworben und nach der Transformation (Kapitel 2.2.6) auf LB III-Ampicillin (150 mg/ml) Platten über Nacht bei 37 °C kultiviert. Von weißen Einzelkolonien wurden ebenfalls 20 ml LB III-Ampicillin (150 mg/ml) Flüssigkulturen angesetzt und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

II. Plasmidisolierung:

Die Plasmidisolierung wurde als Minipräperation in Anlehnung an BIRNBOIM und DOLY (1979) durchgeführt.

1,5 ml Übernachtkultur zentrifugieren, 2 min. 13.000 rpm, Raumtemperatur ↓ Überstand verwerfen (zur Entsorgung autoklavieren)

Sediment in 250 µl TELT-Lysis Puffer (4°C) resuspendieren \downarrow 25 µl frische Lysozymlösung zugeben, vortexen und inkubieren: 5 min. auf Eis \mathbf{J} 2 min. im siedenen Wasserbad erhitzen \downarrow in einem Eis/Wasser-Gemisch abkühlen, 5 min. \downarrow zentrifugieren, 10 min, 13.000 rpm, Raumtemperatur (Sigma 3K20, Rotor 12154) schleimiges Sediment mit sterilem Zahnstocher entfernen (zur Entsorgung autoklavieren) ↓ Überstand mit Phenol/Chloroform extrahieren (Kapitel 2.2.18) \downarrow wäßrige Phase mit 1 Vol Isopropanol (- 20°C) versetzen \downarrow zentrifugieren; 20 min., 13.000 rpm, 4°C (Sigma 3K20, Rotor 12154) Sediment 2 x mit 70 % Ethanol_{DEPC} waschen und im Speed vac Concentrator (Savant) 2 in. trocknen \downarrow Sediment in 10 µl H₂O_{DEPC} resuspendieren und Plasmidisolierung überprüfen: a) DNA-Konzentration photometrisch bestimmen (Kapitel 2.2.20) b) gelelektrophoretisch Auftrennung (Kaptitel 2.2.13.2) Die isolierten Plasmide wurden bei – 20°C gelagert. Verwendete Puffer Lösungen und Medien: LB III (Luria Bertani) Fertig-Flüssigmedium (Sigma)

LB III (Luria Bertani) Fertig-Medium (Sigma)

<u>TELT-Lysis Puffer:</u> 50 mM Tris HCl, pH 7,5 52,5 M (w/v) Ethylendiaminotetraacetat (EDTA) 2,5 M (w/v) Lithiumchlorid autoklavieren und mit 0,4 % (v/v) Triton X 100 versetzten

1 %ige Lysozymlösung:

1 mg/ ml Lysozym in H_2O_{DEPC} direkt vor der Aufarbeitung ansetzten

2.2.4 cDNA-Synthese auf der Basis von dsRNA

Es wurden Versuche zur cDNA-Synthese und nachfolgender Klonierung der cDNA vorgenommen, um eine Charakterisierung des putativen Agens zu erzielen. Ausgehend von isolierter dsRNA wurde cDNA mit Hilfe des "Universal RiboClone[®] cDNA Synthesis System" von Promega nach Angaben des Herstellers, unter Verwendung von Random Primer synthetisiert. Anschließend erfolgte entsprechend der Angaben im "Universal RiboClone[®] cDNA Synthesis System" (Promega), eine Ligierung von *Eco*RI-Adaptern an die cDNA. Diese Methode wurde zunächst mit 500 ng dsRNA von TMV, mit den nachfolgend beschriebenen Änderungen optimiert und anschließend für die cDNA-Synthese aus dsRNA von Ebereschen verwendet.

cDNA-Synthese und *Eco*RI Adapter Ligation modifizierte nach Promega:

Im Rahmen der cDNA-Synthese nach Promega wurden, aufgrund der wesentlich geringeren Konzentration an verfügbarer dsRNA, im Vergleich zu der im Kit angegebenen einzusetzenden RNA-Ausgangskonzentration von 2 µg folgende Änderungen vorgenommen. Die dsRNA wurde für die Denaturierung 3 min. im kochenden Wasser erhitzt und anschließend auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert. Im Anschluß an die im Kit angegebene Größen-Fraktionierung der synthetisierten cDNA erfolgte eine weitere Fällung über Nacht mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol Ethanol_{abs} (-20 °C). Die resuspendierte cDNA wurde komplett für die Adapter-Ligation verwendet. Nach der Entfernung der überschüssigen Adapter mit einer Sephacryl[®] S-400 Säule (Promega) erfolgte eine erneute Fällung der ligierte cDNA mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol Ethanol_{abs} (-20 °C) über Nacht.

2.2.4.1 Klonierung von cDNA-Fragmenten mit dem "TOPO TA Cloning[®]"-Kit (Invitrogen)

Für die Klonierung der ligierten cDNA wurde eine Strategie entwickelt, bei der die Konzentration der cDNA zunächst durch eine PCR-Reaktion erhöht wurde. Hierfür wurden Primer gegen den *Eco*RI-Adapter abgeleitet und bei der Firma Metabion in Auftrag gegeben.

Im Anschluß an die PCR mit dem *Eco*RI-Primer (5´-CCGTTGCTGTCG-3´) erfolgt die direkte Klonierung der PCR-Fragmente in den "pCR[®]2.1 TOPO[®] Cloning" Vektors des "TOPO TA Cloning[®]"-Kit von Invitrogen. Die Etablierung dieser Klonierungsstrategie wurde erneut mit der ligierten cDNA aus TMV-dsRNA durchgeführt. Anschließend wurde die Strategie für die Klonierung der cDNA des Ebereschenagens verwendet. Für die *Eco*RI-PCR wurde jeweils der gesamte *Eco*RI-Ligationsansatz aus Kapitel 2.2.4 verwendet. Als Kontrolle der *Eco*RI-PCR wurde λ cl857 *Sam*7 Wildtyp Lambda DNA (Stratagene) verwendet, die mit dem Restriktionsenzym A*lu*I (MBI) geschnitten und anschließend mit *Eco*RI-Adpater nach Angaben von Promega ligiert worden war.

PCR mit EcoRI-spezifischer Primer:

<u>PCR-Reaktion:</u>
83,5 μl H₂O_{DEPC}
2 μl (50 ng) ligierte Lambda DNA oder 2 μl der ligierten cDNA
2 μl *Eco*RI-Primer (20 mM)
2 μl dNTP Mix (10 mM, MBI)
10 μl 10 PCR-Puffer (Roche)
0,5 μl Taq Polymerase (5 u/μl, Roche)

 PCR-Programm:

 3 min. 94 °C

 0,5 min. 48 °C

 2 min. 72 °C

 30 x

 0,5 min. 94 °C

 1 min. 48 °C

 5 min. 72 °C

2.2.5 PCR mit degenerierten Oligonukleotid Primern (DOP-PCR)

Alternativ zu der in dem Kapitel 2.2.4 beschriebenen cDNA-Synthese wurde versucht, mit Hilfe der DOP-PCR und anschließender Klonierung der PCR-Produkte (Kapitel 2.2.6) eine Charakterisierung des putativen Agens zu erzielen. Die DOP-PCR ermöglicht die direkte Amplifikation eines unbekannten DNA-Templates durch den Einsatz eines universellen Primers, der eine 6 Nukleotid lange degenerierte Region enthält (DOP-Primer: 5'-CCG ACT GCA GNN NNN NAT GTGG-3'; N= A, C, G oder T).

Es wurde ein DOP-PCR-Programm modifiziert nach den Angaben des "DOP-PCR Master Kit" von Roche verwendet. Die DOP-PCR-Untersuchungen wurden im Eppendorf Gradient Mastercycler durchgeführt.

DOP-PCR Reaktionsansatz: 40,5 μl H₂O_{DEPC} 1 μl DNA (1 ng/μl) 2 μl DOP-Primer (f. c. 20 pmol) 1 μl dNTP-Mix (10 mM, MBI) 5 μl 10 x Reaktionspuffer (AGS Hybaid) 0,5 μl Taq DNA-Polymerase (4u/μl, AGS Hybaid)

DOP-PCR Protokoll modifiziert nach Roche:

5 min. 95 °C



Entsprechend der Angaben von Dr. M. ROTT⁴ (persönliche Mitteilung, 1999) wurden auch Varianten des DOP-Primer verwendet, bei denen ein oder zwei Nukleotide am 3'Ende fehlten:

⁴Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, Dossenheim

DOP-Primer 1 (21 mer): 5'-CCG ACT GCA GNN NNN NAT GTG-3'

DOP-Primer 2 (20 mer): 5'-CCG ACT GCA GNN NNN NAT GT-3' N= A, C, G oder T

2.2.5.1 Reverse-Transkription-DOP-PCR

Die Etablierung der RT-DOP-PCR erfolgte mit der durch Gelelution aufgereinigten (Kapitel 2.2.14) 6,4 kb großen dsRNA-Bande von TMV. Für die RT-DOP-PCR mit EbereschendsRNA wurde sowohl die gesamte dsRNA für die Erststrang-Synthese verwendet, als auch dsRNA-Banden, die zuvor aus einem Agarosegel eluiert worden waren. Die Reverese Transkription wurde wie folgt durchgeführt.

10 ng dsRNA mit 0,5 μg/μl Randomprimer in einem 11,5 μl Reaktionsansatz dentaurieren, 5 min. in einem siedenden Wasserbad

 \downarrow

dsRNA/Primer-Gemisch sofort auf Eis^{*} überführen und abkühlen; 2 min.

 \downarrow

4 μl 5 x RT-Puffer (Roche), 2 μl DTT (100 mM), 1 μl dNTP-Mix (10 mM, MBI), 0,5 μl RNasin (40 u/μl, Promega) sowie 1 μl Expand Reverse Transkriptase (50 u/μl, Roche) zugeben

/

inkubieren: 10 min 25 °C, 10 min. 37°C, 1 h, 42 °C

^{*}Altenativ wurde in den Etablierungsversuchen mit der TMV-dsRNA das denaturierte dsRNA/Primer-Gemisch von 99 °C auf 37 °C (bzw. in Parallelversuchen von 99 °C auf 25 °C) mit 2 °C Schritten und je 2 sec. pro Schritt, im Eppendorf Gradient Master Cycler, abgekühlt und anschließend auf Eis gestellt.

Für die anschließende DOP-PCR (Vgl. Kapitel 2.2.6) wurden 2 μ l aus der TMV-Erststrang-Synthese bzw. 4 μ l aus der Ebereschen-Erststrang-Synthese in einem 50 μ l Reaktionsansatz verwendet. Im Anschluß an die DOP-PCR wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch überprüft (2.2.13.2) und kloniert (Kapitel 2.2.6).

2.2.6 TOPO-TA-Cloning

Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte mit dem "TOPO TA Cloning[®]" Kit von Invitrogen entsprechend der Angaben des Herstellers (Vektorkarte siehe Anhang Kapitel 7.1). Die Länge der Klonierungsreaktion wurde in Abhängigkeit zu der Größe des zu klonierenden PCR-

Produktes zwischen 5 min. (bei PCR-Produkte bis 1 kb) und 15 min. (bei PCR-Produkten von 3-4 kb) gewählt.

Die Anzucht der transformierten Bakterien erfolgte auf X-Gal- und IPTG-beschichteten LB III Platten mit 150 mg/ml Ampicillin entsprechend der Angaben im "TOPO-TA Cloning[®]-Manual" bei 37 °C über Nacht.

2.2.7 Kolonie-Screening:

Eine erfolgreiche Klonierung wurde durch das Blau-Weiß-Screening überprüft. Nur weiße Kolonien wurden in weiteren Untersuchungen auf die Virusspezifität ihrer Insert getestet.

I) PCR mit vektorspezifischen M13-Primern:

Weiße Kolonien wurden mit vektorspezifischen M13-Primern in einer PCR, entsprechend der Angaben im "TOPO-TA Cloning[®]-Manual", auf die Größe ihrer Inserts hin getestet. Für die PCR wurden die Einzelkolonien direkt verwendet. Sie wurden in den fertigen PCR-Ansatz mit einer sterilen Pipettenspitze nach Beeimpfung einer neuen LB III-Ampicillin Platte (Masterplate) überführt.

II) Überprüfung von rekombinanten Klonen durch Koloniefilter-Hybridisierungen:

Für den Nachweis der Virusspezifität rekombinanter Klone wurden Koloniefilter-Hybridisierungen mit einer ECL-markierten-dsRNA-Sonde (Kapitel 2.2.15.3), modifiziert nach Amersham LIFE SCIENCE (ECLTM direct nucleic acid labelling and detection systems) durchgeführt (Kapitel 2.2.16.2).

III) Überprüfung von rekombinanten Klonen durch Northern-Hybridisierungen:

Zur weiteren Überprüfung der Virusspezifität wurden Dig-markierten RNA-Sonden (Kapitel 2.2.16.2) von den rekombinanten Klonen, die in der Kolonie-Filter-Hybridisierung positiv reagiert hatten, hergestellt und in Northern-Hybridisierungen mit gelelektrophoretisch aufgetrennter Gesamt-RNA (Kapitel 2.2.16 und 2.2.16.1) aus infizierten und symptomlosen Ebereschen getestet.

IV) Überprüfung von rekombinanten Klonen durch Southern-Hybridisierung:

Um auszuschließen, daß die klonierten cDNA Fragmente von einem Gen der Eberesche stammen, das im Zuge der Infektion aktiviert wird, wurden Southern-Blot-Analysen mit

restringierter genomischer DNA (Kapitel 2.2.16 und 2.2.17) aus erkrankten und symptomlosen Ebereschen durchgeführt.

2.2.8 Lagerung von virusspezifischen TOPO-TA Klonen:

Von Klonen, die in allen Untersuchungen eindeutig virusspezifisch reagiert hatten wurden Glycerolstocks (50 % Glycerol) angelegt. Hierfür wurden Flüssigkulturen mit einzelnen Bakterienkolonien von der Masterplate (Kapitel 2.2.7) geimpft, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend jeweils 0,5 ml in sterile Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, in denen 0,5 ml steriles Glycerol vorgelegt worden war. Die Eppendorf Reaktionsgefäße wurden kräftig gemischt, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei – 70 °C gelagert.

2.2.9 Sequenzierung

Alle virusspezifischen Klone wurden mit der Methode nach SANGER et al. (1977) sequenziert, wobei sowohl aufgereinigte PCR-Produkte als auch isolierte Plasmide für die Sequenzierung verwendet wurden. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem MicroSpin[™] CombiPack (Pharmacia/Biotech) nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die Aufreinigung gelelektrophoretisch überprüft (Kapitel 2.2.13.2). Die Sequenzierungen wurden im Mastercycler Gradient von Eppendorf unter Verwendung der vektorspezifischen M13-Primer oder klonspezifischer Primer durchgeführt.

<u>20 μl PCR-Reaktionsansatz:</u>
500 ng Plasmid bzw. 200-250 ng PCR-Produkt
3 μl Primer (5 pmol)
2 μl Big Dye
6 μl Half Therme
mit H₂O_{DEPC} auf 20 μl auffüllen.

Sequenzmarkierungs-Reaktion unter Verwendung der vektorspezifischen M13-Primer:

3 min. 96 °C 20 sec. 50 °C 4 min. 60 °C 20 sec. 96 °C 20 sec. 50 °C 4 min. 60 °C 4 min. 60 °C 4 °C ∞
Bei der Verwendung klonspezifischer Primer wurde die Annealingtemperaturen entsprechend der Angaben für den jeweiligen Primer variiert (vgl. Kapitel 2.2.10). Im Anschluß an die Sequenzmarkierungs-Reaktion wurden die PCR-Produkte aufgereinigt:

PCR-Ansatz mit H₂O_{DEPC} auf 100 µl auffüllen ↓ 10 µl 3 M Natriumacetat pH 5,3 und 250 µl Ethanol absolut (Raumtemperatur) zufügen und zentrifugieren, 20 min. 15000 rpm Raumtemperatur ↓ Sediment mit 70 % Ethanol waschen ↓ zentrifugieren 10 min. 15000 rpm, Raumtemperatur Überstand verwerfen und Sediment im Speed Vac Concentrator (Savant) 2 min. trocknen.

Die gereinigten und getrockneten PCR-Fragmente wurden an das Institut für Zellbiologie und Klinische Neurobiologie der Universität Hamburg gesandt und dort mit einem DNA Sequencer (Applied Biosystems, Model 370A/373A) ausgewertet. Sequenzvergleiche mit der NCBI Blast Search Datenbank sowie der EMBL Fasta3 Datenbank erfolgten mit Hilfe des Computerprogramm DNASIS, PROSIS und Lasergene 1997 das freundlicher Weise von Dr. T. Dresselhaus⁵ zur Verfügung gestellt wurde. Vor dem Ablgeich der Sequenzen mit der Datenbank wurden alle vektorspezifischen Sequenzen entfernt.

2.2.10 RT-PCR mit den virusspezifischen Primern

Für die RT-PCR-Untersuchungen wurden Primer mit Hilfe des Computerprogammes Oligo 4 von den Sequenzen abgeleitet. Es wurden ausschließlich Primer verwendet die einen Mindest-G/C-Gehalt von 50 % und eine Annealingtemperatur von mind. 50 °C aufwiesen. Die Synthese der Primer wurde bei der Firma Metabion in Auftrag gegeben.

Folgende Primer wurden von den unterschiedlichen Klonen abgeleitet:

Klon V272_33-spezifische Primer 33_401LP: 5'-CCA ATG ATT CCA GAC ACG-3' (GSP-Primer_1*) 33_195UP: 5'-CTC AAC TGT GGG GCA TAA TC -3' (GSP-Primer_2)

⁵Universität Hamburg, Institut für Allgemeine Botanik, Hamburg

Klone V283_2/1 spezifische Primer:

2/1_120LP: 5'-CAA TGT GTG GCA ACT GTC AG-3' (GSP Primer_1) 2/1_4UP: 5'-GTG GGG TTA TTT AGC TGG TG-3' (GSP-Primer_2)

Klon V492_21 spezifische Primer: 195UP: 5'-CTC AAC TGT GGG GCA TAA TC -3' 519LP: 5'-CAC ACC GCT GCA GAA CAT G-3` 472_UP: 5'-CTG TGA GAT AGA GCA AGT T-3' 506_UP: 5'-CTA TAT CCC AAC TTG TAC TT-3'

Klon V571_10 spezifische Primer: 473_FP: 5'-GTT AGT TTC GGG CGA TTA CAT-3' 358_RP: 5'-CCA ATG CAT GTG AAC TTA GTG-3' (GSP Primer_1) 410_RP: 5'-CAT CGT CTA TAA CAT CTT CA-3' 411_FP: 5'-GCA ACT AAT CCA TAC CTC AC-3' 1485_FP: 5'-CCC ATA TCT AGC GAC ACT-3' (GSP Primer_2) 1596_FP: 5'-GCA ATC ACT CTA AAT C-3'

*Die Angabe GSP-Primer bezieht sich auf die für die RACE-Untersuchungen verwendeten Primer (Kapitel: 2.2.12). Von jedem Klon, der für die RACE-Untersuchungen verwendet wurde, wurde jeweils ein GSP Primer 1 und 2 abgeleitet.

Jede Primer-Kombination wurde zunächst auf ihrem jeweiligen Plasmid in einer Gradienten-PCR im Gradient Mastercycler der Firma Eppendorf optimiert. Es wurde das nachfolgend beschriebene PCR-Programm für die verschiedenen Gradienten-PCR-Reaktionen verwendet. Die jeweiligen Annealingtemperaturen, auf denen der Gradient aufgebaut wurde, richteten sich nach den Angaben der Firma Metabion und sind nachfolgend für die verschiedenen Primerkombinationen dargestellt.

Annealingtemperaturen der verwendeten Primerkombinationen:

 401_LP/195_UP:
 53°C

 2/1_120LP/2/1_4UP:
 57 °C

 519_LP/195UP:
 55 °C

 472_UP/506_UP:
 53 °C

 358_RP/473_FP:
 56 °C

 410_RP/411_FP:
 55 °C

 358_RP/1485_FP:
 54 °C

 358_RP/1596_FP:
 54 °C

Gradienten-PCR Reaktion: 50 µl Reaktionsansatz: $40,5 \ \mu l H_2 O_{DEPC}$ 1 µl Plasmid (50 ng) 1 µl dNTP-Mix (10 mM, MBI) 1 µl Upper Primer (20 mM) 1 µl Lower Primer (20 mM) 5 µl 10 x Reaktionspuffer (AGS Hybaid) 0,5 µl Taq DNA-Polymerase (4u/µl, AGS Hybaid) PCR-Reaktion: 3 min. 94 °C 1 min. 10 Stufengradient ausgehend von der jeweiligen Annealingtemperatur 30 x 1.5 min. 72 °C 0,5 min. 94 °C 1 min. 53,7 °C 7 min. 72 °C

4 °C ∞

Nach der Etablierung der PCR-Reaktionen wurden die Primer in RT-PCR-Reaktionen mit der Gesamt-RNA erkrankter und symptomloser Ebereschen getestet.

I) RT-PCR mit den virusspezifischen Primern vom Klon V272_33:

Unter Verwendung der Klon V272_33 spezifischen Primer wurde eine RT-PCR auf der Basis von Gesamt-RNA entwickelt. Die Reverse Transkription sowie die nachfolgende PCR wurden im Mastercycler Gradient der Eppendorf durchgeführt.

<u>Reverse Transkription mit dem Klon V272_33 spezifischen Primer 401_LP:</u> Für die Reverse Transkription wurde der 401_LP Primer verwendet.

6 µg Gesamt RNA mit 1 µl 401_LP Primer (20 mM) in einem Volumen von 11,5 µl

denaturieren, 3 min im siedenden Wasserbad

↓ sofort abkühlen, 2 min, auf Eis

 \downarrow

4 μl 5 x Reverse Transkriptionspuffer (Roche), 2 μl DTT (100 mM, Roche), 1 μl dNTP-Mix (10 mM, MBI), 0,5 μl RNasin (40 u/μl, Promega) und 1 μl Expand Reverse Transkriptase (50u/μl, Roche) zugeben und inkubieren, 1 h, 42 °C

PCR Reaktion mit den Klon V272_33 spezifischen Primern 195UP und 401LP:

50 μl Reaktionsansatz:
38,5 μl H₂O_{DEPC}
3 μl Reverse Transkription
1 μl dNTP-Mix (10 mM, MBI)
1 μl 195 UP (20 mM)
1 μl 401 LP (20 mM)
5 μl 10 x Reaktionspuffer (AGS Hybaid)
0,5 μl Taq DNA-Polymerase (4u/μl, AGS Hybaid)

PCR-Reaktion: 3 min. 94 °C 1 min. 53,7 °C 1,5 min. 72 °C 0,5 min. 94 °C 1 min. 53,7 °C 7 min. 72 °C 4 °C ∞

II) RT-PCR mit den virusspezifischen Primern vom Klon V283_2/1:

Die RT-PCR wurde entsprechend der Angaben unter Punkt I mit folgenden Änderungen durchgeführt. Für die Reverse Transkription wurde der Primer 2/1_120LP Primer verwendet und die Annealingtemperatur der PCR-Reaktion betrug 57°C.

III) RT-PCR mit den virusspezifischen Primern vom Klon V492_21:

Die RT-PCR wurde entsprechend der Angaben unter Punkt I mit folgenden Änderungen für die verschiedenen Primerpaare durchgeführt. Die spezifischen Parameter der einzelnen RT-PCR-Reaktionen sind in der nachfolgenden Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Übersicht über die Verwendung der Klon V492_21 spezifischen Primerpaare.

Primerpaar	Primer der Reversen Transkription	Annealingtemperatur der PCR
519_LP/195_UP	519_LP	57 °C
472_UP/506_UP	Nicht durchgeführt	53 °C

Das Primerpaar 472_UP/506_UP wurde nur für die Sequenzierung verwendet. Aus diesem Grund wurde keine Reverse Transkription durchgeführt.

IV) PCR mit den virusspezifischen Primern vom Klon V571_10:

Die PCR wurde entsprechend der Angaben unter Punkt I mit den nachfolgend, für die verschiedenen Primerpaare angegebenen Annealingtemperaturen durchgeführt. Alle Primer wurden nur für die Sequenzierung verwendet, weswegen keine Reversen Transkriptionen durchgeführt wurden.

358_RP/473_FP: 60 °C 410_RP/411_FP: 55 °C 358_RP/1485_FP: 54 °C 358_RP/1596_FP: 54 °C

Für das Primerpaar 358_RP/743_FP wurde aufgrund der erwarteten Produktgröße von ca. 1800 bp eine Elongationszeit von 2 min. gewählt.

2.2.11 RT-PCR-Untersuchungen zum Verbinden von Klon V272_33 und V283_2/1

Da die Klone V272_33 und V283_2/1 in den Sequenzanalysen keine Überlappungen aufwiesen, wurden RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt, um das potentielle Zwischenstück zu amplifizieren. Die Reverse Transkriptions-Reaktionen erfolgten unter Verwendung des Primers 401_LP (Klon V272_33) bzw. des Primers 2/1_120LP (Klon 2/1) entsprechend der Angaben im Kapitel 2.2.10. Die verwendeten Primerkombinationen für die PCR-Reaktion sind in den Tabellen 4 und 5 dargestellt:

Tabelle 4: Übersicht über die eingesetzten Primer-Kombinationen für die RT-PCR-Reaktion

zum Verbinden der Klone V272-33 und V283_2/1 (Reverse Transkription mit dem Primer 401_LP)

Primer	PCR-Aligment-	Kontroll-PCR für den	Kontroll-PCR für den
	Reaktion	Primer 401_LP	Primer 2/1_4UP
Klon 33 195_UP		+	_
Klon 33 401_LP	+	+	—
Klon 2/1_4UP	+		+
Klon 2/1_120LP			+

Die verwendeten Primerkombinationen sind durch Kreuze gekennzeichnet.

Tabelle 5: Übersicht über die eingesetzten Primer-Kombinationen für die RT-PCR-Reaktionzum Verbinden der Klone V272-33 und V283_2/1 (Reverse Transkription mit demPrimer 2/1_120LP)

Primer	PCR-Aligment-	Kontroll-PCR für den	Kontroll-PCR für den
	Reaktion	Primer 519_LP	Primer 2/1_120LP
Klon 33 195_UP		+	
Klon 33 519_LP	+	+	
Klon 2/1_120LP	+		+
Klon 2/1_4UP			+

Die verwendeten Primerkombinationen sind durch Kreuze gekennzeichnet.

Für die PCR-Reaktionen wurde folgender Reaktionsansatz verwendet.

Reaktionsansatz:

50 µl Reaktionsansatz:

38,5 μ l H₂O_{DEPC}

3 µl Reverse Transkription

- 1 µl dNTP-Mix (10 mM, MBI)
- 1 µl Primer 1(20 mM)
- 1 µl Primer 2 (20 mM)
- 5 µl 10 x Reaktionspuffer (AGS Hybaid)
- 0,5 µl Taq DNA-Polymerase (4u/µl, AGS Hybaid)

PCR-Reaktion: 3 min. 94 °C 1 min. 57 °C 5.5 min. 72 °C 0,5 min. 94 °C 1 min. 57 °C 2 min. 72 °C 4 °C ∞

2.2.12 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Es wurden 5'RACE- und 3'RACE-Untersuchungen nach den Angaben von Clontech ("Smart[™] RACE cDNA Amplifikation Kit") durchgeführt. Als genspezifische Primer (GSP 1 und 2) wurden die Primer der Klone V272_33, V283_2/1 und V571_10 verwendet (vgl. Kapitel 2.2.10). Die RACE-Primer wurden entsprechend der Angaben von Clontech von der Firma Metabion hergestellt. Folgende RACE-Primer wurden verwendet:

Primer der Erststrang-Synthese:

Smart II Primer (10 µM):

5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3'

Bei den grau unterlegten Nukleotiden handelt es sich um Ribonukleotide.

3'-Race cDNA-Synthese Primer (3'-CDS; 10 μ M): 5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA C(T)₃₀N₋₁N-3' N = A, C, G oder T; N₋₁ = A, G, oder C

Universal Primer Mix (UPM) für die 5´-Race und 3´- PCR bestehend aus:

Universal Primer lang (UP lang; 0,2 μ M): 5'- CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA ACA ACG CAG AGT-3' und Universal Primer kurz (UP kurz, 1 μ M): 5'- CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'

Reverse Transkriptions-Reaktion für die RACE-Analysen:

Die Reverse Transkriptions-Reaktionen wurden entsprechend der Angaben von Clontech ("Smart[™] RACE cDNA Amplifikation Kit") mit 6 µg Gesamt-RNA durchgeführt. Für die 3'RACE-Untersuchungen wurde der 3'CDS-Primer von Clontech verwendet, während für die

Reverse Transkription der 5'RACE-Untersuchungen folgende klonspezifische Primer (GSP-Primer) zum Einsatz kamen:

195_UP (Klon V272_33) 401_LP (Klon V272_33) 2/1_4UP (Klon V283_2/1) 358_RP (Klon V571_10)

RACE PCR-Reaktion:

Die 5'- und 3'-RACE-Reaktionen wurden nach den Angaben von Clontech (Smart[™] RACE cDNA Amplification Kit) durchgeführt. Im Anschluß an die RACE-Untersuchungen wurde ein 1/10 Vol der PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.2.13.2). Nachfolgend wurden die RACE-PCR-Produkte kloniert (Kapitel 2.2.6).

2.2.13 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren:

2.2.13.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA:

Gesamt-RNA wurde in denaturierenden 1,5 % MOPS-Formaldehyd-Agarosegelen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenstandard wurden verschiedene DNA-Marker wie der Molecular weight marker III λ / *Eco*RI, *Hind*III (MBI), der DNA Molecular weight marker 15 λ *Eco*91I (MBI) oder der pUC Mix 8 (MBI) verwendet. Für RNA-Gele die anschließend geblotten (Kapitel 2.2.16) werden sollten, wurden zudem die Dig-markierten DNA Marker: Dig-Molecular weight marker pUCBM21 VIII/*Hpa*II, *Dra*I and *Hind*III, Dig-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III und der Dig-Molecular weight marker 15 λ *Eco*91 I von der Firma Roche verwendet.

Für die gelelektrophoretische Überprüfung einer RNA-Isolierungen (Kapitel 2.2.13.1) wurden 1/10 des Gesamtvolumens verwendet, während für Northern-Blot-Analysen 15 µg RNA Gesamt-RNA eingesetzt wurden. Die RNA-Proben wurden für die gelelektrophoretische Auftrennung mit Probenpuffer im Verhältnis 5:3 versetzt und durch Kochen 3 min. denaturiert. Die Proben wurden anschließend sofort auf Eis überführt und dort bis zum Auftragen auf das Gel gelagert.

Die Auswertung der gelelektrophoretischen Auftrennung erfolgte unter UV-Durchlicht mit einer Video-Dokumentationsanlage (INTAS).

Verwendete Puffer und Lösungen:

<u>10 x MOPS_{DEPC}-Puffer:</u> 200 mM MOPS 50 mM NaOAC 10mM EDTA, pH 7.0 <u>Laufpuffer:</u> 30 ml 10 x MOPS_{DEPC} 6 ml Formaldehyd (37%) 264 ml H₂O_{DEPC}

Probenpuffer:
16 μl Bromphenolblau (0,1 μg/ml)
80 μl 500 mM EDTA_{DEPC} (pH 8,0)
100 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml)
750 μl Formaldehyd (37 %)
2 ml steriles Glycerol (100 %)
3,084 ml Formamid
4 ml 10 x MOPS_{DEPC}

1,5 % MOPS Formaldehyd-Agarosegel:

0,75 g Agarose (Sigma)

44,1 ml H_2O_{DEPC}

5 ml 10 x MOPS_{DEPC}

0,9 ml Formaldehyd (37 %),

Agarose in H_2O_{DEPC} durch erhitzten lösen, anschließend 10 x MOPS_{DEPC}-Puffer dazugeben, auf abkühlen 68 °C lassen und Formaldehyd zugeben.

2.2.13.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und dsRNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und dsRNA erfolgte in einem 1,0 % Agarose-TBE Gel. Für die Überprüfung einer DNA- oder Plasmidisolierung (Kapitel 2.2.3.3 und 2.2.3.4) wurde jeweils 1/10 des Gesamtvolumes, für die Überprüfung einer dsRNA-Isolierung (Kapitel 2.2.3.2) 1/4 des Gesamtvolumens in die Gelelektrophorese eingesetzt. Für Southern-Blot-Analysen wurden 10 µg restringierte DNA oder 1/10 Vol des PCR-Ansatzes verwendet. Als Längenstandard dienten in Abhängigkeit der Größe der zu trennenden DNA-Moleküle der Molecular weight marker III λ / *Eco*RI, *Hind*III (MBI), der DNA Molecular weight marker 15 λ *Eco*91I (MBI) oder der pUC Mix 8 (MBI). Bei gelelektrophoretischer Auftrennung von DNA für Southern-Blot-Analysen wurden zusätzlich die Dig-markierten DNA-Marker Dig-DNA Molecular weight marker pUCBM21 VIII/*Hpa*II, *Dra*I und *Hind*III, Dig-DNA Molecular weight marker III λ / *Eco*RI, *Hind*III, und der Dig-DNA Molecular weight marker 15 λ *Eco*91 I von der Firma Roche verwendet.

Die Proben wurden vor der Auftrennung mit Probenpuffer im Verhältnis 5:1 versetzt. Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von Plasmiden erfolgte vor der Gelelektrophorese eine Denaturierung bei 56 °C für 5 min. im Probenpuffer.

Die Auswertung der gelelektrophoretischen Auftrennung erfolgte unter UV-Durchlicht mit einer Video-Dokumentationsanlage (INTAS).

Verwendete Puffer und Lösungen:

<u>TBE-Puffer (10 x):</u> 90 mM Tris-Base 90 mM Borat 2 mM EDTA (pH 8,0)

Laufpuffer: 100 ml TBE (10 x) 0,5 μg/ml Ethidiumbromid mit aqua bidest auf 1000 ml auffüllen

<u>Probenpuffer:</u>
0,25 % Bromphenolblau
30 % Glycerin in TBE (6 x)
0,5 μg/ml Ethidiumbromid

<u>1,0 % Agarose-TBE-Gel:</u>0,5 g Agarose (Sigma)durch Erhitzen in 50 ml TBE (1 x)-Puffer lösen

2.2.14 Eluierung von Nukleinsäure aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von dsRNA durch Gelelution erfolgte in Anlehnung an eine Methode von WERNER (persönliche Mitteilung, 1997). In den Boden eines 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßes mit einer sterilen Kanüle ein Loch stechen Ţ einen Filter aus 3 MM Whatmanpapier falten, in das Eppendorf Reaktionsgefäß schieben und mit 300 mM MgCl₂-Lösung_{DEPC} tränken L 100 µl 300 mM MgCl₂-Lösung_{DEPC} in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß vorlegen und das 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß hineinstecken die zu eluierende Bande aus dem Gel unter UV-Licht mit einer sterilen Skalpellklinge ausscheiden, direkt in das vorbereitete 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführen, sofort mit 100 µl 300 mM MgCl₂-Lösung_{DEPC} überschichten und zentrifugieren, 1 min. 13000 rpm, Raumtemperatur (Sigma 3K20, Rotor 12154) \downarrow dsRNA mit Chloroform/Phenol extrahieren (Kapitel 2.2.18) und dsRNA aus der wäßrigen Phase fällen über Nacht (Kapitel 2.2.19) T zentrifugieren, 40 min. 13000 rpm, 4 °C (Sigma 3K20, Rotor 12154) Sediment 2 x mit 70 % Ethanol_{DEPC} waschen und in der Speed Vac Concentrator (Savant) 2 min. trocknen dsRNA in 12 µl H₂O_{DEPC} aufnehmen und Konzentration photometrisch bestimmen (Kapitel 2.2.20)

2.15 Herstellung von DNA- und RNA-Sonden

2.15.1 Herstellung von Dig-markierten DNA-Sonden

Dig-markierte DNA-Sonden wurden durch PCR-Reaktionen mit virusspezifischen Primern (Kapitel 2.2.10) oder den vektorspezifischen M13-Primern (Kapitel 2.2.7) aus isolierten Plasmiden der entsprechenden Klone gewonnen.

Für die Markierung wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

100 ng Plasmid

1 µl Upper Primer 20 mM)

1 µl Lower Primer (20 mM)

1 μl dNTP-Mix (10 mM dATP, dGTP, dCTP und 7 mM dTTP, MBI)
 1,5 μl Dig 11-dUTP (1 nmol/μl, Roche)
 5 μl 10 x Reaktionspuffer (AGS, Hybaid)
 0,5 μl Taq-DNA-Polymerase (4 u/μl, AGS, Hybaid)
 auf 50 μl mit H₂O_{DEPC} auffüllen

Das PCR-Programm wurde entsprechend der jeweiligen Primer-Kombination gewählt und ist im Kapitel 2.2.10 beschrieben.

2.2.15.2 Herstellung von Dig-markierten RNA-Sonden durch *In-vitro* Transkription

Dig-markierte RNA-Sonden wurden auf der Basis isolierter Plasmide (Kapitel 2.2.3.4) durch Plasmidlinearisierung und anschließende *In-vitro* Transkription hergestellt.

Plasmidlinearisierung:

Die Linearisierung des isolierten pCR[®]2.1-TOPO-Vektors (Kapitel 2.1.3) erfolgte modifiziert nach SAMBROOK et al. (1989) mit dem Restriktionsenzym *Hind*III (MBI). Der Vektor pT7T3 des Plasmidklons DK80 (Kapitel 2.1.3) wurde entsprechend mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI (MBI) restringiert. Im Anschluß wurden die Plasmide mit Chloroform/Phenol extrahiert (Kapitel 2.2.18) und über Nacht bei –20 °C gefällt (Kapitel 2.2.19). Die Überprüfung der Linearisierung und die Mengenabschätzung erfolgten durch eine gelelektrophoretische Auftrennung (Kapitel 2.2.13.2).

In-vitro Transkription:

2 µg linearisiertes Plasmid mit 4 µl Transkriptionspuffer (5 x, MBI), 1 µl RNasin (40u/ µl, Promega), 2 µl Dig-NTP Mix (10 mM ATP, 10 mM GTP, 10 mM CTP, 6,5 mM UTP (MBI) und 3,5 mM Dig-11-UTP; (Roche)) und 4 µl DNA-abhängige T7-RNA-Polymerase (20 u/µl, MBI) inkubieren, 2 h, 37 °C ↓ 1 µl DNase I RNase free (10 u /µl, Roche) zugeben und inkubieren, 15 min, 37°C ↓ RNA aus der wäßrigen Phase über Nacht fällen, - 20°C (Kapitel 2.2.19) ↓ zentrifugieren; 20 min., 13.000 rpm, 4°C (Sigma 3K20, Rotor 12154) Sediment 2 x mit 70 % Ethanol_{DEPC} waschen und im Speed vac Concentrator (Savant) 2 min. trocknen \downarrow Sediment in 25 µl H₂O_{DEPC} resuspendieren und RNA-Sonde überprüfen: \downarrow a) Spot Blot-Hybridisierung (Kapitel 2.2.16)

b) RNA gelelektrophoretisch auftrennen (Kaptitel 2.2.13.1)

Die Sonden wurden bei Sonde bei -20°C gelagert.

2.2.15.3 Gewinnung von ECL-markierten dsRNA-Sonden

Für ein sensitives Screening-Verfahren der, durch die Klonierung (Kapitel 2.2.6) erhaltenen weißen Kolonien, wurde eine ECL-markierte dsRNA-Sonde verwendet. Sie wurde mit Hilfe des "Enhanced Chemiluminescens" ECL direct nucleic acid labelling and detection systems (Amersham LIFE SCIENCE) durch direkte Markierung nach Angaben des Herstellers gewonnen. Eine Überprüfung der Markierung erfolgte durch einen Spot Blot (Kapitel 2.2.16).

2.2.16 Hybridisierung

Es wurden Kolonie-Filter-, Northern-, Southern- sowie Spot Blot-Hybridisierungen durchgeführt. Zur Vorbereitung der Northern- und Southern-Hybridisierungen wurde gelelektrophoretisch aufgetrennte Nukleinsäure (Kapitel 2.2.13) durch einen Kapillartransfer nach Angaben des "The Dig System User´s Guide for Filter Hybridisation" (Roche) in einer Turboblotter[™] Apparatur (Schleicher und Schuell) auf eine Nylonmembran (Hybond[™]-NX, Amersham LIFE SCIENCE) transferiert.

Für die Kolonie-Filter-Hybridisierung erfolgte der Nukleinsäuretransfer auf die Nylonmembran (Hybond NX, Amersham, LIFE SCIENCE) in Anlehnung an SAMBROOK et al. (1989) mit Hilfe einer Dot Blot Apparatur wie folgt:

100 μl LB-Übernacht-Kultur unverdünnt und 1:10 verdünnt in 5 x SSC mit Hilfe einer Dot-Blot Apparatur auf eine Nylonmembran übertragen

↓ Membran in 0,5 M NaOH inkubieren, 5 min. ↓ Membran 2 x 1 min. in 5 x SSC spülen und dabei Bakterienreste vorsichtig mit dem Finger von der Membran entfernen

Ţ

Nukleinsäure unter UV-Licht bei 1200 Joule (UV Stratalinker™ 1800) auf der Membran fixieren

<u>Verwendeter Lösung:</u> <u>SSC (5x):</u> 0,75 M NaCl 0,75 mM Natriumcitrat pH 7,0

Durchführung der Spot-, Northern- und Southern-Hybridisierungen mit dem Dig-System von Roche:

Die Hybridisierungen und Detektion wurden nach Angaben des "The Dig System User's Guide for Filter Hybridisation" (Roche) durchgeführt.

Durchführung der Kolonie-Filter-Hybridisierung mit dem ECL-System von Amersham:

Die ECL-Hybridisierung und Detektion wurden entsprechend der Angaben des ECL direct nucleic acid labelling and detectionsystems (Amersham LIFE SCIENCE) durchgeführt.

2.2.17 Restriktion genomischer DNA

Genomische-DNA erkrankter und symptomloser Ebereschen wurde für Southern-Blot-Analysen mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Hind*III (MBI) wie folgt restringiert:

 $10\,\mu g \text{ genomische DNA in einem 40}\,\mu l \text{ Restriktionsansatz mit 4}\,\mu l \,10\,x\,\text{Restriktionspuffer (MBI) und}$ $2\,u/10\,\mu g\,\text{DNA Restriktionsenzym inkubieren, 37~°C, über Nacht}$

↓ restringierte DNA über Nacht fällen (Kapitel 2.2.19) ↓ zentrifugieren, 40 min. 13.000 rpm, 4 °C (Sigma 3K20, Rotor 12154)

\downarrow

restringierte DNA 2 x mit 70 % Ethanol_{DEPC} waschen, in der Speed Vac Concentrator (Savant) 2 min. trocknen und in 10 μ l H₂O_{DEPC}

2.2.18 Chloroform/Phenol Extraktion

Nukleinsäuren wurden durch eine Chloroform/Phenol Extraktion von Lipiden und Protein gereinigt. Die Extraktion wurde in Anlehnung an SAMBROOK et al. (1989) durchgeführt.

nukleinsäurehaltige Lösung mit 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1) versetzen und mischen, 1min. vortexen Ţ zentrifugieren, 10 min. 13000 rpm, Raumtemperatur (Sigma 3K20, Rotor 12154) T wäßrige Oberphase in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß überführen und mit 1 Vol Chloroform versetzten. Organische Phase mit 100 µl H₂O_{DEPC} versetzten und mischen, 1 min. vortexen zentrifugieren, 10 min. 13000 rpm, Raumtemperatur (Sigma 3K20, Rotor 12154) wäßrige Oberphase mit der vorherigen vereinigen und mischen, 30 sec. vortexen \downarrow zentrifugieren, 15 min. 13000 rpm, Raumtemperatur (Sigma 3K20, Rotor 12154) \downarrow wäßrige Oberphase abnehmen, in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß überführen und fällen über Nacht bei – 20 °C (Kapitel 2.2.19)

2.2.19 Nukleinsäure-Fällung

Fällung von Gesamt-RNA (ssRNA)

Gesamt-RNA wurde mit 1/10 Vol 4 M LiCl_{DEPC} und 2,5 Vol Ethanol abs. (- 20 °C) über Nacht bei – 20 °C gefällt.

Fällung von DNA (PCR-Produkte, Plasmiden und genomische DNA) und dsRNA

Die Fällung von DNA und dsRNA erfolgte mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat_{DEPC} (pH 5,2) und 2,5 Vol Ethanol_{abs.} (-20 °C) über Nacht bei – 20 °C. DNA wurde alternativ auch bei –70 °C für 1 Std. gefällt.

2.2.20 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Nukleinsäuren wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm im Spektralphotometer (Beckman DU 20 Spectrometer) ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Beschreibung der virusverdächtigen Symptome an erkrankten Ebereschen

Als charakteristische Symptome konnten an erkrankten Ebereschen chlorotische Ringflecke und chlorotische Scheckungen (Abb. 1) auf den Blättern beobachtet werden. Zusätzlich traten häufig auch Blattdeformationen (Abb. 1B) auf. Die verschiedenen Blattsymptome waren dabei sowohl einzeln auf verschiedenen Fiedern (vgl. Abb. 1), als auch gemeinsam an einem Fieder zu entdecken (Abb. 2). Insgesamt wurde eine sehr unregelmäßige Verteilung der Blattsymptome beobachtet. So traten an einem Wirtel neben symptomtragenden Fiedern auch symptomfreie Fieder auf (Abb. 3).



B



Abb. 1: Charakteristische Blattsymptome erkrankter Ebereschen A: Ebereschenblatt mit chlorotischen Ringflecken B: Ebereschenblatt mit einer chlorotischen Blattscheckung und Blattdeformationen (Pfeil)



Abb. 2: Ebereschenblatt mit chlorotischen Ringflecken (gelber Pfeil) und chlorotischen Scheckungen (weißer Pfeil)



Abb. 3: Darstellung eines Wirtels mitsymptomtragenden und symptomlosenEbereschenfiederblätternDie Pfeile markieren die symptomtragendenFieder

Ein weiteres häufig zu beobachtendes Symptom erkrankter Ebereschen war ein stark erhöhter Fruchtansatz, wobei die Fruchtreife meistens unvollständig blieb (Abb. 4).



Abb. 4: Früchte erkrankter und symptomloser Ebereschen (Ernte September 1999).

1: Früchte einer symptomlosen Eberesche 2 u. 3: Früchte erkrankter Ebereschen Die erkrankten Bäume zeigten bereits ab Mitte Mai eine vorzeitige Blattalterung, Blattvergilbungen sowie ein verstärktes Auftreten von Blattnekrosen (Abb. 5), während entsprechende Degenerationserscheinungen bei symptomlosen Ebereschen erst ab Ende August zu beobachten waren. Häufig trat auch eine Maskierung der Symptome durch die genannten Blattdegenerationen auf, die schon ab Ende Mai zu verzeichnen war. Bei vielen erkrankten Bäumen kam es zudem zu einer vorzeitigen Kronenverlichtung (Abb.6), sowie zum Absterben einzelner Äste.



Abb. 5: Blattvergilbungen und -vertrockungen bei einer erkrankten Eberesche aus dem Botanischen Garten (Hamburg; Zeitpunkt der Aufnahme: Mai 2000) Der Pfeil markiert einen Ast ohne Blattsvmptome



Abb. 6: Vergleich einer symptomlosen und einer erkrankten Eberesche (Zeitpunkt der Aufnahme: Mai 2000)

A: symptomlose Eberesche am Flughafen (Hamburg) B: erkrankte Eberesche an der Alster mit deutlicher Kronenverlichtung (Hamburg)

Neben den beschriebenen chlorotischen Blattsymptomen waren an Blätter erkrankter und symptomloser Ebereschen häufig Rostpilzinfektionen zu beobachten (verschiedene *Gymnosporangium*-Arten). Die Blätter wiesen dann gelbe bis rötliche, teilweise pustelartige, Flecke auf der Fiederoberseite auf. Häufig traten auch kleine pockenartige chlorotische, später bräunliche Flecken auf der Blattunterseite auf, die durch eine Infektion durch Gallmilben verursacht wurden (*Eriophyes sorbi*, Abb. 7).



Abb. 7: Ebereschenblatt mit charakteristischen Symptomen eines Gallmilbenbefalls. A: Blattunterseite. B: Blattoberseite

Besonders häufig traten erkrankte Ebereschen räumlich geballt auf, wobei in solchen nesterartigen Ansammlungen dann kaum symptomlose Ebereschen beobachtet werden konnten. In der Rfö. Klövensteen (Hamburger Staatsforst) trat dieses Phänomen besonders deutlich auf. Ähnliche Ansammlungen erkrankter Ebereschen waren aber auch auf dem Feldberg und in Breitnau (Baden-Württemberg), sowie auf der Insel Amrum (Schleswig-Holstein) zu verzeichnen.

3.2 Isolierung von doppelsträngiger RNA (dsRNA)

Es wurden verschiedene Methoden zu Isolierung von dsRNA auf ihre Eignung zur dsRNA-Gewinnung aus Ebereschenblättern überprüft, wobei jedes Verfahren zunächst an TMVinfizierten Tabakblättern von *Nicotiana tabaccum* L. *var. Samsun* etabliert wurde.

3.2.1 Isolierung von dsRNA aus TMV-infiziertem Tabak

Für die Etablierung der dsRNA-Isolierung wurde TMV-dsRNA verwendet, die aus TMVinfizierten *Nicotiana tabaccum* L. *var. Samsun*-Pflanzen 10 Tage nach der mechanischen Infektion und vor dem Auftreten des charakteristischen Blattsymptoms (Mosaik) isoliert wurde. Als Kontrolle der TMV-Infektion dienten einige Tabak-Pflanzen die bis zum Auftreten des charakteristischen Blattsymptoms (Abb. 8), nach ungefähr 14 Tagen weiter kultiviert wurden.



Abb. 8. Kontrolle der TMV-Infektion von Nicotiana tabacum L. var. Samsun-Pflanzen.
1: infiziertes Tabakblatt mit dem charakteristischen Mosaiksymptom. 2: gesundes Tabakblatt.

Die Ergebnisse der dsRNA-Isolierung nach FÜHRLING (1994) mit den vier verschiedenen Modifikationen (vgl. Kapitel 2.2.3.2) ist in Abbildung 9 dargestellt. Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurde jeweils 1/10 vol der isolierten dsRNA verwendet.



Abb. 9: Gelelektrophoretische Auftrennung von dsRNA aus TMV-infizierten Tabakblättern, isoliert mit der Methode von FÜHRLING, (1994) und den verschiedenen Modifikationen, in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose-TBE-Gel

Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ / *Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur 1: dsRNA-Isolierung nach FÜHRLING 1994; Spur 2: dsRNA-Isolierung unter Verwendung RNaseA anstelle RNase T₁ (Modifikation 1). Spur 3: dsRNA-Isolierung unter Zusatz von 0,5 % PVP zum Homogenisierungspuffer (Modifikation 2); Spur 4: dsRNA-Isolierung mit einer Unterstützung der dsRNA-Fällung durch Glykogen (Modifikation 3); Spur 5: dsRNA-Isolierung unter Verlagerung des DNA- und RNA-Vedau an das Ende der Aufarbeitung, Verwendung von RNaseA und Erhöhung der Cellulose-Konzentration sowie Zusatz von 0,5 % PVP zum Homogenisierungspuffer (Modifikation 4). Die Pfeile auf der rechten Seite geben die Größen der dsRNA-Banden an. Auf der linken Seite sind die Größen der Markerbanden dargestellt.

Wie deutlich zu erkennen ist, unterschieden sich die nicht modifizierte Methode und die vier verschiedenen Modifikationen sowohl in der Anzahl der isolierten dsRNA-Banden als auch in der Konzentration der isolierten dsRNA. So konnte in allen fünf Fällen die 6,4 kb große genomische dsRNA-Bande von TMV sowie zwei dsRNA-Banden von ungefähr 1,6 kb und eine 0,7 kb isoliert werden. Die dsRNA-Isolierung mit der Modifikation 4 (Abb. 9, Spur 5)

ergab zusätzlich jedoch zwei weitere dsRNA-Banden von ca. 1,2 kb und ca. 0,8 kb. Während bei der nicht modifizierten Methode nach FÜHRLING (Abb. 9, Spur 2), der Modifikation 2 (Zusatz von PVP zum Homogenisierungspuffer; Abb. 9, Spur 3) und der Modifikation 3 (Zusatz von Glykogen zur Fällung der dsRNA; Abb. 9 Spur 4) kein signifikanter Konzentrationsunterschied der isolierten dsRNA zu verzeichnen war (ca 20 ng/ μ l), führte ein Ersatz der RNase T₁ durch die RNaseA zu einer höheren Ausbeute an dsRNA (Modifikation 1; Abb. 9, Spur 2). Hier wurden Konzentrationen von etwa 100 ng/ μ l erzielt. Eine weitere Verbesserung der dsRNA-Isolierung konnte zudem durch die Erhöhung der Cellulose-Konzentration und die Verlagerung des DNA- und RNA-Verdaus an das Ende der dsRNA-Isolierung erzielt werden (Modifikation 4, Abb. 9 Spur 5). Auf diese Weise konnten bis zu 120 ng/ μ l TMV-dsRNA isoliert werden.

Auch mit den Methoden von LAULHERE und ROZIER (1976), FALK und TSAI (1984) sowie COFFIN und COUTTS (1992) konnte dsRNA aus den Blättern TMV-infizierter Tabakpflanzen isoliert werden, wobei bei diesen Methoden eine starke Anreicherung der 6,4 kb großen dsRNA-Bande gegenüber den niedermolekularen dsRNA-Banden beobachtet wurde (Abb. 10).



Abb. 10 : Gelelektrophoretische Auftrennung von dsRNA aus TMV-infizierten Tabakblättern, isoliert mit den Methoden von COFFIN und COUTTS (1992), FALK und TSAI (1984) und LAULHERE und ROZIER (1976) Spur M: DNA-Molecular weight marker $\lambda Eco91I$ (MBI); Spur 1:

COFFIN und COUTTS (1992); Spur 2: FALK und TSAI (1984); Spur 3 LAULHERE und ROTZIER (1976). Die Pfeile auf der rechten Seite geben die Größen der dsRNA-Banden an.

Zudem war die Konzentration an isolierter dsRNA bei diesen Methoden deutlich niedriger als bei der Modifikation 4 der Methode von FÜHRLING (1994),und lag bei der Methode von LAULHERE und ROZIER, 1976 zwischen 50 und 80 ng/µl und bei den Methoden von COFFIN und COUTTS, 1992 und FALK und TSAI, 1984 sogar nur zwischen 20 und 30 ng/µl dsRNA. Die Methode von LAULHERE und ROZIER (1976) bot jedoch den Vorteil der Verwendung von Sodiumdodecylsulfat (SDS) anstelle von Phenol. Es wurde daher versucht die Methode von LAULHERE und ROZIER (1976) mit der Modifikation 4 der Methode von FÜHRLING (1994) zu kombinieren (vgl. Kapitel 2.2.3.2). Durch diese Methoden-Kombination konnte eine dsRNA-Ausbeute von 150-200 ng/ μ l erzielt werden. In der in Abb. 11 dargestellten gelelektrophoretischen Auftrennung (es wurde hier nur 1 μ l von 20 μ l für die Gelelektrophorese verwendet) konnten zudem deutlich fünf dsRNA-Banden nachgewiesen werden. Diese Methodenkombination erwies sich somit als am effektivsten im Vergleich zu den anderen Methoden. Es wurde keine dsRNA in gesunden Tabakproben nachgewiesen (Abb. 11, Spur 2).



Abb. 11: Gelelektrophoretische Auftrennung von TMV-spezifischer dsRNA in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 %Agarose TBE-Gel. Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur 1: TMV-infizierter Tabak; Spur 2: gesunder Tabak. Die Pfeile auf der rechten Seite geben die Größen der dsRNA-Banden an. Auf der linken Seite sind die Größen der einzelnen Markerbanden angegeben.

3.2.2 Überprüfung der Wirkung unterschiedlicher RNaseA- und MgCl₂-Konzentration auf die Stabilität von TMV-dsRNA

Zum Nachweis der doppelsträngigen Natur der isolierten dsRNA sollte die Stabilität der dsRNA gegenüber der RNAseA getestet werden. Hierfür wurden die Wirkung unterschiedlicher RNaseA-Konzentrationen bei konstanter MgCl₂-Konzentration, und zum anderen der Effekt unterschiedlicher MgCl₂-Konzentration bei konstanter RNaseA-Konzentration auf die Stabilität und die Doppelstrangstruktur der dsRNA getestet. Aus den Ergebnissen dieser Versuche sollten Rückschlüsse auf die notwendige RNAseA- und MgCl₂-Konzentration für einen effektiven Verdau einzelsträngiger RNA (ssRNA), bei gleichzeitigem Schutz der dsRNA erzielt werden. In Abb. 12 ist die Wirkung unterschiedlicher RNaseA-Konzentrationen auf die TMV-dsRNA in einer 300 mM MgCl₂-Lösung dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß selbst bei der höchsten RNaseA-Konzentration (35 µg/ml) kein Abbau der dsRNA erfolgte (Abb. 12,Spur 1-4), während bereits die geringe RNaseA-

Konzentration von 0,35 µg/ml zu einer vollständigen Degradation der überwiegend einzelsträngigen Gesamt-RNA geführt hat (Abb. 12, Spur 6). Die doppelsträngige Natur der isolierten TMV-dsRNA konnte somit eindeutig bestätigt werden.



Abb. 12: Überprüfung der dsRNA-Stabilität gegenüber unterschiedlichen RNaseA-Konzentrationen bei konstanter MgCl₂-Kozentration (300 mM) in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel

Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ / *Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur 1: TMV-dsRNA inkubiert mit 0,35 µg/ml RNaseA; Spur 2: TMV-dsRNA inkubiert mit 3,5 µg/ml RNaseA; Spur 3: TMV-dsRNA inkubiert mit 35 µg/ml RNaseA; Spur 4: TMV-dsRNA-Kontrolle ohne RNaseA; Spur 5: Gesamt-RNA-Kontrolle unverdaut; Spur 6: Gesamt-RNA inkubiert mit 0,35 µg/ml RNaseA.

Die Wirkung unterschiedlicher MgCl₂-Konzentrationen bei konstanter RNaseA-Konzentration auf die Stabilität der TMV-dsRNA ist in Abb. 13 dargestellt. Hier wurde die dsRNA bei einer konstanten RNaseA Konzentration von 3,5 μ g/ml ab einer MgCl₂-Kozentration von 30 mM (Spur 3 und 4) vollständig degradiert.



Abb. 13: Überprüfung der dsRNA-Stabilität in unterschiedlich konzentrierten MgCl₂-Lösungen und konstanter RNaseA-Konzentrationen (3,5 µg/ml)

Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ / *Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur 1: TMV-dsRNA inkubiert in einer 300 mM MgCl₂-Lösung; Spur 2: TMV-dsRNA inkubiert in einer 100 mM MgCl₂-Lösung; Spur 3: TMV-dsRNA inkubiert in einer 30 mM MgCl₂-Lösung; Spur 4: TMV-dsRNA inkubiert in H₂O_{DEPC}

Die Auftrennung der dsRNA erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der RNAseA-Verdau in den folgenden Untersuchungen in einer 300 mM $MgCl_2$ -Lösung unter Verwendung einer RNaseA-Konzentration von 7 μ g/ml durchgeführt.

3.2.3 dsRNA-Isolierung aus Ebereschen-Blattproben

Es hatte sich in Vorversuchen bereits gezeigt, daß mit der Methoden von FÜHRLING (1994) keine Isolierung von dsRNA aus den Blättern erkrankter Ebereschen möglich war, bzw. die Ausbeute so gering war, daß die dsRNA gelelektrophoretisch in einem Ethidiumbromidgefärbten Agarosegel nicht mehr nachzuweisen war. Zudem wurde eine hohe Kontamination an einzelsträngiger RNA (ssRNA) beobachtet. Während der Aufarbeitungen des Ebereschenblattmaterials trat weiterhin eine starke Braunfärbung des Homgenates, durch Oxidation pflanzlicher Phenole ein. Aufgrund einer zusätzlichen hohen Schleimstoffkonzentration, welche die Aufarbeitung beeinträchtigte erwies sich der Pflanzenpreßsaft zudem als sehr dickflüssig. Erst mit der Modifikation 4 (Kapitel 3.2.1) der Methode von FÜHRLING (1994) konnte aus Blättern erkrankter Ebereschen dsRNA ohne eine, durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbare Kontamination an ssRNA isoliert werden (Abb. 14). Wie in Abb. 14 dargestellt wurden vier dsRNA-Banden mit Größen von 2,3 kb, 1,4 kb, 1,3 kb und 1,2 kb in den erkrankten Ebereschen nachgewiesen. In symptomlosen Ebereschen wurde dagegen keine dsRNA nachgewiesen. Während die Oxidation der penolischen Verbindungen durch den Einsatz von PVP erfolgreich verhindert werden konnte, und auch die störende ssRNA-Kontamination so weit reduziert wurde, daß ihr Nachweis durch Ethidiumbromidfärbung nicht mehr möglich war, wurde noch immer eine hohe Viskosität des Homogenates durch die anwesenden Schleimstoffe beobachtet. Die Konzentration der isolierten dsRNA lag zudem nur bei 2 ng/µl, was vermutlich auf dem störenden Einfluß der Schleimstoffe beruhte.



Abb. 14: Gelelektrophoretische Auftrennung von dsRNA, isoliert aus Blättern erkrankter Ebereschen mit der Modifikation 4 der Methode von FÜHRLING (1994), Spur M: DNA-Molecular weight marker λ III/ EcoRI, HindIII (MBI); Spur 1: symptomlose Eberesche; Spur 2: erkrankte Eberesche. Auf der rechten Seite sind die Größen der dsRNA-Banden und auf der linken Seite sind die Größen der einzelnen Markerbanden angegeben.

Die Auftrennung der dsRNA erfolgte in einem 1 % Ethidiumbromid-gefärbten Agarose TBE-Gel

Durch den Einsatz der kombinierten Methode von LAULHERE und ROZIER (1976) und FÜHRLING (1994) konnte jedoch der dickflüssige Schleimanteil des Homogenates durch den ersten Zentrifugationsschritt als eigene, auf der wäßrigen Phase schwimmende Phase konzentriert und entfernt werden. Das Ergebnis der dsRNA-Isolierung aus Blattproben zweier erkrankter und einer symptomlosen Eberesche mit dieser kombinierten Methode ist in Abb. 15 dargestellt. Es konnten 5 dsRNA-Banden von ungefähr 2,3 kb, 1,4 kb (Doppelbande) 1,3 kb und 1,2 kb beobachtet werden, wobei sich in dieser Aufarbeitung zeigte, daß es sich bei der 1,4 kb großen dsRNA-Bande um einen Doppelbande handelte. In der symptomlosen Ebereschen wurden dagegen erneut keine dsRNA-Banden nachgewiesen. Die Konzentration der mit dieser kombinierten Methode isolierten dsRNA lag bei 12 ng/µl. Durch diese Methodenkombination war es somit möglich, die höchste dsRNA-Ausbeute bei gleichzeitiger Anwesenhheit vieler dsRNA-Banden zu erzielen. Sie wurde daher für die nachfolgenden dsRNA-Isolierungen verwendet.



Abb. 15: Gelelektrophoretische Auftrennung von dsRNA, isoliert aus Blättern erkrankter Ebereschen mit der kombinierten Methode von LAULHERE und ROZIER (1976) und der Modifikation 4 der Methode von FÜHRLING (1994)

Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ / *Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur 1: erkrankte Eberesche; Spur 2: erkrankte Eberesche, Spur 3: symptomlose Eberesche. Die Pfeile auf der rechten Seite geben die Größen der dsRNA-Banden an. Auf der linken Seite sind die Größen der Markerbanden dargestellt. Die Auftrennung der dsRNA erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1% Agarose TBE-Gel. Db. = Doppelbande

3.2.4 Aufarbeitung von einem Gemisch aus TMV-infiziertem Tabak und Blättern erkrankter Ebereschen zur Überprüfung, ob weitere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe die dsRNA-Isolierung erschweren.

Aufgrund der wesentlich geringeren Ausbeute von dsRNA aus Blättern erkrankter Ebereschen gegenüber Blätter von TMV-infiziertem Tabak wurden Versuche unternommen, um zu klären, ob noch immer eine Beeinträchtigung der Isolierung durch weitere sekundäre Pflanzenstoffe der Eberesche vorlag. Zu diesem Zweck wurde eine dsRNA-Isolierung aus einem Gemisch aus 10 g TMV-infizierter Tabakblätter und 10 g Ebereschenblättern eines

erkrankten Baumes vorgenommen. Parallel dazu wurden als Kontrolle 10 g TMVinfizierte Tabakblätter alleine aufgearbeitet. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in der Abb. 16 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Ausbeute an isolierter TMV-dsRNA in der Mischprobe (Abb. 16, Spur 2) nicht signifikant reduziert war im Vergleich zu der alleinigen Aufarbeitung von dsRNA aus Tabakblättern (Abb. 16 Spur 1). Eine Beeinflussung der Isolierung von dsRNA durch das Ebereschenblattmaterial konnte somit nicht festgestellt werden. Allerdings waren die Ebereschen-spezifischen dsRNA-Banden in der Mischprobe nur schwach zu erkennen, was auf eine wesentlich geringeren Virustiter des Eberschenvirus in den Ebereschenblättern hinweist.



Abb. 16: Vergleich der dsRNA-Ausbeute aus einer Blatt-Mischprobe, aus TMVinfizierten Tabakblättern und Blättern einer erkrankten Eberesche, und einer TMVinfizierten Tabakblatt-Einzelprobe Spur M: DNA-Molecular weight marker $\lambda Eco911$ (MBI); Spur 1: TMV-infizierte Tabakblattprobe; Spur 2: Blatt-Mischprobe. Die schwarzen Pfeile geben die Größen der TMV-spezifischen dsRNA, und die weißen Pfeile die Größen der Ebereschen spezifischen dsRNA-Banden an. Die gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten dsRNA erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

3.3 Zeitlicher Verlauf der dsRNA-Akkumulation in Blättern erkrankter Ebereschen

Es wurde dsRNA aus Blattproben zweier erkrankter Ebereschen (Baum A: Tarpenbeker Wanderweg/Ecke Haldenstieg, Hamburg und Baum B: Rfö. Klövensteen, Hamburg) in regelmäßigen Abständen, von Beginn der Blattentwicklung im April 1999 an bis Juni 1999 isoliert. Parallel dazu wurden an jedem Standorten symptomlose Ebereschen ausgewählt, und einmal pro Monat beerntet. Mit Hilfe dieser Daten ist es möglich, den zeitlichen Verlauf der dsRNA-Akkumulation während der Wachstumsperiode zu bestimmen und so die optimale Erntezeit herauszufinden. Parallel hierzu wurde der Zustand der Bäume an jedem Erntetermin bonitiert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die Erntetermine von Ebereschen- Blattproben sowie die

Ernte	Bonitur von Baum A:	Ernte	Bonitur von Baum B:
Baum	Tarpenbeker Wanderweg Ecke	Baum	Rfö Klövensteen (Hamburg)
Α	Haldenstieg (Hamburg)	В	
18.04.	keine Blattsymptome* ¹	14.04.	keine Blattsymptome
25.04.	schwache Blattsymptome, Entwicklung der	26.04.	noch keine Blattsymptome,
	Blütenknopsen, starker erhöhter		Entwicklung von Blütenknospen,
	Blütenkospenansatz		stark* ² reduzierter Blütenknospenanstz
02.05.	deutliche Symptome	05.05.	sehr schwache Blattsymptome
09.05.	deutliche Blattsymptome, Blüten sind voll	10.05.	deutliche Blattsymptome, Blüten sind
	entwickelt		voll entwickelt
16.05.	deutliche Blattsymptome,	13.05.	keine Blattsymptomentwicklung an
			neuen Blättern, Blattvergilbung älterer
			Blätter
21.05.	deutliche Blattsymptome,	21.05.	Ausweitung der Blattvergilbung,
			Maskierung der Blattsymptome
31.05.	Blattvergilbung älterer Blätter	31.05.	Ausweitung der Blattvergilbung, erste
			Blattnekrosen und Rostpilzeninfektion
06.06.	Ausweitung der Blattvergilbung,	09.06.	Ausweitung der Blattvergilbungen und
	Gallmilbenbefall		-nekrosen, zunehmender Rostpilzbefall
13.06.	Ausweitung der Blattvergilbung, erste	11.06.	Ausweitung der Blattvergilbung und
	Blattnekrosen		-nekrosen, vorzeitige Vertocknung von
			Blättern, Blattfall
20.06.	Ausweitung der Blattvergilbung und	19.06.	Ausweitung der Blattvergilbung und
	-nekrosen, Maskierung der Blattsymptome		-nekrosen, Kronenverlichtung
27.06.	fortschreitende Degradation	29.06.	Ernte von Blattmaterial ist nicht mehr
			möglich.

Bonitur im Jahr 1999

*¹ Der Begriff Blattsymptom umfaßt die chlorotischen Ringflecke, Blattscheckungen und Blattdeformationen, die in Kapitel 3.1 beschrieben wurden.

*²Im Frühjahr 1998 und 2000 hingegen wurde ein wesentlich stärkerer Blütenansätze beobachtet.

Wie aus der Tabelle 1 zu entnehmen, wies die erkrankte Eberesche B aus der Rfö. Klövensteen bereits Mitte Mai eine beginnende Degradation auf, wodurch die Symptome zunehmend maskiert wurden. An jungen neu entwickelten Blätter konnte zudem keine Symptomentwicklung mehr beobachtet werden. Ab etwa Ende Mai 1999 wurde die Beprobung des Baumes durch die zunehmende Degradation der Blätter sehr stark eingeschränkt. Auch bei Baum A vom Tarpenbeker Wanderweg konnte ab Ende Mai eine beginnende Vergilbungen beobachtet werden, die jedoch langsamer voranschritt. Insgesamt waren die beobachteten Degradationen bei Baum B wesentlich stärker ausgeprägt als bei Baum A.

Wie in der Abb. 17 gezeigt, konnte aus allen Proben des Baums A (Abb. 17A) dsRNA isoliert werden, während bei Baum B (Abb. 17B) ein Nachweis von dsRNA erst ab Anfang Mai möglich war. Beide Bäume wiesen das dsRNA-Muster auf, welches schon zuvor bei den Etablierungsversuchen beobachtet wurde (vgl. Abb. 15). Die ca. 1,2 kb große dsRNA-Bande wurde allerdings nicht beobachtet. Dafür konnte eine sehr schwach konzentrierte ca. 7,6 kb

große dsRNA-Bande nachgewiesen werden. Sie trat bei Baum A in der Probe vom 06.06.1999 (Abb. 17A, Spur 8) auf und konnte bei Baum B in den Proben vom 21 und 31 Mai (Abb. 17B, Spur 6 und 7) beobachtet werden. In symptomlosen Ebereschen von den jeweils gleichen Standorten wurde erneut in keinem Fall dsRNA nachgewiesen.

Es konnte in beiden erkrankten Bäumen ein vergleichbarer Akkumulationsverlauf der dsRNA beobachtet werden. So nahm die dsRNA-Konzentration von Mitte April bis Anfang Mai zu, erwies sich von Mitte Mai bis Anfang Juni als konstant hoch, um dann bis Mitte Juni wieder abzunehmen. Aufgrund dieses Verlaufes der dsRNA-Akkumulation erfolgte die weitere Probenahme vornehmlich in der Zeit von Ende April bis Anfang Juni.

A



Abb. 17: Regelmäßige Isolierung von dsRNA aus Blättern zweier erkrankter Ebereschen in der Zeit von April bis Juni 1999

A) erkrankte (Spur 1-10) und symptomlose Eberesche (Spur 11-13) vom Tarpenbeker Wanderweg (Hamburg) B) erkrankte (Spur 1-10) und symptomlose Eberesche (Spur 11-13) aus der Rfö. Klövensteen (Hamburg) Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI), Spur M1: DNA-Molecular weight marker λ *Eco* 91 I (MBI); Spur 1: 18.04.; Spur 2: 25.04.; Spur 3: 02.05.; Spur 4: 09.05.; Spur 5: 16.05.; Spur 6: 21.05.; Spur 7: 31.05.; Spur 8: 06.06.; Spur 9: 13.06.; Spur 10: 20.06.; Spur 11: 18.04.; Spur 12: 16.05.; Spur 13: 13.06. Die Pfeile auf der rechten Seite geben die Größen der dsRNA-Banden an. Die Auftrennung der isolierten dsRNA erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel. Es sind jeweils die Erntetermine angegeben.

3.4 dsRNA-Isolierung aus Blattproben erkrankter und symptomloser Ebereschen von verschiedenen Standorten in Deutschland

Mit Hilfe der Isolierung von dsRNA aus Blättern erkrankter Ebereschen von unterschiedlichen Standorten in Deutschland sollte untersucht werden, ob verschiedene

Isolate anhand ihres dsRNA-Musters unterschieden werden können. Die Probenahmen erstreckten sich dabei, aufgrund der großen Entfernung zwischen den einzelnen Standorten, in den Jahren 1999 und 2000, jeweils auf die Zeit von Ende April bis Mitte Juni, wobei die verschiedenen Standorte pro Jahr einmal beerntet wurden. An jedem Standort wurde auch von einer symptomlosen Eberesche Blattmaterial geerntet.

Die einzelnen erkrankten Ebereschen zeigten dabei zum Zeitpunkt der Ernte sehr unterschiedliche Degradationserscheinungen. Eine Übersicht über Standorte, Degradationserscheinungen der Bäume und die Erntetermine ist in der Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen Standorte erkrankter Ebereschen in

Stand-	Standort	Ernte	Ernte	Bonitur zum Zeitpunkt	Bonitur zum Zeitpunkt
ort		1999	2000	der Ernte1999	der Ernte 2000
$\frac{Nr.}{1}$	Townsubals	29.4	20.4	ashu ashuu ah a	dentitate Diattermentance
1	Tarpenbek, Wandarwag Falsa	28.4.	29.4.	senf schwache	deutliche Blattsymptome
	Walldenstig			Blausymptome	
	(Hamburg)				
2	Pfö Klövensteen	55	30.4	schwache Blattsymptome	deutliche Blattsymptome
2	(Hamburg)	5.5.	50.4.	senwache Brausymptome	deuthene Blausymptome
3	FD. Niendorfer	12.5.	18.5.	deutliche Symptome,	deutliche Blattsymptome,
	Gehege			Blattvergilbungen	mäßiger Rostpilzbefall
	(Hamburg)				
4	Botanischer	14.5.	20.5.	deutliche Blattsymptome,	deutliche Blattsymptome,
	Garten			leichter Rostpilz- und	Blattvergilbungen,
	(Universität			Gallmilbenbefall	mäßiger Rostpilzbefall
	Hamburg)				
5	Insel Amrum	27.5.	29.5.	schwache Blattsymptome,	deutliche Blattsymptome,
	(Schleswig-			leichte Rostpilzinfektion,	starker Gallmilben- und
	Holstein)			starke Blatt-vergilbungen	Rostpilzbefall
	Df: H-h-h-i-h-	20.5	5.0	Salvasakasa ala	legelliste Distances de ser
0	KIO. Hannneide	30.5.	5.6.	Senr schwache	deutliche Blattsymptome
	(Schleswig-			Blattyorgilbungon	
	Hoistein)			Gallmilbanhafall	
				Gammioenderan	
7	Rfö. Hasloh	30.5.	5.6.	schwache Blattsymptome,	kranke Ebereschen
	(Schleswig-			starke Rostpilzinfektion,	wurden gefällt
	Holstein)			Blattvergilbungen und	
				-nekrosen, Vertrockung von	
				Blättern	
8	Rfö. Karpak	30.5.	5.6.	Schwache Blattsymptome,	schwache Blattsymptome
	(Schleswig-			Blattvergilbung	
	Holstein)				~
9	Ravenna-Schlucht	15.6.	19.6.	deutliche Blattsymptome,	Sperrung der Schlucht
	(Baden-			starke Blattvergilbungen und	daher keine Ernte
	Württemberg)			-nekrosen, Vertrocknung	
				von Blattern,	
10		15 6	10.6	Gallmilbenbefall	1 1 1
10	Fa Breitnau	15.6.	19.6.	senr schwache	senr schwache
	(Baden-			Blattsymptome,	Blattsymptome,
	wurttemberg)				Blattverglibungen und -
					von Blättern leichter
					von Diauerii, ieichier Rostnilzhafall
11	Grupowold	21.6	22.6	sehr schwache Symptome	keine Symptomo
11	(Berlin)	£1.0.	22.0.	Blattverhräunung	Kenne Syntptome

Deutschland, ihre Erntetermine sowie Bonitur zum Zeitpunkt der Ernte

* Der Begriff Blattsymptome umfaßt die chlorotischen Ringflecke, Blattscheckungen und Blattdeformationen, die im Kapitel 3.1 beschrieben wurden.

Das Ergebnis der dsRNA-Isolierung ist in Abb. 18 dargestellt. Erneut konnte auch bei diesen Untersuchungen in fast allen Proben ein identisches dsRNA-Muster beobachtet werden (Abb. 18A und B). Die ca. 1,2 kb große dsRNA-Bande trat jedoch nicht auf. Die ungefähr 7,6 kb große dsRNA-Bande wurde dafür in einigen Juniproben (Breitnau-Probe, Juni 1999 und 2000, Abb. 18A/B Spur 10), verschiedenen Maiproben (Niendorfer Gehege, Mai 2000 Abb. 18B, Spur 3; Insel Amrum, Mai 2000 Abb. 18B, Spur 5) und sogar zwei Aprilproben (Tarpenbeker Wanderweg Spur 1; Klövensteen, April 2000 Abb. 18B, Spur 2) nachgewiesen. In allen Proben von 1999 wurde zudem eine sehr schwach konzentrierte ungefähr 2,5 kb große dsRNA-Bande beobachtet (Abb. 18A), die in den untersuchten Proben von 2000 sowie in den vorherigen Untersuchungen nicht aufgetreten war.

Auffällig war im Rahmen dieser Untersuchungen, daß in den einzelnen Proben sehr unterschiedliche dsRNA-Konzentration beobachtet werden konnten. So wies 1999 eine Juni-Probe (Abb. 18A, Spur 10) mit 20 ng/µl die höchste dsRNA-Konzentration auf. Und auch in der Untersuchung von 2000 (Abb. 18B) lagen die höchsten dsRNA-Konzentrationen in der Zeit von Ende Mai bis Anfang Juni (Amrum 29.5.2000, Spur 4; Karpak 05.06.2000, Spur 7; Hahnheide 05.06.2000, Spur 8). Aus den übrigen Proben wurde dagegen wesentlich weniger dsRNA isoliert. Teilweise lag die dsRNA-Konzentration sogar unterhalb der Nachweisgrenze eines Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegeles (Abb. 18A Spur 5 und 7 sowie Abb. 18B, Spur 11).





Die erkrankten Ebereschen sind in den Spuren 1-11 und die symptomlosen Ebereschen in den Spuren 12-16 aufgetragen.

A) Untersuchung von 1999

B) Untersuchung von 2000

C) Übersichtskarte über die verschiedenen Standorte in Deutschland sowie der Standortnummern (Stn.)

Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI), Spur M1: DNA-Molecular weight marker λ *Eco* 91I (MBI); Spur 1: Stn. 1; Spur 2: Stn. 2; Spur 3. Stn. 3; Spur 4: Stn. 4; Spur 5: Stn. 5; Spur 6: Stn. 6; Spur 7: Stn. 7; Spur 8: Stn. 8; Spur 9: Stn. 9; Spur 10: Stn. 10; Spur 11: Stn. 11; Spur 12: Stn. 2; Spur 13: Stn. 5; Spur 14: Stn. 8; Spur 15: Stn. 10; Spur 16: Stn. 11. Die Pfeile auf der rechten Seite geben die Größen der dsRNA-Banden an. Die Numerierung der Spuren wurde in der Abb. B entsprechend der vorhandenen Proben vorgenommen. Die einzelnen Erntezeitpunkte sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Die Auftrennung der dsRNA erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel

3.5 Isolierung von dsRNA aus Rindenproben erkrankter Ebereschen

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem putativen Virus um ein im Phloem lokalisiertes Virus handelt wurde versucht, dsRNA aus Rindenproben erkrankter Ebereschen zu isolieren. Wie in der Abb. 19 dargestellt, war auch die Isolierung von dsRNA aus Rinde erkrankte Ebereschen möglich, während keine dsRNA in der Rinde symptomloser Ebereschen nachgewiesen wurde. Die Konzentration der isolierten dsRNA lag jedoch nur bei 4 ng/µl. Wie schon in den Blattproben, so konnten auch in den Rindenproben eine ca. 7,6 kb, 2,5 kb und 2,3 kb große dsRNA-Bande nachgewiesen werden. Zusätzlich traten jedoch auch noch zwei weitere niedermolekulare dsRNA-Banden von ca. 1,1 kb und 0,9 kb auf. Die Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über sämtliche aus Blatt- und Rindenproben isolierten dsRNA-Banden.



Abb. 19: Nachweis von dsRNA in der Rindenprobe einer erkrankten Eberesche

Spur M: DNA-Molecular weight marker IIIλ/EcoRI, HindIII (MBI); Spur 1 erkrankte Eberesche; Spur 2: symptomlose Eberesche. Die Pfeile geben die Größen der dsRNA-Banden an. Auf der linken Seite sind die Größen der Markerbanden angegeben. Die Auftrennung der isolierten dsRNA erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

Tabelle 3: Übersicht über sämtliche aus Blatt- und Rindenproben isolierter dsRNA-Banden

Blätter	Rinde
7,6 kb	7,6 kb
2,5 kb	2,5 kb
2,3 kb	2,3 kb
1,4 kb (Doppelbande)	/
1,3 kb	/
1,2 kb	/
/	1,1 kb
/	0,9 kb

In beiden Geweben vorhandene Banden sind grau unterlegt.

Da die dsRNA-Konzentration auch in Rindenproben Schwankungen unterworfen sein kann, wurde der Akkumulationsverlauf von dsRNA in Rindenproben in der Zeit von März (vor Beginn der Blattentwicklung) bis Juni 1999, an der erkrankten Eberesche vom Tarpenbeker Wanderweg/Ecke Haldenstieg (Hamburg) untersucht. Wie in der Abb. 20 zu erkennen ist, konnte ein Konzentrationsanstieg der dsRNA in Rinde von Ende März (Spur 1) bis Anfang Mai (Spur 4) beobachtet werden, während die Konzentration von Mitte Mai bis Anfang Juni (Spur 7-9) stark abnahm und die dsRNA-Banden in dem Ethidiumbromidgefärbten 1 % Agarose TBE-Gel kaum noch zu erkennen waren (Spur 7-9). Erst Mitte Juni (Spur 10 und 11) konnte wieder ein leichter Anstieg der dsRNA-Konzentration beobachtet werden. Damit verhielt sich die dsRNA-Akkumulation entgegengesetzt zu dem in Blattproben beobachteten Akkumulationsverlauf (vgl. Abb. 17). Auffallend war weiterhin, daß die Zusammensetzung des dsRNA-Bandenmuster über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant blieb.



Abb. 20: Regelmäßige Isolierung von dsRNA aus der Rinde einer erkrankten Ebersche in der Zeit von März bis April 1999

Spur 1-11: erkrankte Eberesche vom Tarpenbeker Wanderweg/Ecke Haldenstieg (Hamburg) Spur 12-15: symptomlose Eberesche vom Tarpenbeker Wanderweg/Ecke Haldenstieg (Hamburg) Spur M1: DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI), Spur M2: DNA-Molecular weight marker λ *Eco* 91 I (MBI); Spur 1: 29.03.*; Spur 2: 18.04.; Spur 3: 25.04.; Spur 4: 02.05.; Spur 5: 09.05.; Spur 6: 16.05.; Spur 7: 21.05.; Spur 8: 31.05.; Spur 9: 06.06.; Spur 10: 13.06.; Spur 11: 20.06.; Spur 12: 29.03.; Spur 13: 25.04; Spur 14: 21.05; Spur 15: 13.06.

Die Pfeile auf der rechten Seite geben die Größen der dsRNA-Banden an. Die Auftrennung der dsRNA erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel. *Die Angaben entsprechen den Ernteterminen.

3.6 Gewinnung und Klonierung von cDNA

Für die Charakterisierung des putativen Agens mußte seine Nukleotidsequenz bestimmt werden. Um dies zu erreichen, sollte die dsRNA zunächst in eine cDNA überschrieben und anschließend kloniert werden. Die geringe Ausgangskonzentration der dsRNA machte eine Amplifikation der synthetisierten cDNA vor der Klonierung notwendig. Es wurde daher eine Klonierungsstrategie entwickelt, die auf der Synthese von cDNA aus dsRNA mit nachfolgender *Eco*RI-Adapter-Ligierung beruhte (vgl. Kapitel 2.2.4). Auf der Basis der

ligierten Adapter konnte dann durch eine PCR mit *Eco*RI-spezifischen Primern eine Amplifikation der cDNA erzielt werden. Die gesamte Klonierungsstrategie (vgl. Kapitel: 2.2.4) wurde zunächst mit der TMV-dsRNA etabliert und anschließend mit der Ebereschen dsRNA durchgeführt.

3.6.1 Synthese von cDNA aus TMV-dsRNA mit anschließender *Eco*RI-Adapter-Ligation und PCR

Es wurde 500 ng TMV-dsRNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Das Ergebnis der PCR ist in Abb. 21 dargestellt. Als Kontrolle der PCR-Reaktion wurde restringierte und ligierte DNA des Phagen Lambda (λ cl857 *Sam*7 Wildtyp) verwendet, welche in Vorversuchen für die Etablierung der PCR-Reaktion eingesetzt worden war. Es ist deutlich ein Schmier in dem Ethidiumbromid-gefärbten Agarose TBE-Gel zu erkennen (Spur 1 und 3), der von der Amplifikation der ligierten λ -DNA und TMV-cDNA herrührt. In anschließenden Versuchen wurde die cDNA in den "pCR[®]2.1 TOPO[®] Cloning Vektor" von Invitrogen kloniert (vgl. Kapitel 3.6.2).



Abb. 21: Gelelektrophoretische Auftrennung von 10 μl *Eco* RI-PCR-Produkt, in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur M1: pUC Mix 8 (MBI); Spur 1: PCR-Produkt aus der *Eco*RI-PCR mit der λ -DNA; Spur 2: unbeladen; Spur 3: PCR-Produkt aus der *Eco*RI-PCR mit der TMV-cDNA; Spur 4: Wasserkontrolle.

3.6.2 Analyse der TOPO-TA-Klone durch PCR, Southern-Blot-Analysen und Sequenzierung

Die erfolgreiche Klonierung mit dem "TOPO TA Cloning[®] Kit" von Invitrogen wurde zunächst durch ein Screening der blauen und weißen Kolonien ermittelt. Dabei wurden durchschnittlich sechsmal soviel weiße wie blaue Kolonien gezählt. Um einen Überblick über

die Größe der Inserts zu erhalten und um die einzelnen Klone näher charakterisieren zu können, wurden 33 rekombinante Klone, durch eine PCR mit vektorspezifischen M13-Primern, auf die Größe ihres Inserts getestet. Wie in der Abb. 22 beispielhaft für eine solche M13-PCR zu erkennen ist, konnten in 12 von 14 rekombinanten Klonen Inserts mit Größen zwischen 330 bp und 1400 bp nachgewiesen werden. Bei dem Klon V149_T7 (Abb. 22, Spur 8) handelt es sich um einen Mischklon, der zwei verschiedenen große Inserts aufweist. In der blauen Kontroll-Kolonie wurde ausschließlich die Multiple Cloning Site (MCS), mit einer Größe von 200 nt amplifiziert (Spur 16). Die Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die Größen dieser Inserts.



Abb. 22: Kontrolle der Inserts rekombinanter TOPO-TA Klone durch PCR mit M13- Primern Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur K: Wasserkontrolle; Spur 1-14: rekombinante Klone (V149_T1-T14); Spur 15: blauer TOPO-TA Klon. Die Größen der Markerbanden sind auf der linken Seite angegeben. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

Name des Klons	Größe des PCR-Produkts in bp (mit MCS)	Größe des Inserts in bp
V149_T1	740	540
V149_T2	1380	1180
V149_T3	740	540
V149_T4	Kein Amplifikat	Kein Amplifikat
V149_T5	600	400
V149_T6	970	770
V149_T7	830/530	630/330
V149_T8	1030	830
V149_T9	950	750
V149_T10	Kein Amplifikat	Kein Amplifikat
V149_T11	530	330
V149_T12	970	770
V149_T13	970	770
V149_T14	970	770

Tabelle 4: Größe der PCR-Fragmente und der tatsächlichen Inserts der verschiedenen

Ein Überblick über die Vektorkarte findet sich im Anhang (Kapitel 7.1).
Auch in den restlichen 19 rekombinanten Klonen (V149_T14-33) konnten durch die M13-PCR Inserts zwischen 500 bp und 1200 bp nachgewiesen werden.

Um die TMV-Spezifität der rekombinanten Klone zu überprüfen, wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt. Das Ergebnis einer solchen Untersuchungen ist in Abb. 23 dargestellt. Von den Inserts der 8 getesteten rekombinanten Klone reagierten 7 eindeutig mit der TMVspezifischen Sonde, während der Klon V149_T27 (Spur 8) nicht nachgewiesen wurde. Insgesamt wurde in allen durchgeführten Southern-Blot-Analysen in 85 % der untersuchten rekombinanten Klone eine spezifische Hybridisierung mit der TMV-spezifischen Sonde erzielt. Eine unspezifische Hybridisierung der Sonde mit blauen Kolonien konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.



Abb. 23: Southern-Blot-Analyse von PCR-Produkten rekombinanter TOPO-TA Klone mit einer TMV-spezifischen Dig-markierten RNA-Sonde.

A) Auftrennung der PCR-Produkte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.B) Southern-Blot-Analyse.

Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur M1: Dig-DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (Roche); Spur 1-8: rekombinante Klone V149_T1-7 und V149_T27; Spur 9: PCR-blauer TOPO-TA Klon; Spur 10. Wasserkontrolle.

Es wurden eine Auswahl der Klone (Klon V149_T1, 3, 5, 6, 9, 15 und 21) ansequenziert, um ihre TMV-Spezifität durch einen Vergleich mit der Datenbank nachzuweisen. Zusätzlich wurden zwei Klone (Klon V149_T27 und 31), die in den Southern-Blot-Analysen nicht mit der TMV-Sonde reagiert hatten durch Sequenzierung überprüft, um den Ursprung dieser Klone zu bestimmen. Bei den Klonen V149_T1,3, 5, 6, 9, 15 und 21 konnten durch den Vergleich der Sequenzen mit der Datenbank Übereinstimmungen mit dem TMV-Genom nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Sequenzen der beiden Klone 27 und 31 mit der Datenbank zeigten dagegen in beiden Fällen deutliche Homologien zu verschiedenen pflanzlichen und tierischen 25S rRNAs.

3.7 Reverse-Transkriptions PCR mit degenerierten Oligonukleotid Primer (RT-DOP-PCR)

Obwohl mit der in Kapitel 3.6 beschriebenen Methode zur cDNA-Synthese erfolgreich cDNA aus TMV-dsRNA synthetisiert wurde (es wurden 85 % TMV-spezifische Klone gewonnen), konnte keine cDNA aus Ebereschen-dsRNA synthetisiert werden. Es ist zu vermuten, daß die wesentlich geringere dsRNA-Konzentration aus Ebereschenblättern für eine cDNA-Synthese nicht ausreichten. Es mußte daher eine zweite Strategie entwickelt werden, um die geringe Ausgangskonzentration zu überbrücken. Hierfür bot sich nach Dr. M. ROTT (persönliche Mitteilung, 1998) die RT-DOP-PCR an (vgl. Kapitel: 2.2.5). Sie ermöglicht eine direkte Amplifikation unbekannter Nukleinsäure mit Hilfe degenerierter Primer. Jedoch mußte das DOP-PCR-Program von Roche zunächst auf dem Gradient Mastercycler von Eppendorf etabliert werden, da es für den Perkin Elmer PCR-System 9600 Thermocycler entwickelt worden war.

3.7.1 DOP-PCR

Die Etablierung der DOP-PCR wurde mit der im "DOP PCR Master" Kit vorhandenen Kontroll-DNA (humane genomische DNA aus lymphoblastoiden Zellen) durchgeführt. Die Schwierigkeit bestand vor allem in der optimalen Übertragung des ersten Zyklus des DOP-PCR-Protokolls (vgl. Kapitel 2.2.5) auf den Gradient Mastercylcer von Eppendorf. Trotz verschiedener Modifikation konnten in Vorversuchen mit dem DOP-PCR Protokoll der Firma Roche zunächst keine PCR-Produkte amplifiziert werden. Entsprechend der Angaben von Dr. M. ROTT (persönliche Mitteilung, 1998), wonach der Mastermix des "DOP PCR Master" Kit fehlerhaft sei, wurde in einer Versuchswiederholung neben den Reagenzien von Roche auch ein selber zusammengestellter Mastermix, mit eigener Taq-DNA Polymerase verwendet. Das Ergebnis ist in der Abb. 24 dargestellt.



Abb. 24: DOP-PCR nach ROCHE, dargestellt in einem Ethidiumbromidgefärbten 1,5 % Agarose TBE-Gel. Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ / *Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur 1:

Wasserkontrolle; Spur 2: DOP-PCR Master Kit von Roche; Spur 3: selber zusammengestellter PCR-Mastermix Wie in der Abb. 24 dargestellt war es möglich, mit dem selber zusammengesetzten PCR-Mastermix eine Amplifikation von PCR-Produkten, die im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel als Schmier zu erkennen sind, zu erzielen. In den folgenden Versuchen wurde daher nur noch ein selber zusammengesetzter Mastermix für die DOP-PCR verwendet, wobei zunächst versucht wurde die Ausbeute der DOP-PCR zu verbessern, um so eine optimale Ausgangssituation für die nachfolgende Klonierung zu erzielen. In zahlreichen Vorversuchen zur Optimierung der DOP-PCR, durch die Modifikationen des ersten Zyklus des Protokolls oder die Verkürzung des DOP-Primer (22mer) am 3'-Ende um ein bzw. zwei Nukleotide (DOP-Primer 1 und 2), konnte jedoch zunächst zu keine erkennbare Verbesserung der Ausbeute erzielt werden. Erst durch eine anfängliche Beschleunigung und anschließende Verlangsamung dieses Temperaturanstiegs von 30 °C auf 72 °C (vgl. Kapitel 2.2.5) war es möglich, die Ausbeute an PCR-Produkten signifikant zu erhöhen (Abb. 25), wobei deutlich zu erkennen ist, daß unter Verwendung des DOP-Primers nach ROCHE, im Vergleich zu dem DOP-Primer 1 und 2, die größte Produktausbeute erzielt werden konnte.



Abb. 25. DOP-PCR modifiziert nach ROCHE und unter Verwendung der Primer DOP-Primer, DOP-Primer 1 und DOP-Primer 2 Spur M: pUC Mix 8 (MBI); Spur 1: Wasserkontrolle; Spur 2: DOP-Primer; Spur 3: DOP-Primer 1; Spur 4: DOP-Primer 2. Die Größen der Markerbanden sind auf der linken Seite angegeben. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1 % Ethidiumbromidgefärbten Agarose TBE-Gel

Wie aus der Abb. 25 verdeutlicht wird, lag die Hauptproduktgröße der PCR-Produkte zwischen 300 und 800 bp.

3.7.2 RT-DOP-PCR unter Verwendung der TMV-dsRNA

Die Etablierung der RT-DOP-PCR erfolgte zunächst unter Verwendung der TMV-dsRNA. Es wurden drei Parallelansätze zu Reversen Transkription durchgeführt (vgl. Kapitel 2.2.5.1). Das Ergebnis der anschließend durchgeführten DOP-PCR ist in Abb. 26 dargestellt. Es wurden jeweils 20 µl des 50 µl PCR-Ansatzes für die gelelektrophoretische Auftrennung verwendet. Im Gegensatz zu den Etablierungsversuchen der DOP-PCR mit der Kontroll-DNA von Roche konnten in dieser RT-DOP-PCR, neben einem schwachen PCR-Produkt-Schmier,

auch zahlreiche distinkte Banden im Ethidiumbromid-gefärbten Agarose TBE-Gel beobachtet werden. Die Größen der amplifizierten PCR-Produkte lagen bei ca. 880 bp (Hauptbande), 690 bp, 600 bp, 520 bp, 440 bp, 420 bp, 360bp, 320 bp, und 300 bp. Ein Unterschied in der Ausbeute an PCR-Produkten bei Verwendung der verschiedenen oben genannten Verfahren zum Abkühlen der denaturierten dsRNA konnte nicht beobachtet werden.



Abb. 26: RT-DOP-PCR mit TMV-dsRNA

Spur M: pUC Mix 8 (MBI); Spur 1: RT-DOP-PCR mit Abkühlung der dsRNA auf Eis im Anschluß an die Denaturierung; Spur 2. RT-DOP-PCR mit Abkühlung der dsRNA von 99 °C auf 37 °C im Thermocycler im Anschluß an die Denaturierung; Spur 3: RT-DOP-PCR mit Abkühlung der dsRNA von 99 °C auf 25 °C im Thermocycler im Anschluß an die Denaturierung; Spur 4: DOP-PCR-Kontrolle mit Kontroll-DNA von Roche; Spur 5: Wasserkontrolle. Auf der linken Seite sind die Größen der Markerbanden angegeben. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

3.7.3 RT-DOP-PCR unter Verwendung der dsRNA aus Ebereschenblättern

Für die RT-DOP-PCR aus Ebereschenblättern wurden ebenfalls 10 ng dsRNA verwendet. Das Ergebnis einer solche RT-DOP-PCR Reaktion mit der gesamten dsRNA einer Blattprobe vom 05.05.1999 ist in der Abb. 27 dargestellt. Es konnte eine deutliche Amplifikation der Ebereschen-dsRNA nach Reverser Transkription erzielt werden (Spur 1), wobei ebenfalls reproduzierbare distinkte Banden von ungefähr 520 bp, 480 bp, 330 bp, 270 bp und 210 bp unterschieden werden konnten. Entsprechend der Versuche zur dsRNA-Isolierung aus symptomlosen Ebereschen, bei denen kein Nachweis von dsRNA im Ethidiumbromidgefärbten Agarose TBE-Gel möglich war (vgl. Abb. 17 und 18), konnte auch keine Amplifikation im Zuge der RT-DOP-PCR beobachtet werden. (Spur 2). Die Produkte der RT-DOP-PCR wurden direkt nach der Amplifikation kloniert (Kapitel 3.8).



Abb. 27: RT-DOP-PCR mit Ebereschen-dsRNA, Spur M: DNA-Molecular weight marker IIIλ/*Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur M1: pUC Mix 8 (MBI); Spur 1: erkrankte Eberesche; Spur 2: symptomlose Eberesche; Spur 3: Wasserkontrolle. Die Pfeile auf der rechten Seite geben die Größen der DOP-PCR-Produkte an. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

In einem Parallelversuch wurde die ca. 7,6 kb große dsRNA-Bande alleine, sowie die 2,5 kb und 2,3 kb großen dsRNA-Banden bzw. die 1,4 kb (Doppelbande) und die 1,3 kb großen dsRNA-Banden jeweils gemeinsam, nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel eluiert. So sollte eine mögliche Kontamination durch pflanzliche RNA, welche durch intramolekulare Basenpaarung eine doppelsträngige Struktur aufwies, reduziert werden. Es wurden jeweils 10 ng der eluierten dsRNA-Banden für die RT-DOP-PCR verwendet. Als negative Kontrolle der Reversen Transkription wurde die Flüssigkeit aus einem Nukleinsäurefreiem Gelblock eluiert und ebenfalls in die RT-DOP-PCR eingesetzt. Aus dem Gelblock-Eluat wurde zudem ein Aliquot direkt in der DOP-PCR verwendet. Das Ergebnis dieser RT-DOP-PCR-Untersuchungen ist in der Abb. 28 dargestellt. Trotz der unterschiedlichen dsRNA-Templates wurden reproduzierbar in allen drei Versuchen identische RT-DOP-PCR-Produkte (Spur 1-3) mit Größen von ca. 520 bp, 480 bp, 240 bp, 190 bp und 110 bp beobachtet, von denen nur die beiden größten PCR-Fragmente auch in der vorangegangenen RT-DOP-PCR (Abb. 27) auftraten. Wie schon bei der Verwendung der gesamten dsRNA für die RT-DOP-PCR, so wurden auch bei diesem Versuch die drei kleinsten PCR-Fragmente am stärksten amplifziert. Eine Kontamination der RT-DOP-PCR durch Fremd-DNA oder RNA aus dem Agarosegel konnte nicht festgestellt werden.



Abb. 28: RT-DOP-PCR mit eluierten dsRNA-Banden

Spur M: pUC Mix 8 (MBI); Spur 1: RT-DOP-PCR mit der ca. 7,6 kb großen dsRNA-Bande; Spur 2: RT-DOP-PCR mit der ca. 2,5 kb und. 2,3 kb großen dsRNA-Banden; Spur 3: RT-DOP-PCR mit der ca. 1,4 kb/Doppelbande und 1,3 kb großen dsRNA-Bande; Spur 4: RT-DOP-PCR mit der dsRNA einer symptomlosen Eberesche; Spur 5: RT-DOP-PCR mit dem Gelblock-Eluat; Spur 6: DOP-PCR mit dem Gelblock-Eluat; Spur 7: Wasserkontrolle. Die Pfeile auf der rechten Seite geben die Größen der DOP-PCR-Produkte an., Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

Die Produkte, die durch RT-DOP-PCR der 7,6 kb großen dsRNA-Bande erhalten wurden, wurden direkt nach der Amplifikation kloniert ebenfalls im (Kapitel 3.8).

3.8 Klonierung der RT-DOP-PCR-Fragmente

Die erfolgreiche Klonierung der DOP-PCR-Produkte ist in Abb. 29 beispielhaft dargestellt. In allen durchgeführten Klonierungen konnte ein 9-16 fach höherer Anteil weißer Kolonien gegenüber den blauen Kolonien beobachtet werden.



Abb. 29: Transformation von *E. coli* Zellen (Stamm TOP10F' von Amersham) mit PCR-Fragmenten der RT-DOP-PCR im Vektor pCR[®]2.1 TOPO[®]. Die Pfeile markieren weiße Kolonien

Die Größen der Inserts wurden, wie schon in Kapitel 3.6.2 beschrieben, durch eine PCR mit vektorspezifischen M13-Primern überprüft. Das Ergebnis einer solchen M13-PCR ist beispielhaft in der Abb. 30 dargestellt.



Abb. 30: Kontrolle der Inserts rekombinanter TOPO-TA-Klone durch PCR mit M13-Primern

Spur M: pUC Mix 8 (MBI); Spur 1-10: PCR-Produkte rekombinanter TOPO-TA-Klone; Spur 11: PCR-Produkt eines blauen TOPO-TA-Klons; Spur 12: Wasserkontrolle. Auf der linken Seite sind die Größen der Markerbanden angegeben. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

Bei der blauen Kolonie handelt es sich um einem Mischklon, der zudem zwei Inserts beinhaltete (Abb. 30, Spur 11).

Ein Vergleich aller Größen der RT-DOP-PCR-Fragmente mit den Inserts aller kontrollierten rekombinanten Klone verdeutlichte, daß vor allem PCR-Fragmente mit Größen zwischen 50 und 150 bp mit Hilfe des "TOPO-TA Cloning[®]," Kits kloniert worden waren. Sowohl durch die RT-DOP-PCR, als auch durch die Klonierung waren somit vor allem kleinere PCR-Fragmente bevorzugt worden.

3.8.1 Screening der rekombinanten Klone

Die rekombinanten Klone wurden im Anschluß an die M13-PCR durch Kolonie-Filter-Hybridisierungen sowie Northern-Blot- und Southern-Blot-Analysen auf ihre Virus-Spezifität hin überprüft.

3.8.1.1 Kolonie-Filter-Hybridisierung

Mit Hilfe der ECL-markierten dsRNA-Sonde konnten die rekombinanten Klone durch Kolonie-Filter-Hybridisierungen (vgl. Kapitel 2.2.7) auf die dsRNA-Spezifität ihres Inserts hin getestet werden. Das Ergebnis einer solchen Kolonie-Filter Hybridisierung ist beispielhaft in Abb. 31 dargestellt. Als Negativ-Kontrolle wurde ein blauer Klon verwendet, der zuvor in einer M13-PCR getestet worden war und kein Insert enthielt. Die Einteilung der Klone als virusspezifisch erfolgte jeweils im Abgleich mit dem blauen Klon.



Abb. 31: Kolonie-Filter-Hybridisierung rekombinanter TOPO-TA-Klone mit einer dsRNA-spezifischen ECL-markierten Sonde.

Es wurden bei dieser Hybridisierung 8 Klone (Nr.10, 13, 14 und 20-24) als positiv eingestuft, doch auch die Klone der Nummern 1-5 und 11, deren Reaktion im Vergleich mit dem blauen Klon nicht ganz eindeutig war, wurden in den nachfolgenden Untersuchungen weiter getestet. Insgesamt wurden so von 110 rekombinanten Klonen, die in der Kolonie-Filter-Hybridisierungen untersucht wurden, 41 Klone (37 %) für die nachfolgenden Untersuchungen (Kapitel 3.8.1.2) ausgewählt.

3.8.1.2 Northern-Blot-Analysen

Von allen 41 Klonen, die durch die Kolonie-Filter-Hybridisierung ausgewählt worden waren, sollten durch *in-vitro* Transkription Dig-markierte RNA-Sonden hergestellt werden, um die Virussepezifität der Klone in Northern-Blot-Analysen gegen Gesamt-RNA aus erkrankten und symptomlosen Ebereschen zu testen. Da der pCR[®] 2.1 TOPO Vektor nur einen RNA-Polymerase-Promotor besaß, wurden parallel zu den Dig-markierten RNA-Sonden auch Dig-markierte DNA-Sonden eingesetzt.

Insgesamt konnten von den 41 Klonen nur 32 Klone für eine *in-vitro* Transkription verwendet werden, da die übrigen Klone Inserts von lediglich 50-80 bp aufwiesen und sich daher nicht zur Sondenherstellung eigneten.

Für die Durchführung der Northern-Blot-Analysen hatte sich in Vorversuchen gezeigt, daß mind. 15 μg Gesamt-RNA notwendig waren, um einen spezifischen Nachweis der Virus-RNA erzielen zu können.

Insgesamt reagierten in den Northern-Blot-Analysen 20 Klone eindeutig mit der Gesamt-RNA aus symptomlosen und erkrankten Ebereschen, während 10 Klone ausschließlich eine Hybridisierung mit ihrem jeweiligem Plasmid aufwiesen. Auch unter Verwendung der Dig-markierten DNA-Sonden dieser Klone war es nicht möglich, eine spezifische Hybridisierung zu erzielen. Es ist zu vermuten, daß der fehlende spezifische Nachweis von RNA durch die geringe Größe der Inserts bedingt war, da diese Klone Inserts von nur 120-150 bp aufwiesen.

Nur zwei Klone V272_33 und V283_2/1 mit Inserts von 621 bp bzw. 195 bp zeigten eine eindeutige Reaktion mit der RNA aus erkrankten Ebereschen, während keine Hybridisierung mit der RNA aus symptomlosen Ebereschen nachgewiesen wurden (Abb. 32). Auffallend war dabei jedoch, daß sich die Muster der mit den beiden Sonden detektierten RNA-Banden unterschieden, obwohl in beiden Fällen ein Aliqout von derselben Gesamt-RNA vom 27.04.2000 gelelektrophoretisch aufgetrennt worden war. So konnten mit der Sonde vom Klon V272_33 zwei große RNA-Banden mit ungefähr 7,6 kb und 2,5 kb detektiert werden (Abb. 32B), während mit der V283_2/1-Sonde die vier kleineren RNA-Banden von ungefähr 2,3 kb, 1,4 kb (Doppelbande) und 1,3 kb nachgewiesen wurden (Abb. 32D). Ob auch eine Detektion der 1,4 kb/Doppelbande sowie der 1,3 kb großen RNA-Banden durch die RNA-Sonde V272_33 vorlag ließ sich nicht eindeutig klären (Abb. 32A, Spur 1). Die ca. 1,2 kb große dsRNA-Bande wurde in keinem Fall nachgewiesen. Insgesamt stimmten die Größen der detektierten RNA-Banden mit dem dsRNA-Muster überein (vgl. Abb. 18).



Abb. 32: Northern-Blot-Analysen mit gelelektrophoretisch aufgetrennter Gesamt-RNA aus erkrankten und symptomlosen Ebereschen

A und C: Gelelektrophoretische von Gesamt-RNA erkrankter und symptomloser Ebereschen in einem denaturierenden 1,5 % Mops-Agarose-Formaldehydgel

B: Northern-Blot-Analyse mit der Dig-markierten RNA-Sonde des Klons V272_33

D: Northern-Blot-Analyse mit der Dig-markierten RNA-Sonde des Klons V283_2/1

Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur M1: Dig-DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (Roche); Spur M2: RNA-Molecular weight marker I (Roche); Spur M3: Dig-Molecular weight marker λ /*Eco*91I (Roche); Spur M4: Dig-DNA-Molecular weight marker pUCBM21 VIII/*Hpa*II, *Dra*I und *Hind*III (Roche); Spur 1: erkrankte Eberesche; Spur 2: symptomlose Eberesche; Spur 3: positive Kontrolle: PCR-Produkt von Klon V272_33 (Abb. A und B), bzw. Plasmid V283_2/1 (Abb. C und D).

Um eine optimale Darstellung der einzelnen Banden zu erzielen, wurden die Probenspuren unterschiedlich lange exponiert. Auf der rechten Seite geben die schwarzen Pfeile die Größen der RNA-Banden an. Weiße Pfeile markieren die positiven Kontrollen.

Der geringe Nachweis der positiven Kontrollen im Rahmen der Northern-Blot-Analysen beruht auf der schwächeren Hybridisierung zwischen DNA und RNA.

3.8.1.3 Southern-Blot-Analysen zum Nachweis der Virus-Spezifität der Klone V272_33 und V283_2/1

Es wurden Southern-Blot-Analysen mit restingierter genomischer DNA aus erkrankten und symptomlosen Ebereschenblättern durchgeführt. Ziel war es nachzuweisen, daß die Klone V272_33 und V283_2/1 definitiv virusspezifisch waren und nicht von einem pflanzlichen Gen stammten, das im Verlauf der Infektion expremiert wurde.

In beiden Fällen konnte nur eine Hybridisierung der Dig-markierten DNA-Sonden mit der jeweiligen positiven Kontrolle beobachtet werden. Keine der beiden Sonden reagierte dagegen mit der restringierten genomischen DNA. In der Abb. 33 ist das Ergebnis einer solchen Southern-Blot-Analyse exemplarisch für den Klon V283_2/1 dargestellt.



Abb. 33: Southern-Blot-Analysen mit restringierter genomischer DNA aus erkrankten und symptomlosen Ebereschen

A) Gelelektrophoretische Auftrennung der restringierten DNA in einem Ethidiumbromidgefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

B) Southern-Blot-Analyse mit der Dig-DNA Sonde des Klons V283_2/1.

Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur M1: Dig-DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (Roche); Spur M2: Dig-DNA-Molecular weight marker pUCBM21 VIII/*Hpa*II, *Dra*I und *Hind*III (Roche); Spur M3: pUC Mix 8 (MBI); Spur 1: erkrankte Eberesche *Eco*RI-Verdau; Spur 2: symptomlose Ebereschen *Eco*RI-Verdau; Spur 3: erkrankte Eberesche *Hind*III-Verdau; Spur 4: symptomlose Ebereschen *Hind*III-Verdau; Spur 5: positiv Kontrolle: PCR-Produkt des Klons V283_2/1. Der Pfeil markiert die positive Kontrolle

3.8.1.4 Sequenzierung der Klone V272_33 und V283_2/1

Nachdem die Klone V272_33 und V283_2/1 in allen vorangegangenen Untersuchungen eine eindeutige virusspezifische Reaktion aufgewiesen hatten wurden sie sequenziert, um eine Charakterisierung der viralen RNA zu erzielen. Zusätzlich wurden auch alle Klone, die keine eindeutige Hybridisierung in den Northern-Blot-Analysern ergeben hatten (vgl. Kapitel: 3.8.1.2), sowie einige pflanzenspezifische Klone durch Sequenzierung überprüft. Die

pflanzenspezifischen Klone zeigten dabei deutliche Übereinstimmungen mit verschiedenen pflanzlichen und tierischen rRNAs. Bei keinem der übrigen Klone konnten auf der Genom-Ebene Hinweise auf ein virales Gen oder auf pflanzenspezifische Gene in der Datenbank gefunden werden. Auf der Proteinebene wurden dagegen zahlreiche kurze Aminosäure-Homologien zu Proteinen der unterschiedlichsten humanpathogenen Viren und auch einigen pflanzenpathogenen Viren nachgewiesen, von denen auffallend viele zu den RNA-abhängigen RNA-Polymerasen und Polyproteinen der verschiedenen Viren paßten. Die nachgewiesenen Proteine wiesen insgesamt allerdings alle unterschiedliche Leserahmen und Orientierungen auf. Lediglich der Klon V283_2/1 zeigte eine deutliche Homologie zu verschiedenen Polyproteinen human- und pflanzenpathogener Viren, die alle den gleichen Leserahmen aufwiesen. Innerhalb der einzelnen Polyproteine lagen die Homologien allerdings in unterschiedlichen Proteinbereichen.

Ein Alignment der cDNAs mit dem Programm Lasergene 1997 war zwischen den Klone in keinem Fall möglich.

Da die Sequenzierung der Klone, welche in den Northern-Hybridisierungen keine eindeutige Reaktion aufgewiesen hatten (vgl. Kapitel 3.8.1.2), keine klaren Hinweise auf ein virales Protein erbracht hatten, wurden sie nicht weiter untersucht. Ihre Herkunft bleibt daher unklar. Nur die virusspezifischen Klone V272_33 und V283_2/1 wurden für die nachfolgenden RT-PCR- und RACE-Analysen (vgl. Kapitel 3.10 und 3.11) verwendet. Ihre Sequenzen sind im Anhang dargestellt (Abb. 61 und 62).

3.9 Virusspezifische Polymerase Kettenreaktionen

Auf der Basis der Sequenzen der Klone V272_33 und V283_2/1 wurden Primer für nachfolgende RT-PCR- und RACE-Untersuchungen (Kapitel 3.11) abgeleitet. Die Lage der verwendeten Primer auf den Klonen ist in der Abb. 34 und dargestellt.



Abb. 34: Lage der Primer auf den Klonen V272_33 und V283_2/1. Die genauen Positionen sind als Nukleotid-Angaben jeweils an den Markierungsdreiecken der einzelnen Primer vermerkt.

Jedes Primerpaar wurde vor dem Einsatz in den RT-PCR- und RACE-Untersuchungen zunächst auf seinem jeweiligen Plasmid in einer Gradienten-PCR auf seine Spezifität getestet. Die Ergebnisse der Gradienten-PCR-Reaktionen, für die von den Klonen V272_33 und V283_2/1 abgeleiteten Primer sind in der Abb. 35 dargestellt.



Abb. 35: Gradienten-PCR zur Überprüfung der Primer-Spezifität

A): Gradienten-PCR mit den Primern 195_UP und 401_LP des Klons V272_33
B) Gradienten-PCR mit den Primern 2/1_4UP und 2/1_120LP des Klons V283_2/1
Es wurden die jeweiligen Plasmide der beiden Klone in der PCR als Templates verwendet
Die Temperaturen für das Annealing der Primer sind jeweils für beide Abbildungen dargestellt.
Spur M: pUC Mix 8 (MBI); Spur 1: Annealingtemperatur a: 51,2 °C, b: 49,9 °C; Spur 2: Annealingtemperatur a: 51,6 °C, b: 50,9 °C; Spur 3: Annealingtemperatur a: 52,5 °C, b: 52,3 °C; Spur 4: Annealingtemperatur a: 53,7 °C, b: 54,0 °C; Spur 5: Annealingtemperatur a: 55,0 °C, b: 55,7 °C; Spur 6: Annealingtemperatur a: 56,4 °C, b: 57,4 °C; Spur 7: Annealingtemperatur a: 57,8 °C, b: 57,8 °C; Spur 8: Annealingtemperatur a: 59,1°C, b: 58,9 °C; Spur 9: Annealingtemperatur a: 60,1 °C, b: Wasserkontrolle; Spur 10; a: Wasserkontrolle. Die Pfeile geben die Größen der PCR-Produkte an. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel

Wie in den Abbildungen 35 zu erkennen ist, konnten mit beiden Primerpaaren spezifische PCR-Produkte mit den erwarteten Größen von 224 bp (V272_33-Primer) bzw. 136 bp (V283_2/1-Primer) amplifiziert werden. Nachdem die Spezifität der Primer gegenüber ihrer cDNA bewiesen war, wurden RT-PCR-Untersuchungen an der Gesamt-RNA erkrankter und symptomloser Ebereschen mit den jeweiligen Primerpaaren durchgeführt (Abb. 36) Dabei konnte mit beiden Primerpaaren jeweils ein PCR-Produkt der erwarteten Größe in der erkrankten Eberesche nachgewiesen werden, während in keinem Fall ein PCR-Produkt in der Gesamt-RNA symptomloser Ebereschen amplifiziert wurde. Um die Spezifität der PCR-Produkte zu überprüfen und gleichzeitig nachzuweisen, daß keine weiteren PCR-Produkte

amplifiziert wurden, deren Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegeles lagen, wurden Southern-Blot-Analysen von den PCR-Produkten mit den Dig-markierten Sonden der Klone V272_33 und V283_2/1 durchgeführt. Wie ebenfalls in Abb. 36 dargestellt, konnte die Spezifität der Primer gegenüber dem Agens der Eberesche durch die Southern-Blot-Analysen bestätigt werden.



Abb. 36: Überprüfung der Primerspezifität durch RT-PCR mit Gesamt-RNA aus erkrankten und symptomlosen Ebereschen und nachfolgender Southern-Blot-Analyse.
A): RT-PCR mit den Primern 401_LP/195_UP des Klons V272_33
B) Southern-Blot-Analyse mit der Dig DNA-Sonde des Klons V272_33
C) RT-PCR mit den Primern 2/1_120LP/2/1-4UP des Klons V283_2/1
D) Southern-Blot-Analyse mit der Dig DNA-Sonde des Klons V283_2/1
D) Southern-Blot-Analyse mit der Dig DNA-Molecular weight marker pUCBM21 VIII/HpaII, DraI und HindIII (Roche); Spur 1: erkrankte Eberesche; Spur 2: RT-PCR symptomlose Eberesche; Spur 3: Wasserkontrolle. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel. Die Pfeile geben ihre jeweiligen Größen an.

RACE-Untersuchungen

Es wurden RACE-Untersuchungen auf der Basis der Klone V272_33 und V283_2/1 durchgeführt, um die viralen RNA-Enden zu ermitteln. Dabei wurde für die 3'RACE-Analysen der Primer 3'-CDS (Clontech) für die Reverese Transkription verwendet. Unter Verwendung dieses Primers erfolgt eine Reverse Transkription ausgehend vom Poly A-Schwanz der RNA, für den dieser Primer spezifisch ist. Jedoch konnte weder beim Klon V272_33 noch beim Klon V283_2/1 eine Amplifikation des 3'-Endes der viralen RNA erzielt

3.1

0

werden. Auch in der positiven Kontrollreaktion mit den jeweiligen beiden GSP-Primern war kein PCR-Produkt amplifiziert worden, was darauf hindeutet, daß die virusspezifische RNA nicht revers transkribiert worden war.

Im Gegensatz zu der 3 RACE konnten in der 5 RACE-Untersuchungen virusspezifische Primer für die Reverse Transkription verwendet werden. Die Wahl dieser Primer erfolgte auf der Basis der Sequenzanalyse. Während jedoch für den Klon V283_2/1 eine Orientierung des Leserahmes ermittelt werden konnte, war dies aufgrund der geringeren Sequenzinformationen für den Klon V272_33 nicht möglich. Es wurden daher für diesen Klon sowohl der 401_LP-als auch der 195_UP-Primer (vgl. Abb. 34) für die Reverse Transkription in den 5 RACE-Untersuchungen verwendet. Es konnte jedoch in beiden Fällen keine Amplifikation des viralen 5'-Endes erzielt werden. Lediglich in den jeweiligen positiven Kontrollreaktion unter Verwendung der GSP-Primer (vgl. Kapitel 2.2.12), war bei beiden 5 RACE-Untersuchungen ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 224 bp bzw. 136 bp in erkrankten Ebereschen zu beobachten. In den symptomlosen Ebereschen wurde dagegen kein PCR-Produkt nachgewiesen. Das Ergebnis einer solchen RACE-Analyse ist beispielhaft für den Klon V272_33 in Abb. 37 dargestellt.



Abb. 37: 5'Race-Untersuchungen unter Verwendung des Klon V272_33 spezifischen Primers 401_LP für die Reverse Transkription

In den Spuren 1-4 sind die PCR-Produkte der erkrankten Eberesche aufgetragen und in den Spuren 5-8 die PCR-Produkte der symptomlosen Eberesche. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur M1: pUC Mix 8 (MBI); Spur 1, 5: 5'Race-PCR; Spur 2, 6: Kontroll-PCR mit der spezifischen GSP-Primern; Spur 3, 7: Kontroll-PCR unter alleiniger Verwendung des Universal Primermix von Clontech; Spur 4, 8: Kontroll-PCR unter alleiniger Verwendung des GSP-Primer 1; Spur 9: Wasserkontrolle. Der Pfeil gibt die Größe des PCR-Produktes an.

Im Rahmen der 5'RACE-Untersuchungen unter Verwendung des Primers 195_UP wurde jedoch, aufgrund einer unerwarteten zweiten Primerbindungsstelle dieses Primers (vgl. Kapitel 3.13) ein ca. 1512 bp großes PCR-Produkt amplifiziert (Abb. 38), das bei der gemeinsamen Verwendung der Primer 401_LP und 195_UP nicht nachgewiesen werden konnte (vgl. auch Abb. 36). In der symptomlosen Eberesche wurde dagegen erneut keine Amplifikation nachgewiesen.



Abb. 38: Amplifikation eines 1,5 kb großes PCR-Fragmentes durch alleinigen Einsatz des Klon V272_33 spezifischen Primers 195_UP Spur 1 und 2: erkrankte Eberesche

Spur 3 und 4: symptomlose Eberesche

Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur M1: pUC Mix 8 (MBI); Spur 1, 3: PCR mit dem Primer 195_UP; Spur 2, 4: Kontroll-PCR mit dem Primerpaar 195_UP/4012:LP; Spur 5: Wasserkontrolle. Die Pfeile geben die Größen der PCR-Produkte an. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromidgefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

Das ca. 1512 bp große PCR-Produkt der 5'-RACE wurde direkt in den Vektor "pCR[®]2.1-TOPO[®]" (Invitrogen) kloniert. Die Auswertung des Blau-Weiß Screenings ergab ein Verhältnis von 12 weißen zu 1 blauen Kolonien. Es wurden erneut zunächst M13-PCR-Untersuchungen durchgeführt, um die Größen der Inserts zu bestimmen (Abb. 39). Insgesamt wurden dabei 30 rekombinante Klone in der M13-PCR getestet. Das gesuchte PCR-Fragment konnte jedoch nur in einem der Klone (Klon V492_21) nachgewiesen werden (Abb. 39, Spur 1). Von den übrigen Klonen wiesen 16 ein Insert mit Größen zwischen 300 und 600 bp auf während sich die restlichen Klone als falsch-positiv erwiesen und kein Insert trugen.



Abb 39: Überprüfung der Größe der Inserts von weißen TOPO-TA Klonen durch eine PCR mit Vektor-spezifischen M13-Primern und Auftrennung der PCR-Produkte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

Spur M: DNA-Molecular weight marker IIIλ/*Eco*RI, *Hind*III (MBI);

Spur 1-9: PCR mit weißen TOPO-TA-Klonen; Spur 10: PCR mit einem blauen TOPO-TA-Klon; Spur 11: Wasserkontrolle. Auf der rechten Seite ist die Größen des 1,5 kb großen Fragments inklusive MCS angegeben.

3.10.1 Sequenzierung des Klons V492_21

Ein Vergleich der Sequenzen der Klone V492_21 und V272_33 unter Verwendung des Lasergene 1997 Programmes ergab eine Homologie der V492_21 Forward-Sequenz mit dem Klon V272_33 von 467 bp, beginnend an der Bindungsstelle für den 195_UP Primer (Abb. 40). Die Kombination aus den Klonen V492_21 und V272_33 ergab ein Fragment von 1754

bp, das als Alignment_1 bezeichnet wurde. Auch die Reverse-Sequenz des Klons V492_21 wies eine Homologie zum Klon V272_33 auf, die sich allerdings auf die Primer-Bindungsstelle des 195_UP Primers beschränkte. Der Nachweis der 195_UP-Primersequenz in beiden Sequenzreaktionen bestätigte die zweite Primerbindungsstelle des 195_UP Primers im Genom des Viruses, die im folgenden als 195_UP* bezeichnet wurde.

Da der Klon V492_21 mit den vektorspezifischen Primern nicht vollständig sequenziert worden war, wurde ein weiteres Primerpaar (472_UP/506_UP) abgeleitet, um das fehlende Zwischenstück zu amplifizieren. Die Lage der neuen Primer ist in Abb. 40 dargestellt.



Abb. 40: Übersicht über die Homologie zwischen den Klonen V272_33 und V492 21 sowie die Lage der Primer auf den einzelnen Klonen.

Der Einsatz des Primerpaares 472_UP/506_UP in der Kontroll-Gradienten-PCR ergab ein deutliches PCR-Produkt mit einer erwarteten Größe von 521 bp (Abb. 41).



Abb. 41: Überprüfung der Primerspezifität des Primerpaares 472_UP/506_UP auf dem Plasmid des Klons V492_21 durch eine Gradienten-PCR

Spur M: pUC Mix 8 (MBI); Spur 1: Annealingtemperatur: 48,2 °C; Spur 2: Annealingtemperatur: 49,6 °C; Spur 3: Annealingtemperatur: 50,7 °C; Spur 4: Annealingtemperatur: 52,6 °C; Spur 5: Annealingtemperatur: 53,5 °C; Spur 6: Annealingtemperatur: 54,9 °C; Spur 7: Wasserkontrolle Die Größe des PCR-Produktes ist auf der rechten Seite angegeben. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

Das PCR-Produkt wurde im Anschluß an die Gradienten-PCR mit Hilfe der Primern 472_UP und 506_UP ansequenziert, wodurch die Sequenzlücke im Klon V492_21 geschlossen werden konnte.

Durch den Sequenzvergleich des Alignment_1 mit der Datenbank (NCBI Blast Search und EMBL Fasta3) wurden auf der Proteinebene zahlreiche kurze Hinweise zu verschiedenen viralen Proteinen gefunden, wobei viele der Hinweise zu viralen Polyproteine und der RNAabhängige RNA-Polymerase gehörten. Allerdings wiesen diese Proteine unterschiedliche Leserahmen und Orientierungen auf dem Alignment_1 auf. Eine Homologie des Alignments_1 zu dem Klon V283_2/1 konnte mit dem Lasergene Programm 1997 nicht nachgewiesen werden. Die Sequenz des Alignment_1 ist im Anhang dargestellt (Abb. 63).

3.11 RT-PCR zur Verbindung des Alignments_1 mit dem Klon V283_2/1

Um zu überprüfen, ob der Klon V283_2/1 auf dem gleichen RNA-Molekül lokalisiert ist wie das Alignment_1 wurde versucht, den Klon V283_2/1 und das Alignment_1 durch eine RT-PCR-Reaktion miteinander zu verbinden. Vom Klon V283_2/1 wurde die bereits getesteten Primer 2/1_4UP und 2/1_120LP für diese Untersuchung verwendet. Vom Alignment_1 wurde hierfür, nach der Testung vieler verschiedener neuer Primerkombinationen, das Primerpaar 519 LP /195 UP verwendet, durch das ein eindeutiges PCR-Produkt mit einer erwarteten Größe von 538 bp in der Gradienten-PCR amplifiziert wurde (Abb. 42). Auch in der nachfolgenden RT-PCR-Untersuchung wurde, unter Verwendung des 519 LP Primer für die Reverse Transkription, ein Produkt dieser Größe in der Blattprobe der erkrankten Eberesche amplifiziert, während kein Produkt in Blattproben symptomloser Ebereschen nachgewiesen wurde (Abb. 43). Die Spezifität des PCR-Produktes wurde anschließend durch Southern-Blot-Analysen mit der Dig-markierten DNA-Sonde des Klons V492_21 bestätigt, wobei das erwartete PCR-Produkt ausschließlich in der erkrankten Eberesche nachgewiesen wurde (Abb.43). Das mit dem Primern 519 LP/195 UP amplifizierte Produkt korrelierte damit eindeutig mit den erkrankten Ebereschen. Die Lage des Primers 519_LP auf dem Klon V492 21 ist in der Abb. 44 dargestellt.



Abb. 42: Überprüfung der Spezifität des Primerpaares 195_UP/519_LP in einer Gradienten-PCR

Als Template wurde das Plasmid des Klons V492_21 verwendet. Spur M: pUC Mix 8 (MBI); Spur 1: Annealingtemperatur 56,4 °C; Spur 2: Annealingtemperatur 57,4 °C; Spur 3: Annealingtemperatur 58,5 °C; Spur 4: Annealingtemperatur 59,9 °C; Spur 5: Annealingtemperatur 60,7 °C; Spur 6: Annealingtemperatur 61,3 °C; Spur 7: Wasserkontrolle Der Pfeil auf der rechten Seite gibt die Größe des PCR-Produktes an. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.



Abb. 43: Überprüfung der Spezifität des Primerpaares 195_UP/519_LP durch RT-PCR mit Gesamt-RNA aus einer erkrankten und symptomlosen Ebereschen und anschließende Southern-Blot-Analyse

A) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

B) Southern-Blot-Analyse der PCR-Produkte mit der Dig-DNA-Sonde des Klons V492_21.

Spur M: pUC Mix 8 (MBI); Spur M1: Dig-DNA-Molecular weight marker pUCBM21 VIII/*HpaII*, *DraI* und *Hind*III (Roche); Spur 1: Kontroll-PCR mit dem Plasmid V492_21; Spur 2: erkrankte Eberesche; Spur 3: symptomlose Eberesche. Der Pfeil gibt die Größe des PCR-Produktes an und markiert die Lage des entsprechenden Hybridisierungssignals



Abb. 44: Übersicht über die Lage des Primers 519_LP auf dem Klon V492_21

Für die Alignment-PCR wurden (vgl. Kapitel 2.2.11) entsprechend der beiden Orientierungsmöglichkeiten der Klone V272 33 und V283 2/1 zueinander die Primerkombinationen 2/1_120LP und 519_LP sowie 401LP und 2/1_4UP verwendet (vgl. Abb. 34 und 44). Doch nur unter Verwendung der Primerkombination 2/1 120LP/519 LP konnte ein Alignment-PCR-Produkt von ungefähr 2,6 kb in der erkrankten Eberesche amplifiziert werden (Abb. 45). In keiner der beiden Untersuchungen wurde in symptomlosen Ebereschen ein PCR-Produkt durch die Alignment-PCR amplifiziert. Mit allen verschiedenen Primerkombinationen war es jedoch möglich, in den Kontroll-Untersuchungen eindeutige PCR-Produkte der jeweils erwarteten Größe in den erkrankten Ebereschen zu amplifizieren.



Abb. 45: RT-PCR zur Amplifikation des potentiellen Verbindungsstückes zwischen dem Klon V283_2/1 und dem Alignment_1

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1% Agarose-TBE Gel. Spur M: DNA-Molecular weight marker λEco 91I (MBI); Spur M1: pUC Mix 8 (MBI); Spur 1. Alignment-RT-PCR, erkrankte Eberesche; Spur 2: Alignment-RT-PCR, symptomlose Eberesche; Spur 3. Kontroll-RT-PCR mit dem Primerpaar 2/1_4UP/2/1_120LP, erkrankte Eberesche; Spur 4: Kontroll-RT-PCR mit dem Primerpaar 2/1_4UP/2/1_120LP, symptomlose Eberesche; Spur 5: Kontroll-RT-PCR mit dem Primerpaar 195_UP/519_LP, erkrankte Eberesche; Spur 6: Kontroll-RT-PCR mit dem Primerpaar 195_UP/519_LP, symptomlose Eberesche; Spur 7: Wasserkontrolle Die Pfeile auf der rechten Seite zeigen die Größen der PCR-Produkte an.

3.11.1 Klonierung und Sequenzierung des ca. 2,6 kb großen PCR-Produktes

Das ca. 2,6 kb große Produkt wurde mit dem "TOPO-TA Cloning[®]" Kit kloniert und anschließend analysiert. Das Blau-Weiß Screnning ergab ein Verhältnis von 5 weißen zu 1 blauen Kolonie. Es wurden 11 rekombinante Klone in der M13-PCR getestet, von denen aber nur ein Klon (V571_10) das PCR-Produkt beinhaltete (Abb. 46). Die übrigen weißen Klonen erwiesen sich als falsch-positiv.



Abb. 46: Überprüfung der Insert-Größen rekombinanter TOPO-TA Klone durch PCR mit Vektor-spezifischen M13-Primern

Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur 1-11: rekombinante TOPO-TA-Klone; Spur 12: blauer TOPO-TA-Klon; Spur 13: Wasserkontrolle. Der Pfeil zeigt die Größe des 2,6 kb großen Inserts inklusive der MCS an. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

Die Sequenzierung des Klons V571_10 wurde mit den M13-Primern durchgeführt. Ein Vergleich der Forward- und Reverse-Sequenzen mit dem Alignment_1 ergab, daß die Reverse-Sequenz des Klons V571_10 zum Alignments_1 in einem Bereich von der Primerbindungstelle des 519_LP Primer bis zum 5'-Ende des Alignment_1 homolog war (Abb. 47). Auch in der Forward-Sequenz konnte eine Primerbindungsstelle für den Primer 519_LP beobachtet werden (vgl. Kapitel 3.13), allerdings zeigten sich keine Übereinstimmungen mit dem Klon V283_2/1. Somit wurde durch die Alignment-RT-PCR zwischen den Klonen V272_33 und V283_2/1 zwar ein größeres cDNA-Fragment gewonnen, aufgrund einer unerwarteten zweiten Primerbindungsstelle des 519_LP Primers war jedoch kein Verbindungsstück zwischen den beiden Klonen amplifiziert worden. Die zweite Primerbindungsstelle wurde im folgenden als 519_LP* bezeichnet.

Da bei der Sequenzierung nicht die gesamte Sequenz des Klons V571_10 gewonnen worden war, wurden erneut Primer abgeleitet um den Klon V571_10 schrittweise zu sequenzieren. Jedes Primerpaar wurde in der Gradienten-PCR auf seine Bindungsspezifität gegenüber dem Klon V571_10 überprüft und dann in der Sequenzierung eingesetzt. Unter Verwendung des Primerpaares 358_10R/473_10F, dessen Lage auf dem Klon V571_10 in Abb. 48 dargestellt ist, konnte ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 1808 bp amplifiziert werden (Abb. 48).



Abb. 47: Übersicht über die Homologie zwischen dem Klone V571_10 und dem Alignment_1, sowie die Lage der Primer auf dem Klon V571_10



Abb. 48: Gradienten-PCR zur Überprüfung der Spezifität des Primerpaares 358_RP/473_FP, Als Template wurde das Plasmid des Klons V571_10 verwendet. Spur M: DNA-Molecular weight marker IIIλ/*Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur 1: Annealingtemperatur 54,1 °C;

Spur M: DNA-Molecular weight marker IIIA/EcoRI, HindIII (MBI); Spur I: Annealingtemperatur 54,1 °C; Spur 2: Annealingtemperatur 55,4 °C; Spur 3: Annealingtemperatur 56,6 °C; Spur 4: Annealingtemperatur 57,9 °C; Spur 5: Annealingtemperatur 59,4 °C; Spur 6: Wasserkontrolle. Der Peil zeigt die Größe des PCR-Produktes an. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

Die Sequenzen, die mit den Primern 358_10R und 473_10F erhalten wurden, wiesen die erwarteten Homologien zu den bereits bekannten Bereichen des Klons V571_10 auf. Darüber hinaus war es mit diesen Primern gelungen, ein weiteres Stück der Sequenz des Klones V571_10 zu erhalten.

Mit einem weiteren Primerpaar (410_10F /411_10R), dessen Lage auf dem Klon V571_10 in Abb. 49 dargestellt ist, konnte in der Gradienten-Kontroll-PCR ein weiteres Fragment mit einer erwarteten Größe von 927 bp amplifiziert werden (Abb. 50).



Abb. 49: Übersicht über die Lage der Primer vom Klon V571_10.



Abb. 50 : Gradienten-PCR zur Überprüfung der Spezifität des Primerpaares 410_10F/411_10R

Als Template wurde das Plasmid des Klons V751_10 verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

Spur M: DNA Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur 1: Annealingtemperatur 53,7 °C; Spur 2: Annealingtemperatur 55,0 °C; Spur 3: Annealingtemperatur 56,4 °C; Spur 4: Annealingtemperatur 57,8 °C; Spur 5: Annealingtemperatur 59,1 °C; Spur 6: Annealingtemperatur 60,9 °C; Spur 7: Annealingtemperatur 61,8 °C; Spur 8: Wasserkontrolle. Der Pfeil zeigt die Größe des PCR-Produktes an.

Eine Analyse der Sequenzen die mit den Primern 410_FP und 411_RP erhalten worden waren, ergab eine Homologie zwischen den beiden Sequenzen über 503 bp. Entsprechend der Erwartung wies die Sequenz 410_FP mit der bereits vorhandenen Sequenz des Klon V571_10 eine Homologie über 249 bp beginnend an der Primerbindungsstelle für den Primer 410_FP auf. Dagegen konnte keine Homologie der 411_RP-Sequenz zur den bereits bekannten Bereichen des Klones V571_10 nachgewiesen werden. Da zu vermuten war, daß die fehlende Übereinstimmung auf Sequenzungenauigkeiten beruhte, wurden noch einmal Primer von dem Klon V571_10 (1485_FP und 1596_FP) abgeleitet, deren Lage in Abb. 51 dargestellt ist. Diese Primer wurden jeweils mit dem Primer 358_RP in einer Gradienten-PCR getestet. In beiden Fällen wurden die erwarteten Fragmentgrößen von 808 bp (358_RP/1485_FP) bzw. 692 bp (535_RP/1596_FP) erhalten (Abb. 52).



Abb. 51: Schematische Darstellung der Lage der Primer auf dem Klon V571_10



Abb. 52: Gradienten-PCR zur Überprüfung der Primerspezifität der Primerpaare 1596_UP/358_UP und 1485_UP/358UP

Spur 1-5: Primerpaar 1596_UP/358_UP; Spur 6-10: Primerpaar 1485_UP/358UP Als Template wurde das Plasmid des Klons V571_10 verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem Ethidiumbromid gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel. Spur M: DNA Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur 1 und 6: Annealingtemperatur 52,5 °C; Spur 2 und 7: Annealingtemperatur 53,7 °C; Spur 3 und 8: Annealingtemperatur 55,0 °C; Spur 4 und 9: Annealingtemperatur 56,4 °C; Spur 5 und 10: Annealingtemperatur 57,8 °C; Spur 11: Wasserkontrolle. Die Pfeile zeigen die Größe der PCR-Produkte an.

Durch die Sequenzen, die mit den Primer 1485_FP und 1596_FP gewonnen worden waren, konnte die Sequenzierung des gesamten Klons V571_10 erfolgreich abgeschlossen werden. Die gesamte korrigierte Sequenz aus dem Alignment_1 und dem Klon V571_ 10 wies eine Länge von 3838 bp auf und wurde als Alignment_2 bezeichnet.

Ein Vergleich des Alignment_2 auf der Proteinebene mit der NCBI Blast Search Datenbank ergab eine Homologie des 5'-Endes auf der Proteinebene über 2168 nt (von Nukleotid 178 bis 2346) zu der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) des Bunyamwera Virus (BUNYW, Bunyaviren), TSWV und anderen Vertretern der Bunyaviren sowie einigen Vertretern der Influenza A Viren und dem Marburg Filovirus, während keine Hinweise auf pflanzenspezifische Proteine gefunden wurden. Allerdings erstreckte sich der Homologiebereich zu den RdRP der Influenzaviren nur über 134 (Influenza A Virus A/Beijing 11/56, IAME8; Accession Nr. P16507) bzw. 303 (Influenza A Virus Strain A/Memphis 8/88, IABEI; Accession Nr. P16502) Nukleotide. Auch ein Vergleich des Alignment_2 mit der EBML Fasta3 Datenbank ergab eine deutlich Homologie des 5'-Endes zur RdRP, wobei in dieser Datenbank neben TSWV ausnahmslos Hinweise auf Bunyaviren gefunden wurden. Die höchste Homologie lag dabei in beiden Datenbanken zwischen der RdRP des Bunyamwera Viruses (BUNYW, Bunyaviren; Accession Nr. P20470) und dem Alignment_2. Sie betrug 27 % bei den identischen Aminosäuren und 44% bei den identischen und sich entsprechenden Aminosäuren. Zu der RdRP vom TSWV (Accession Nr. P28976) wurde eine Homologie von 26 % (bzw. 42 %) gefunden, während die Homologien zu den übrigen RdRP der Bunyaviren zwischen 19-23 % (bzw. 37-40 %) lagen. Zu der RdRP der Influenza A Viren, die zu der Gruppe der Orthomyxoviren gehören, lagen die Homologien dagegen nur bei 19-22 % bei den identischen Aminosäuren. Zusammen mit den sich entsprechenden Aminosäuren wurden jedoch Übereinstimmungen bis zu 48 % erreicht. In allen Fällen wiesen die gefundenen RdRPs einen Leserahmen von + 1 auf.

Der nachgewiesene Homologiebereich zwischen dem Alignment_2 und der RdRP von BUNYW liegt ungefähr in der Mitte der RdRP von BUNYW (von Nukleotid 2736 bis zum Nukleotid 4566) und ist bei TSWV etwas zum 3'-Ende verlagert (von Nukleotid 3474 bis zum Nukleotid 5094). In der nachfolgenden Abb. 53 sind die Homologien des Bunyamwera Viruses und des TSWV sowie zweier Influenza A Viren (IABEI, Accession Nr. P16502 und IAME8 Accession Nr. P16507), die in der Datenbank gefunden wurden, zu der Proteinsequenz des Alignment_2 dargestellt.

K-Se	equenz:SSTKSMVSNSVPDMSIKDCNLNKNIDVIQLERYIDTSLISDPMKYITLMNNSIES	INQER
TSWV1	SSKKCSQSNIISTDEIIECLQDAKIQDIENWKGNNLAIIKGLIRTYNEEKNRLVEFFEDN	3474
K-Sequenz	:LLIYKDKLNKGIVLLPKLILTTF-KGKSFIGLENHYYTKLVSGDYIKQTNTK-	512
TSWV1	:CVNSLYLIEKLKEIISSGSITVGKSVTSKFIRNNHPLTVETYLKTKLYYRNNVTVLKSKK	3654
BUNYW	: DYISVK-	2736
K-Sequenz	:VFDEFYRLTDEIQEEKLRGFYKGYITEGDLL	605
TSWV1	:VSEELYDLVKQFHDMMEIDLDSVMNLGKGTEGKKLTFLQMLEFVMSKAKNVTGSVDFL	3828
BUNYW	:VFDRLYELLKNGVLTDKPFIELAMEMMKNHKEFS	2828
IABEI	: VTKKMVTQRTIGKKKQRLNKRSYL	657
IAME8	: MTKKMVTQRTIGKKKQRVNKRSYL	657
K-Sequenz TSWV1 BUNYW IABEI IAME8 K-Sequenz TSWV1 BUNYW IABEI IAME8	:VRIFNKDQRTTDDREIYTGNAQVRLCLYPLEMTFKSICKKIPEEAITISGDQK :VSVFEKMQRTKTDREIYLMSMKVKMMLYFIEHTFKHVAQSDPSEAISISGDNK :FTFFNKGQKTAKDREIFVGEFEAKMCMYVVERISKERCKLNTDEMISEPGDSK :IRALTLNTMTKDAERGKLKRRAIATPGMQIRGFVYFVETLARSICEKLEQSGLPVGGNEK :IRALTLNTMTKDAERGKLKRRAIATPGMQIRGFVYFVETLARSICEKLEQSGLPVGGNEK :QRKLLEQRLALIKTKRQ-FNKSGYKTEI-YSVSSDASKWSARDLLP-KFIISIA :IRALSTLSLDTITSYNDILNKNSKKSRL-AFLSADQSKWSASGLTTYKYVLAII :L-KILEKKAEEEIRYIVERTKDS-IIKGDPSKALKLEINADMSKWSAQDVFY-KYFWLIA :KAKLANVVRKMMT-NSQDTEISFTITGDNTKWN-ENQNP-RMFLAVI	764 3987 2987 837 917 4146 3158 969 969
K-Sequenz	TN-PYLTSDEKYFLVYLLVRYYD-KKIVLTDS-AFSNALRFSREDINGKYEE	1067
TSWV1:	LN-PILTTGEASLMIECILMYVKLKKVCIPTD-IFLN-LRKAQQTF-GENETAIGL	4305
BUNYW	M-DPILYPAEKTRILYFMCNYMQ-KLLILPDD-LIANILDQKRPYNDDLILE	3308
IABEI	TYITRNQPEWFRNILSIAPIMFSN-KMARLGKGYMFESKSMKLRTQISAE	1116
IAME8	TYITKNQ	990
K-Sequenz	:MTNNFTQNWFNVRSNWLQGNLNMTSSFVHHCSTIMTDTLLSISAKHNGFEA	1220
TSWV1	:LTKGLTTNTYPVSMNWLQGNLNYLSSVYHSCAMKAYHNTLEC	4431
BUNYW	:MTNGLNYNYVQIKRNWLQGNFNYISSYVHSCAMLVYKDILKECMKLLDGDC	3461
EABEI	:MLANIDLKYFNDSTRKKIEKIRPLLIDGTASLSPGMM	1227
K-Sequenz	:VMTSMVHSDDSTYDFLIAKNSKTSSYINNEANMGRFIISLITYSNKKHCITL	1376
TSWV1	:YKNCDFQTRWIVHSDDNATSLIASGEVDKMLTDFSSSSLPEMLFRSIEAHFKSFCITL	4605
BUNYW	:LN-SMVHSDDNQTSLAIIQN-KVSDQIVIQYAANTFESVCLTFGC	3593
K-Sequenz	:NEKKTYISTFYKEFLSTTIVSNELFFFYMADLMPISSDTSYKSPLEDLASYTGYINNS	1550
TSWV1	:NPKKSYASSSEVEFISERISKWSDYSSLLQAFSKLLHRIFAYKLFDDLMSLSIHVTML	4779
BUNYW	:QANMKKTYITHTCKEFVSLFNLHGEPLSVFGRFLLPSVGDCAYIGPYEDLASRLSAAQQS	3773
K-Sequenz	:FSHACPIQILKCAITLLNHLTLSTYNMQYTSEKNPRCNIPNSTDLPIQIYPRY	1709
TSWV1	:LRKGCPNEVIPFAYGAVQVQALSIYSM-LPGEVNDSIRIFNKLGVSLKSNEIPTNMGGWL	4953
BUNYW	:LKHGCPPSLVWLAISCSHWITFFTYNMLDDQINAPQQHLPFNNRKEIPVELNGYL	3938
K-Sequenz	:KLPLSLAGCIPYYSSDAYYNILDDIIKTLEKNKVIKNSLLE-DVIDDETLDEY	1865
TSWV	:TSPIEPLSILGPSSNDQIIYYNVIRDFLNKKSLEEVKDSVSSSSYLQ	5094
BUNYW	:NAPLYLIALVGLEAGNLWFLINILKKLVPLDKQKETIQSQCLHLCNSIDKLTESE-	4106
K-Sequenz	:ITLVNKQKPEYAKYIQACLLTMDYTQYERDDEDPYNIVCYDLSQKSIINVASINKGSRIK	2045
BUNYW	:KFKLKILRYLTLD-TEMSVDNNMGETSDMRSRSLLTPRKFTTLGSLN	4247
K-Sequenz	:KTYTYKKYLENETDIRLTCSVNPMWCISKPKDEVLIKNPILANYMNPNFKDSLIF	2202
BUNYW	:KLVSYNDFRSSLDDQRFTDNLNFMLNNPELLVTKGENKEQFMQSVLFRYNSKRFKESLSI	4425
K-Sequenz BUNYQ	SKSALDYGRRIIGSNKSMDTLSSHAFEKEKKQGIKTIYKKLDDKISTV 2346 QNPAQLFIEQILFSHKPIIDYSS-IFDKLTSLAEADIIEELPEIIGRV 4566	

Abb. 53, Seite 98: Übersicht über die Protein-Homologie zwischen dem Alignment_2 und den RNAabhängigen RNA-Polymerasen von BUNYW, TSWV sowie zweier Influenza A Viren (IAME 8 und IABEI).

Die K-Sequenz entspricht dem Alignment_2. Die Zahlen auf der rechten Seite zeigen die Nukleotid-Positionen an. Identische und sich entsprechende Aminosäuren sind grau hinterlegt. Durch Analyse des Alignment_2 mit dem Computerprogramm DNASIS konnten keine Startbzw. Stoppcodons oder weitere Leserahmen in dem Alignment_2 nachgewiesen werden. Es wurden auch keine Hinweise auf die RdRP-typischen konservierten Sequenzen der Viren mit einem dsRNA- bzw. Plusstrang-RNA-Genom gefunden. Bei einem Vergleich des Alignment_2 mit den konservierten Motiven der Viren mit einem Minusstrang-RNA-Genom, konnte dafür ein konserviertes Aspartat-Aspartat Motiv (DD-Motiv) an der Position 1331 nt-1332 nt nachgewiesen werden. Dieses Motiv ist in eine Sequenz aus 7 Aminosäuren eingebettet (MVHSDDS), die eine hohe Homologie zu der entsprechenden Sequenz von BUNYW (MVHSDDN), bzw. TSWV (IVHSDDN) aufweist.

Am 3'-Ende des Alignment_2 (Nukleotid 2169-3838) konnten in den Datenbanken 9 kurze Hinweise auf virale Proteine gefunden werden, von denen 4 zu pflanzenpathogenen Viren gehörten. Es handelte sich dabei ausnahmslos um das Polyprotein von vier Potyviren (zwei Barley Yellow Mosaic Virus Isolate, das Plum Pox Virus und das Tobacco Etch Virus). Die gesamte Sequenz des Alignment_2 ist im Anhang dargestellt (Abb. 64). Die Abb. 54 gibt einen Überblick über die Lage sämtlicher Primer. Die genauen Positionen der Primer sind der nachfolgenden Tabelle 5 zu entnehmen. Die genaue Lage der RdRP auf dem Alignment_2 sowie die Lage der Klone ist in Abb. 55 dargestellt.



Abb. 54: Lage der Primer auf dem Alignment_2. Zweite Bindungsstellen eines Primers sind durch einen Stern markiert.

Tabelle 5: Übersicht über die Positionen der virusspezifischen Primer auf dem

Alignment_2	2.
-------------	----

Primer	Position angegeben in nt
519_LP*	1-20
473_FP	471-491
411_FP	913-932
1485_FP	1471-1488
1596_FP	1582-1600
410_RP	1821-1848
195_UP*	2084-2104
358_RP	2261-2279
472_UP	2565-2583
519_LP	2620-2638
506_UP	3028-3047
401_LP	3322-3339
195 UP	3526-3545



Abb. 55: Übersicht über die Lage der RdRP-Homologie auf dem Alignment_2, sowie die Anordnung der Klone.

Auf der Basis des Alignment_2 wurden unter Verwendung des, nahe dem 5'-Endes gelegenen Primers 358_RP erneut 5'Race-Analysen durchgeführt doch auch mit diesem Primer war es nicht möglich das 5'-Ende der viralen RNA zu amplifizieren.

3.13 Untersuchung der zweiten Primerbindungsstellen

Ein Vergleich der Sequenz des gesamten Alignment_2 mit der Primersequenz des Primers 195_UP bestätigte die zweite Bindungsstelle an der Position 2048 nt-2104 nt, die durch die RACE-Analysen gefunden worden war. Jedoch wies der Primer 195_UP an dieser Stelle keine 100 % Übereinstimmung mit dem Alignment_2 auf. Vielmehr konnte eine Abweichung von 4 Basen am 5'-Ende der Primersequenz auf der Ebene des Alignment_2 nachgewiesen werden (Abb. 56).

Primer 195_UP: 5'-CTC AAC TGT GGG GCA TAA TC-3' Alignment_2 : 3'-ATC CCA TGT GGG GCA TAA TC-5' Abb. 56: Vergleich der Sequenz des Alignment_2 an der zweiten

Primerbindungsstelle (2048nt -2104 nt) des Primers 195_UP mit der Primer Sequenz dieses Primers. Die abweichenden Basen sind grau hinterlegt.

Eine Überprüfung der Primersequenz des Primers 519_LP mit dem Alignment_2 war nicht möglich, da die zweite Primerbindungsstelle am 5'-Ende des Alignment_2 lag und nicht durch eine weitere Sequenzierung, die über diese Bindungsstelle hinausging, überprüft worden war.

3.14 Northern-Blot-Analysen mit den Dig-markierten RNA-Sonden der Klone V492_21 und V571_10 und gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA aus Blattproben

Von den Klonen V492_21 und V571_10 wurden Dig-markierte RNA-Sonden hergestellt und in Northern-Blot-Analysen mit Gesamt-RNA aus Blätter erkrankter und symptomloser Ebereschen auf ihre Virus-Spezifität getestet. Eine Übersicht über die Lage aller verwendeten RNA- und DNA-Sonden ist im Anhang (Kapitel 7.3, Abb. 65) dargestellt. Die Ergebnisse der Northern-Blot-Analysen sind in Abb. 57 dargestellt. Mit beiden Sonden konnten nur in den Blattproben der erkrankten Ebereschen RNA-Banden detektiert werden, während kein Nachweis von RNA-Banden in den Blattproben symptomloser Ebereschen beobachtet wurde. Die RNA-Muster unterschieden sich dabei allerdings geringfügig. So konnten mit der Klon V492_21 spezifischen RNA-Sonden sieben RNA-Banden von ungefähr 7,6 kb, 3,4 kb, 2,5 kb, 2,3 kb 1,4 kb/Doppelbande und 1,3 kb detektiert werden (Abb. 57B), während mit der Klon V571_10 spezifischen RNA-Sonde (Abb. 57D) nur fünf RNA-Banden nachgewiesen wurden (7,6 kb, 2,5 kb, 2,3 kb, 1,4 kb/Doppelbande und 1,3 kb). Mit diesen beiden RNA-Sonden war es damit zum ersten Mal möglich, für alle dsRNA-Banden, die bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Probe von Breitnau (vgl. Abb. 18A) beobachtet worden waren, entsprechende RNA-Banden in der Gesamt-RNA erkrankter Ebereschen nachzuweisen. Nur die ungefähr 3,4 kb große RNA-Bande, die mit der RNA-Sonde vom Klon V492_21 detektiert werden konnte (Abb. 57B), war zuvor noch in keinem Versuch beobachtet worden. Ein Nachweis einer 1,2 kb großen RNA-Banden war nicht möglich.

Die schwachen Signale der Kontroll-PCR-Produkte in den dargestellten Northern-Blot-Analysen beruhen auf der geringeren Hybridisierungsstärke zwischen der verwendeten RNA-Sonde und dem PCR-Produkt.



Abb. 57: Northern-Blot-Analyse mit Gesamt-RNA einer erkrankten und einer symptomlosen Eberesche A und C) Gelelektrophoretische Auftrennung der Proben in einem denaturierenden 1,5 % Mops-Formaldehydgel.

B) Northern-Blot-Analyse mit der RNA-Sonde vom Klon V492_21

D) Northern-Blot-Analyse mit der RNA-Sonde vom Klon V571_10

Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (MBI); Spur M1: Dig-DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco*RI, *Hind*III (Roche); Spur 1: erkrankte Eberesche; Spur 2: symptomlose Eberesche; Spur 3: positive Kontrolle: A) PCR-Produkt des Klons V492_21 und B) PCR-Produkt des Klons V571_10. Die schwarzen Pfeile auf der rechten Seite markieren die detektierten RNA-Banden. Um eine optimale Darstellung des Markers und der RNA-Banden zu erzielen wurden unterschiedliche Expositionszeiten gewählt. Die weißen Pfeile zeigen die Größen der Kontroll-PCR-Produkte an.

3.15 RT-PCR-Untersuchungen mit der Gesamt-RNA aus Blattproben von Ebereschen verschiedener Standorte in Deutschland.

Es wurden RT-PCR-Untersuchungen zum Nachweis des Viruses in Blättern von Ebereschen verschiedener Standorte in Deutschland durchgeführt. Hierfür wurden die beiden Primerpaare 401_LP/195_UP und 519_LP/195_UP verwendet (Vgl. Abb. 34 und 44). Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abb. 58 dargestellt. Die Erntetermine der einzelnen Proben sind aus der Tabelle 2 zu entnehmen. Mit beiden Primerpaaren konnte ein PCR-Produkt der entsprechenden Größe (224 bp bzw. 538 bp) in allen Blattproben der erkrankten Ebereschen nachgewiesen werden, während in keiner symptomlosen Eberesche ein PCR-Produkt amplifiziert wurde.



Abb. 58: RT-PCR- Nachweis virusspezifischer PCR-Produkte in den Blattproben erkrankter Ebereschen von verschiedenen Standorten in Deutschland

A) RT-PCR unter Verwendung des Primerpaares 401_LP/195_UP

B) RT-PCR unter Verwendung des Primerpaares 519_LP/195_UP

Spur 2-7: erkrankte Ebereschen; Spur 8-11: symptomlose Ebereschen

Spur M: pUC Mix 8 (MBI); Spur 1: Kontroll-PCR mit dem Plasmid von Klon V272_33 (A) bzw. Klon V492_21 (B) Spur 2: Tarpenbeker Wanderweg, Hamburg; Spur 3: Rfö. Klövensteen, Hamburg; Spur 4: Insel Amrum, Schleswig-Holstein; Spur 5: Rfö. Hahnheide, Schleswig-Holstein; Spur 6. Fa Breitnau, Baden-Württemberg; Spur 7: Grunewald, Berlin; Spur 8: Rfö. Klövensteen, Hamburg; Spur 9: Insel Amrum, Schleswig-Holstein; Spur 10: Fa. Breitnau, Baden-Württemberg; Spur 11: Grundwald, Berlin; Spur 12: Wasserkontrolle. Die Pfeile zeigen die Größen der PCR-Produkte an. Die Spurennummerierung in Abb. 56B entspricht den vorhandenen Standorten. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1 % Agarose TBE-Gel.

3.16 Northern-Blot-Analysen mit der RNA-Sonde vom Klon V492_21 Gesamt-RNA aus einer Rindenprobe

Neben den Northern-Blot-Analysen mit der Gesamt-RNA aus Blattproben wurden Untersuchungen zum Auftreten der, in Blättern nachgewiesenen RNA-Banden, in Rindenproben erkrankter Ebereschen durchgeführt. Für die Analyse wurden die RNA-Sonde des Klons V492_21 sowie Gesamt-RNA aus einer Rindenprobe vom 04.05.2000 verwendet. Das Ergebnis der Hybridisierung ist in Abb. 59 dargestellt. Es konnten fünf virusspezifische RNA-Banden von etwa 7,6 kb, 2,3 kb, 1,4 kb (Doppelbande) und 1,3, kb in der Gesamt-RNA der Rindenprobe der erkrankten Eberesche nachgewiesen werden, die zuvor schon in den Northern-Blot-Analysen mit der Gesamt-RNA aus Blättern erkrankter Ebereschen (Kapitel 3.14) zu beobachten gewesen waren. In der symptomlosen Ebereschen wurde dagegen keine RNA in detektiert.



Abb. 59: Northern-Blot-Analyse mit Gesamt-RNA aus der Rinde einer erkrankten Eberesche A) Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA in einem 1,5 % Mops-Formaldehydgel B) Northern-Blot-Analyse mit der Dig-markierten RNA-Sonde des Klon V492_21.

Spur M: DNA-Molecular weight marker III λ /*Eco* RI, *Hind*III (MBI); Spur M1: Dig-DNA-Molecular weight marker λ *Eco* 91I (Roche); Spur 1: erkrankte Eberesche, Spur 2: symptomlose Eberesche; Spur 3: positive Kontrolle (PCR-Produkt vom Klon V571). Die Pfeile zeigen die Größen der RNA-Banden an.

4. Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurde mit molekularbiologischen Methoden die Annahme, daß es sich bei dem Erreger der Ebereschenringfleckigkeit um ein Virus handelt, überprüft und versucht, die Natur des unbekannten Virus näher zu charakterisieren. Durch die Kenntnis des Agens ist es möglich Diagnoseverfahren zu entwickeln, die einen schnellen und sicheren Nachweis besonders in Baumschulmaterial ermöglichen. Dies ist im Hinblick auf die lange Kultivierung sowie die ökologische Nutzung der Eberesche von Bedeutung. Solche Diagnoseverfahren können dann auch dazu dienen, Aufklärung über die Übertragungswege und die natürliche Verbreitung des Virus, sowie seine Bedeutung zu schaffen.

4.1 Isolierung von doppelsträngiger RNA (dsRNA)

Für die Etablierung der dsRNA-Isolierungsmethode aus Ebereschen wurden die Methode von FÜHRLING (1994) verwendet, da diese bereits für die Isolierung von dsRNA aus Blättern erkrankter Eichen und Ebereschen verwendet worden war. Es hatte sich bereits in Vorversuchen gezeigt, daß mit dieser Methode jedoch nur sehr geringe Mengen an dsRNA, deren Nachweis durch Ethidiumbromid-Färbung nicht möglich war, aus Blättern erkrankter Ebereschen isoliert werden. Zudem wurde eine starke Kontamination durch einzelsträngige RNA (ssRNA) beobachtet. Die eigenen Untersuchungen bestätigen damit die Ergebnisse von FÜHRLING (1994), wonach ebenfalls nur geringe dsRNA-Konzentrationen aus den Blättern erkrankter Ebereschen isoliert werden konnten, deren deutliche Darstellung sogar nur unter Anwendung des Immunoblotting-Verfahrens im Anschluß an die gelelektrophoretische Auftrennung möglich war. Als Ursache für die geringe dsRNA-Ausbeute nennt die Autorin eine hohe Polysaccharid-Konzentration in den Ebereschenblättern, die in den eigenen Aufarbeitungen bestätigt werden konnten. Nach THOMSON und DIETZGEN (1995) sowie DONG und DUNSTAN (1996) kann ein hoher Gehalt an Polysacchariden und Polyphenolen durch die Bindung an Nukleinsäure und die Bildung eines unlöslichen Komplexes eine Isolierung erschweren. Zudem erhöht der Polysaccharidgehalt die Viskosität des Pflanzenpreßsaftes und beeinträchtigt dadurch Anbindung und Elution von dsRNA an die Cellulose (MORRIS und DODDS, 1979). Die Methode von FÜHRLING (1994) wurde daher schrittweise modifiziert, um die störende Oxidation von Polyphenolen, den hohen Gehalt an Polysacchariden und die ssRNA-Kontamination zu beseitigen. Die Entnahme von Stichproben im Verlauf der aufeinander folgenden Schritte der Aufarbeitung von Ebereschenblättern und die Überprüfung durch gelelektrophoretische Auftrennung hatte gezeigt, daß die Konzentration an ssRNA auch nach dem Einsatz der RNase T₁ gleich blieb.

Es wurde daher zunächst versucht, die Kontamination durch die einzelsträngige RNA zu verringern. Der Austausch der RNase T₁ durch die wesentlich aggressivere RNaseA, die in den Untersuchungen von RENNECKE (1998) erfolgreich bei der Isolierung von dsRNA aus Gehölzen eingesetzt worden war, führte jedoch zu keiner Verringerung der ssRNA-Kontamination. Erst durch die von FALK und TSAI (1984) sowie COFFIN und COUTTS (1992) vorgeschlagene Verlagerung des Verdaus an das Ende der Aufarbeitung, konnte eine Abnahme der ssRNA-Kontamination bei Ebereschen beobachtet werden. Um eine Reduktion der Schleimstoffe und Polyphenole zu erzielen, wurden verschiedene Parameter verändert. Während so die Oxidation der Polyphenole durch einen Zusatz von Polyvinylpyrrolidon (PVP), welches Polyphenole unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken in größeren unlöslichen Komplexen bindet, verhindert werden konnte, erwies sich die Entfernung der Schleimstoffe als schwieriger. Eine Erhöhung des Homogenisierungspuffer-Volumens, wie von DODDS et al. (1984) vorgeschlagen, um die Viskosität des Pflanzenpreßsaftes zu reduzieren, brachte keinen Erfolg. Nach MORRIS und DODDS (1979) und JELKMANN et al. (1992) kann jedoch auch eine Erhöhung der Cellulose-Konzentration zu einer Verbesserung der dsRNA-Ausbeute aus Pflanzenmaterial mit einem hohen Polysaccharidgehalt führen. So war es JELKMANN et al. (1992) möglich, mit der dsRNA-Isolierungsmethode von MORRIS und DODDS (1979) aus 20 g Blattmaterial eines ASPV (Apple stem pitting Foveavirus)-infizierten Apfelbaumes, nach Erhöhung des Cellulose-Anteils auf 2,5g Cellulose/20 g Blattmaterial, dsRNA in hoher Konzentration zu isolieren. Um den störenden Einfluß der Polysaccharide zu reduzieren, erhöhten die Autoren zudem die Anzahl der Cellulose-Waschschritte, bis die Cellulose keine störenden Schleimstoffe mehr erkennen ließ. In den eigenen Untersuchungen wurde daher ebenfalls der Cellulose-Anteil erhöht und die Anzahl der Cellulose-Waschschritte entsprechend der Angaben von JELKMANN et al. (1992) variiert. Erst durch diese genannten Modifikationen (Modifikation 4: Verwendung von PVP, der RNaseA und einer höheren Cellulosemenge sowie die Verlagerung des RNA- und DNA-Verdaus) war es möglich, gelelektrophoretisch nachweisbare Konzentrationen an dsRNA aus den Blättern erkrankter Ebereschen ohne eine durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbare Kontamination durch ssRNA zu isolieren (vgl. Kapitel 3.2.3, Abb. 14).

Die doppelsträngige Struktur der dsRNA wurde dabei eindeutig durch ihre Stabilität gegenüber der Einwirkung der RNaseA in einer 300 mM MgCl₂-Lösung bestätigt. Jedoch war die dsRNA-Konzentration noch immer sehr gering, was vermutlich auf einen nach wie vor störenden Einfluß der hohen Schleimstoffkonzentration zurückzuführen war. So beobachteten

MORRIS und DODDS (1979) ebenfalls eine Beeinträchtigung der dsRNA-Isolierung aus Rosen, Wein und Kirsche aufgrund eines hohen Gehaltes an Polysacchariden und auch DODDS et al. (1984) sowie MAIB et al. (1987) weisen auf allgemein geringe Ausbeuten der aus Rosengewächsen isolierten dsRNA, aufgrund hoher Polysaccharid-Konzentrationen im Pflanzenpreßsaft, hin. Durch die Methode von LAULHERE und ROZIER (1976), die bereits erfolgreich von REZAIAN et al. (1991) für die Isolierung von dsRNA aus Weinreben (Vitis vinifera L.) verwendet worden war, konnte jedoch der störende Polysaccharidgehalt aus dem Eberschenblatt-Homogenat entfernt werden. Diese Methode zeichnet sich durch die Verwendung einer hohen SDS-Konzentration aus. SDS ist ein deproteinierendes Agens, das die Freisetzung von Nukleinsäure aus Proteinkomplexen unterstützt (DODDS et al., 1984). Durch den Zusatz einer hohen SDS-Konzentration zum Homogenisierungspuffer kann auf die Verwendung von Phenol verzichtet werden, wodurch die Isolierung von RNA allgemein effektiver sein soll (NEWBURY und POSSINGHAM, 1979; REZAIAN und KRAKE, 1987; REZAIAN et al., 1990). Die hohe Konzentration von 3 % (f. c.) SDS führte in den eigenen Untersuchungen zu einer Erhöhung der Dichte des Homogenates, was die effektive Abtrennung einer viskosen, schleimstoffreichen Phase von dem wäßrig-organischen Homogenat im Anschluß an die erste Zentrifugation ermöglichte. Durch eine Kombination dieser Methode mit der Modifikation 4 der Methode von FÜHRLING (1994) konnten alle die dsRNA-Isolierung fördernden Maßnahmen vereinigt werden, wodurch eine reproduzierbare und effektive dsRNA-Isolierung aus Blättern erkrankter Ebereschen erzielt wurde (vgl. Kapitel 3.2.3, Abb. 15). Eine Isolierung von dsRNA aus einer Tabak/Ebereschen-Mischprobe hatte zudem gezeigt, daß die Konzentration der TMV-dsRNA aus der Tabak/Ebereschen-Mischprobe nicht signifikant gegenüber der TMV-dsRNA-Konzentration aus einer parallel aufgearbeiteten Tabak-Einzelprobe reduziert war. Eine weitere Beeinträchtigung der dsRNA-Isolierung durch den Pflanzenpreßsaft lag somit nicht vor. In keiner Aufarbeitung konnte dsRNA in symptomlosen Ebereschen nachgewiesen werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die dsRNA aus erkrankten Ebereschen weder endogener Natur ist, noch von cryptischen virus-ähnlichen Partikeln herrührt. Der Nachweis von dsRNA in erkrankten Ebereschen ist somit ein eindeutiges Indiz für die virale Natur des Ebereschen-Agens und bestätigt die Eignung der etablierten Methode zur dsRNA-Isolierung aus den polysaccharid- und polyphenolreichen Ebereschenblättern. Die Konzentration der isolierten dsRNA war jedoch insgesamt sehr gering. Doch auch KEIM-KONRAD und JELKMANN (1996) konnten in Untersuchungen zum Nachweis von dsRNA in Kirschen der Varietät 'Sam', welche mit dem Virus der Kleinfrüchtigkeit (Little cherry Closterovirus, LChV)

infiziert waren, nur weniger als 50 ng dsRNA/5 g Blattmaterial isolieren. Über sehr niedrige dsRNA-Ausbeuten berichten auch MENG et al. (1998). Danach lag die dsRNA-Konzentration, die aus der Rinde von Weinreben isoliert wurde, welche mit dem Grapevine rupestris stem pitting associated virus-1 infiziert waren, am Rande der Nachweisgrenze Ethidiumbromid-gefärbter Gele. Als eine Erklärung für die geringe dsRNA-Konzentration ist der allgemein niedrige Virustiter in den Geweben holziger Wirtspflanzen zu nennen, der den Virusnachweis insgesamt erschwert (ROWHANI et al. 1995, BÜTTNER et al., 1996, WERNER et al., 1997 und 1997a). So hatte schon der Versuch zur dsRNA-Isolierung aus der Tabak/Ebereschen-Mischprobe gezeigt, daß die Konzentration der Ebereschen-dsRNA im Vergleich zur TMV-dsRNA wesentlich geringer war, was einen niedrigen Virustiter des Ebereschenviruses andeutet. Auch DALE et al. (1986) diskutieren eine geringe virale Replikationsrate als Ursache für die Isolierung sehr kleiner dsRNA-Mengen. Demnach war der gelelektrophoretische Nachweis von dsRNA aus virus-erkrankten Bananenstauden nur möglich, wenn mindestens 75-100 g des infizierten Gewebes für die Isolierung verwendet wurden. Nach GERMAN et al. (1992) kann eine niedrige dsRNA-Konzentration aber auch auf der geringen dsRNA-Synthese durch ein Virus beruhen. Die Autoren nennen dies als Ursache für die geringe dsRNA-Ausbeute vom cholorotischen Ringflecken Virus des Apfels (Apple chlorotic leaf spot Trichovirus, ACLSV) aus Chenopodium quinoa. DODDS et al. (1987) berichten von Unterschieden in der dsRNA-Konzentration des Citrus Tristeza Closterovirus (CTV), die aus verschiedenen holzigen Wirtspflanzen isoliert wurden. Die Unterschiede in der dsRNA-Konzentration korrelierten dabei mit dem jeweiligen Virustiter, der durch ELISA-Untersuchungen bestimmt wurde, und spiegelten die Anfälligkeit der Wirtspflanze wider. Generell kann eine geringe Anfälligkeit der Wirtspflanze gegenüber einem Virus zu einer Verringerung der Viruskonzentration in Gehölzen führen (FUCHS et al., 1993). Untersuchungen hierzu erfolgten unter anderen an Pflaumen- sowie Aprikosen- und Pfirsichsorten, die mit PPV durch Pfropfung infiziert waren (ALBRECHTOVÁ et al., 1989, POLÁK et al., 1997). In den eigenen Untersuchungen konnten ebenfalls Schwankungen in der dsRNA-Ausbeute beobachtet werden, die allerdings zwischen Ebereschen von unterschiedlichen Standorten in Deutschland auftraten. Die Eberesche zeichnet sich jedoch durch eine große genetische Heterogenität aus, die sich in einer Vielzahl von Unterarten und nicht eindeutig voneinander unterschieden sind, Kultursorten. die widerspiegelt (Pressemitteilung SDW, 1997). Allerdings zeigten Untersuchungen von Isoenzym-Mustern nur schwache genetische Unterschiede innerhalb einer Ebereschenpopulation (RASPÉ und JACQUEMART, 1998). Nach RASPÉ et al. (2000) beruht dies auf einem wesentlich höheren
Grad an Genfluß bei Ebereschen im Vergleich zu anderen Bäumen. So beobachteten die Autoren in Untersuchungen zur Variation in der Chloroplasten-DNA von Ebereschen unterschiedlicher Standorte, daß die einzelnen geographisch getrennten Ebereschenpopulationen Cluster hinsichtlich ihrer Chloroplasten-DNA bilden. Aufgrund dieser genetischen Heterogenität ist es daher nicht auszuschließen, daß die Unterschiede in der dsRNA-Ausbeute aus Ebereschen von verschiedenen Standorten auf einer unterschiedlich starken Anfälligkeit der verschiedenen Bäume beruht. Generell kann auch aufgrund der unregelmäßigen Verteilung von Viren in holzigen Pflanzen (BÜTTNER, 1994, FUCHS und GRÜNTZIG, 1994, BÜTTNER et al., 1996) die dsRNA-Ausbeute verringert werden, doch wurde versucht dieser Beeinflussung durch die Verwendung von großen Mischproben unterschiedlicher Astpartien entgegen zu wirken. DODDS et al. (1987) diskutierten weiterhin auch den Effekt des Erntezeitpunktes auf die dsRNA-Ausbeute. Nach Angaben der Autoren spielt der Erntezeitpunkt eine entscheidende Rolle bei der effektiven Isolierung von dsRNA. So konnten aus Rinde CTV-infizierter Weinreben in den Monaten Mai bis Oktober keine oder nur sehr geringe dsRNA-Konzentrationen isoliert werden, während die dsRNA-Ausbeute in den Monaten November bis April wesentlich höher war. Ein ähnlicher Akkumulations-Verlauf konnte auch in den eigenen Untersuchungen zum Nachweis dsRNA in Rindenproben erkrankter Ebereschen (vgl. Kapitel 3.5, Abb. 19) beobachtet werden (BENTHACK et al., 2000). Auch hierbei konnten, in einem Untersuchungszeitraum von März bis Juni, aus den Mai- und Juni-Proben nur sehr geringe dsRNA-Konzentrationen im Vergleich zu den Märzund Aprilproben isoliert werden. Die Ergebnisse einer kontinuierlichen dsRNA-Isolierung aus Ebereschenblättern in einem vergleichbaren Untersuchungszeitraum zeigten dagegen einen Anstieg der dsRNA-Konzentration bis Anfang Mai und eine nachfolgende Abnahme ab Anfang Juni (vgl. Kapitel 3.3, Abb. 17). Es ist zu vermuten, daß der Konzentrationsverlauf der dsRNA in den Blattproben mit der Entwicklung des Viruses korreliert ist. So ist zum Beginn der Vegetationsperiode mit einer sich verstärkenden Virusreplikation zu rechnen, während zum Ende der Vegetationsperiode eine Abnahme der Virusreplikation sowie der verstärkte Zusammenbau von Viruspartikeln zu einer Verringerung der dsRNA-Konzentration führen könnten. Ein Einfluß des Erntezeitpunktes auf die Konzentration isolierter dsRNA konnte somit für Ebereschen bestätigt werden. In den folgenden Aufarbeitungen wurden daher vornehmlich Blattproben verwendet, die in einem Zeitraum von Ende April bis Mitte Mai geerntet wurden. In den eigenen Untersuchungen wurde neben dem Einfluß des Erntezeitpunktes auch ein Einfluß des Gesamtzustandes der Eberesche auf die dsRNA-Ausbeute beobachtet. So wurde im Zuge der Isolierung von dsRNA aus Blättern von

Ebereschen verschiedener Standorte in Deutschland beobachtet, daß die dsRNA-Ausbeute bei stärkerer Gesamt-Schädigung des Baumes geringer war als bei Bäumen mit weniger starker Schädigung (vgl. Kapitel 3.4, Abb. 18 und Tabelle 2). Dieses Ergebnis war zudem unabhängig vom Erntemonat. So wurde in der Untersuchung von 1999 die höchste dsRNA-Konzentration aus Blättern erkrankter Ebereschen von Standort Breitnau (Ernte: Juni) isoliert, die keine Degenerationserscheinungen aufwiesen. Aus Blättern der degenerierten, erkrankten Ebereschen vom Standort Amrum (Ernte: Mai), konnte dagegen keine dsRNA isoliert werden. In den Untersuchungen aus dem Jahr 2000 verhielt es sich dagegen genau umgekehrt. Der Gesamtzustand des Baumes scheint somit einen stärkeren Einfluß auf die Isolierung von dsRNA zu haben als der Erntezeitpunkt.

Als weitere Ursache für die geringe Konzentration an dsRNA in den Blattproben ist eine mögliche Phloemlimitierung des Ebereschenviruses zu nennen. Um dies zu überprüfen, wurde versucht, dsRNA aus Rindenproben erkrankter und symptomloser Ebereschen zu isolieren, da bei einem Phloem-limitierten Virus eine höhere Konzentration von dsRNA in Rindenproben der erkrankten Pflanze und nicht in den Blattproben zu erwarten ist. So isolierten MENG et al. (1998), VIVES et al. (1999) und SABANADZOVIC et al. (2000) erfolgreich virale dsRNA in hoher Konzentration aus der Rinde von Weinreben, die mit den Phloem-limitierten Viren CTV, GFkV (Grapevine Fleck Virus) oder RSPaV-1 (Rupestris Stem Pitting associated Virus-1) infiziert waren. Die dsRNA-Isolierung aus Ebereschenrinde war ebenfalls erfolgreich, jedoch war die Menge der isolierten dsRNA eher niedriger als bei Blattgroben. Es ist daher zu vermuten, daß das Ebereschenvirus in den Mesophyllzellen des Blattgewebes und nicht im Phloem lokalisiert ist (vgl. Kapitel 4.2).

4.2 Das dsRNA-Muster aus Blatt- und Rindenproben erkrankter Ebereschen

Insgesamt wurden in allen Untersuchungen zum Auftreten von dsRNA in Blattproben erkrankter Ebereschen 7 dsRNA-Moleküle von ca. 7,6 kb, 2,5 kb, 2,3 kb, 1,4 kb (Doppelbande), 1,3 kb und 1,2 kb gelelektrophoretisch nachgewiesen (vgl. Kapitel 3.4, Abb. 18). Durch Northern-Blot-Analysen mit der RNA-Sonde des virusspezifischen Klons V492_21 (vgl. Abb. 56) konnten, mit Ausnahme der 1,2 kb großen dsRNA-Bande, allen dsRNA-Molekülen jeweils entsprechende RNA-Moleküle in der Gesamt-RNA von Blättern erkrankter Ebereschen zugeordnet werden. Es ist daher anzunehmen, daß alle dsRNA bzw. RNA-Banden zu dem putativen Virus gehören. Die 1,4 kb große dsRNA-Doppelbande war zuvor bereits von FÜHRLING (1994) in den Blattproben erkrankter Ebereschen beobachtet worden, während die Längen der übrigen dsRNA-Banden nicht mit den Ergebnissen von FÜHRLING (1994) übereinstimmten. So wurden von FÜHRLING (1994) in verschiedenen erkrankten Ebereschen unterschiedliche dsRNA-Muster aus drei dsRNA-Banden über 3,9 kb, sowie dsRNA-Banden von 2,0 kb, 1,9 kb 1,6 kb oder 1,5 kb und einige niedermolekulare dsRNA-Banden unter 1,4 kb gefunden.

Ein Vergleich der dsRNA-Muster aller erkrankten Ebereschen der eigenen Untersuchungen zeigte, daß in Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen und Northern-Blot-Analysen nur die ca. 2,3 kb, 1,4 kb/Doppelbande sowie die ca. 1,3 kb große dsRNA-Bande in allen Blattproben nachzuweisen waren. Die ca. 7,6 kb und 2,5 kb großen dsRNA-Banden traten zwar in allen untersuchten Monaten (April-Juni) auf, konnten aber nicht in allen Proben nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, daß sie permanent in den Blättern der erkrankten Ebereschen vorliegen, ihre Konzentration jedoch Schwankungen unterworfen ist und die gelelektrophoretische Darstellung aus diesem Grund nicht in allen Proben möglich war. Dies wird besonders deutlich im Fall der ca. 7,6 kb großen dsRNA-Bande, die in den verschiedenen Proben nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit sehr unterschiedlichen Konzentrationen beobachtet werden konnte. Solche Schwankungen sind auch von anderen Virus-Wirts-Kombinationen bekannt. So beobachten KAUFMANN et al. (1992) starke Schwankungen im Auftreten der 6-7 kb großen RNA 1 (bzw. ihrer dsRNA) des bodenbürtigen Rübenviruses (Beet Soil Born Furovirus, BSBV). Ihre Konzentration war gegenüber weiteren kleineren dsRNA-Molekülen, im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel, oft wesentlich geringer und lag teilweise unterhalb der Nachweisgrenze.

Die ca. 2,5 kb große dsRNA-Bande aus Ebereschen wies dagegen eine insgesamt sehr niedrige Konzentration auf, die oft am Rande der Nachweisgrenze eines Ethidiumbromidgefärbten Agarosegeles lag. Und auch in Northern-Blot-Analysen war der Nachweis einer entsprechenden RNA-Bande nicht immer möglich, was auf eine sehr niedrige Konzentration des entsprechenden RNA-Moleküls hindeutet. Nach VALVERDE et al. (1986) können Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen dsRNA-Molekülen bei einer insgesamt niedrigen dsRNA-Ausbeute dazu führen, daß schwächer konzentrierte dsRNA-Moleküle gelelektrophoretisch nicht mehr dargestellt werden können. DODDS et al. (1987) beobachteten zudem Unterschiede in den dsRNA-Mustern verschiedener Stämme von CTV. Ähnliche Beobachtungen werden auch von PARES et al. (1992) bei verschiedenen Isolaten des Gurkenmosaik Viruses (Cucumber Mosaic Cucumoviurses, CMV) gemacht. Das Auftreten verschiedener Stämme des Ebereschenviruses ist ebenfalls nicht auszuschließen. Zwar wurden keine signifikanten Unterschiede in den dsRNA-Mustern der Ebereschen von den verschiedenen Standorten in Deutschland beobachtet, jedoch können sich zwei Stämme

eines Viruses schon durch den Austausch weniger Aminosäuren unterscheiden. Es ist jedoch nicht anzunehmen, daß eventuell vorhandene Stämme des Ebereschenvirus für das unterschiedliche Auftreten der ca. 7,6 kb und 2,5 kb großen dsRNA-Banden verantwortlich sind. Denn während der Vielzahl der durchgeführten dsRNA-Isolierungen traten diese Banden in jeder untersuchten erkrankten Eberesche irgendwann einmal auf. Im Gegensatz zu diesen beiden dsRNA-Banden konnte die ca. 1,2 kb große dsRNA-Bande nur in den Blattproben von drei erkrankten Ebereschen gelelektrophoretisch nachgewiesen werden. Da dieser dsRNA-Bande in keiner der Northern-Blot-Untersuchungen ein entsprechendes RNA-Molekül eindeutig zugeordnet werden konnte, ist ihre Zugehörigkeit zum Genom des Ebereschenviruses fraglich. FÜHRLING (1994) diskutierte die in Blattproben erkrankter Ebereschen nachgewiesenen dsRNA-Moleküle kleiner 1,4 kb als replikative Formen von Satelliten RNAs. Satelliten RNAs weisen keine Homologie zu dem Genom ihres Helfervirus auf (MATTWHES, 1991), zeichnen sich aber dadurch aus, daß es bei ihrer Anwesenheit häufig zu Symptomverstärkung bzw. Symptomvariation an der erkrankten Wirtspflanze kommt. So beobachteten XU und ROOSSINCK (2000), daß es bei einer Infektion von Tomaten durch CMV bei Anwesenheit der Satelliten RNA D zu einer letalen Nekrose kam, während bei ihrer Abwesenheit keine letalen Symptome zu verzeichnen waren. Die erkrankten Ebereschen aus dem Klövensteen, in denen die 1,2 kb große dsRNA-Bande auftrat, unterschieden sich jedoch in der Ausprägung ihrer Symptome nicht von anderen erkrankten Ebereschen. Die Herkunft dieser dsRNA-Bande bleibt somit zu klären.

Im Gegensatz zu den Schwankungen, die in den dsRNA-Mustern verschiedener Blattproben beobachtet wurden, konnte in den untersuchten Rindenproben ein konstantes dsRNA-Muster nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.5, Abb. 19). Dieses zeigte, wie das dsRNA-Muster der Blattproben, dsRNA-Banden von ca. 7,6 kb, 2,5 kb und 2,3 kb Länge. Durch Northern-Blot-Analysen mit der RNA-Sonde des Klons V492_21 konnten zudem in Rindenproben zusätzlich noch eine ca. 1,4 kb RNA-Doppelbande sowie eine ca. 1,3 kb große RNA-Bande nachgewiesen werden. Durch diese Ergebnisse ist eine, aufgrund der verschiedenen Symptomausprägungen (chlorotische Ringflecke und chlorotische Scheckung), von FÜHRLING und BÜTTNER (1998) diskutierte Mischinfektion der Eberesche durch zwei Viren unwahrscheinlich. In der gelelektrophoretischen Auftrennung der dsRNA aus Rinde traten außerdem aber auch zwei niedermolekulare dsRNA-Moleküle (1,1 kb und 0,9 kb) auf, die in den Blattproben nicht beobachtet werden konnten. Die Tatsache, daß diese Banden in den Northern-Blot-Analysen mit der RNA-Sonde des Klons V492_21 in der Gesamt-RNA aus Rindenproben erkrankter Ebereschen nicht nachgewiesen werden konnten, läßt vermuten,

daß sie nicht dem Ebereschenvirus zu zuordnen sind. Trotz der verschiedenen Symptomausprägungen an erkrankten Ebereschen ist anzunehmen, daß diese niedermolekularen dsRNA-Banden nicht zu einem zweiten Virus gehören. Denn in der Plant Viruses oneline Datenbank (1998) konnte kein Pflanzenvirus mit einem derart kleinen Genom gefunden werden. Die Herkunft dieser beiden dsRNA-Banden bleibt somit ebenso zu klären wie die Ursache für das Auftreten "blattspezifischer" dsRNA-Moleküle in den Rindenproben. Es ist zu vermuten, daß letzteres auf deren Transport im Phloem beruht. Der Phloemtransport ist eine notwendige Voraussetzung für die systemische Verbreitung eines Virus. Bis heute ist jedoch wenig über den Mechanismus des Phloemtransportes von Viren bekannt (SÉRON und HAENNI, 1996). COHEN et al. (2000) vermuten jedoch, daß Viren entweder als intakte Partikel oder aber in Form der Nukleinsäure in das Phloem transportiert werden, wobei häufig das Hüllprotein an diesem Transport beteiligt sein soll. So weiß man von einigen Viren wie z. B. TMV, daß die virale Nukleinsäure zusammen mit dem Hüllprotein als Nukleoprotein-Komplex im Phloem vorliegt (DING et al., 1996, RYABOV et al., 1999). Nach Angaben der Autoren kann dabei auch die virale dsRNA am Nukleoprotein-Komplex beteiligt sein. Zudem ist für Viroide, die eine dsRNA-artige Struktur aufweisen, der Transport in das Phloem am Beispiel des Potato Spindel Tuber Viroid (PSTVd) bewiesen (STARK-LORENZEN et al., 1997). Da Viroide für keine eigenen Proteine kodieren, wird dabei ein Mechanismus angenommen, der auf der Struktur des Viroids beruht und durch die Wirtspflanze vermittelt wird (ZHU et al., 2001). Es ist daher durchaus denkbar, daß auch virale dsRNA auf ähnliche Weise in das Phloem transportiert werden kann.

Der Nachweis von dsRNA in Blatt- und Rindenproben erkrankter Ebereschen ist ein starkes Indiz für die virale Natur des Agens der Eberesche. Eine Zuordnung des Ebereschenviruses zu einer Virusgruppe oder einem spezifischen Virus auf der Basis dieser isolierten dsRNA-Muster war jedoch nicht möglich. Vielmehr stellte die große Anzahl an nachgewiesenen dsRNA-Molekülen ein unerwartetes Ergebnis dar. Außer den Phytoreoviren, die ein dsRNA-Genom aus 10-12 Molekülen aufweisen, besitzen die meisten Virusgruppen (z. B. die Clostero-, Poty-, Tymo-, Tobamo- oder Nepoviren) entweder wenige große genomische RNA-Moleküle, von denen dann einige kleinere subgenomische RNAs (in der Regel 1-4) gebildet werden können. Oder sie weisen ein multipartites Genom aus durchschnittlich drei genomischen RNA-Molekülen zwischen 2 kb und 4 kb auf (z. B. Bromoviren, Cucumoviren oder Hordeiviren) (Plant Viruses oneline Datenbank, 1998). Eine Ausnahme stellen allerdings die Closteroviren dar. So besitzt das CTV ein monopartites Genom von ca. 19 kb, von dem neun kleinere subgenomische RNAs gebildet werden (MAWASSI et al., 1995). Es ist jedoch

wenig wahrscheinlich, daß es sich bei dem Ebereschenvirus um einen Vertreter der Closteroviren handelt, da diese entweder ein monopartites Genom deutlich über 10 kb aufweisen (z. B. CTV) oder aber ein bipartites Genom mit zwei RNA-Molekülen zwischen 7-8,5 kb besitzen (z. B. Lettuce Infectious Yellows Virus). Zudem sind Closteroviren phloemlimitiert. Geht man davon aus, daß keine Mischinfektion in der Eberesche vorliegt, wofür die Ergebnisse der Northern-Blot-Analysen mit der RNA-Sonde des Klons V492_21 sowie die weitgehende Übereinstimmungen der dsRNA-Muster in den Blatt- und Rindenproben sprechen, so ist die hohe Anzahl von dsRNA-Banden unverständlich. Jedoch berichten viele Autoren (CONDIT und FRAENKEL-CONRAD, 1979, DAWSON und DODDS, 1982, ZELCER et al., 1981, GILDOW et al., 1983) von unerwarteten zusätzlichen niedermolekularen dsRNA-Banden, die in der gelelektrophoretischen Auftrennung isolierter dsRNA bekannter Viren reproduzierbar neben der replikativen Form (RF) der genomischen RNAs nachgewiesen wurden. So konnten GARGOURI et al. (1989) in ihren Untersuchungen am Turnip Yellow Mosaic Tymovirus, (TYMV) niedermolekulare dsRNA-Moleküle nachweisen, die nicht mit den bekannten subgenomischen RNA-Molekülen korrelierten. DODDS und BAR-JOSEPH (1983) berichten ebenfalls von dem unerwarteten Auftreten mehrerer niedermolekularer dsRNA-Moleküle bei der gelelektrophoretischen Analyse der dsRNA von CTV, und KAUFMANN et al. (1992) wiesen auf die Anwesenheit zusätzlicher niedermolekularer dsRNA-Moleküle bei BSBV hin. In Untersuchungen von VALVERDE et al. (1986) wurde ein dsRNA-Muster von TMV U5 beschrieben, das aus 7 dsRNA-Banden bestand, von denen nur vier den bekannten subgenomischen RNAs sowie der genomischen RNA von TMV zugeordnet werden konnten. Bei gleichen Untersuchungen mit dem TMV Typ-Stamm konnten die Autoren dagegen nur drei dsRNA-Moleküle im Polyacrylamidgel nachweisen, wobei lediglich die RF der genomischen RNA in beiden Untersuchungen übereinstimmten. In Untersuchungen von ZELCER et al. (1981) wurden vier dsRNA-Banden des TMV U1-Stammes, isoliert aus Tabakpflanzen der Varietät Samsun, in einem Polyacrylamidgel beobachtet. Ihre Größen unterschieden sich, mit Ausnahme der RF, von Ergebnissen von VALVERDE et al. (1986). DAWSON und DODDS (1982) konnten sogar 13 TMV U₁-dsRNA-Banden aus Nicotiana tabacum var. Xanthi isolieren, die nachweislich keine Extraktionsartefakte darstellten. Da sowohl DAWSON und DODDS (1982) sowie ZELCER et al. (1981) den gleichen TMV-Stamm, jedoch unterschiedliche Wirtspflanzen verwendet haben, deutet dies einen Einfluß der Wirtspflanze auf die Anzahl der dsRNA-Moleküle an. Auch in den eigenen Untersuchungen zur Isolierung von TMV-dsRNA aus Tabakpflanzen konnten mehr dsRNA-Moleküle nachgewiesen werden, als aufgrund der Genomorganisation

und Replikationsstrategie von TMV zu erwarten waren. Es ist somit nicht auszuschließen, daß auch das dsRNA-Muster des Ebereschenvirus mehr dsRNA-Banden aufweist, und sich die Genomstruktur bzw. Replikationsstrategie des Ebereschenviruses darin nicht genau widerspiegelt.

Nach DODDS et al. (1988) ist jedoch eine Charakterisierung eines Pflanzenviruses anhand der in der Gelelektrophorese beobachteten dsRNA Haupt-Banden möglich. Diese dsRNA-Moleküle würden dem viralen ssRNA-Genom in Größe und Anzahl entsprechen (DODDS et al., 1988, DODDS und BAR-JOSEPH, 1983, FALK und TSAI, 1984, VALVERDE et al. 1986, DODDS et al., 1987, GERMAN et al., 1992, JELKMANN et al., 1992, KAUFMANN et al., 1992). DODDS und BAR-JOSEPH (1983) wiesen zusätzlich auch den niedermolekularen dsRNA-Molekülen einen diagnostischen Wert zu. Demnach kann bei bekannten Viren durch die dsRNA Haupt-Banden, die den RFs der jeweiligen genomischen RNAs entsprechen, eine Einteilung des Virus in eine Virusgruppe erzielt werden. Die niedermolekularen dsRNA-Banden, die z. T. keine entsprechende ssRNA aufwiesen, seien dagegen spezifisch für jedes einzelne Virus. So konnten bei drei verschiedenen Closteroviren (Beet Yellow Virus, BYV; Carnation Necrotic Ringspot Virus, CNFV; und CTV) durch die Anwesenheit der RF der genomischen RNA die Zuordnung der Viren zu der Gruppe der Closteroviren erzielt werden. Durch die niedermolekularen dsRNA-Banden war es zudem möglich, die drei Viren zu unterscheiden. Nach DODDS und BAR-JOSEPH (1983) stammen diese niedermolekularen dsRNA wahrscheinlich von subgenomischen RNAs ab und könnten daher als "Fingerabdruck" eines Virus angesehen werden. Nach VALVERDE et al. (1986) kann anhand der niedermolekularen dsRNA-Banden sogar die Unterscheidung verschiedener Virus-Stämme erfolgen. Die Charakterisierung eines unbekannten Viruses anhand des dsRNA-Musters sei jedoch nur im Vergleich mit den dsRNA-Mustern bekannter Viren möglich. In den eigenen dsRNA-Isolierungen und Northern-Blot-Untersuchungen von Blattund Rindenproben erkrankter Ebereschen war die ca. 7,6 kb große dsRNA bzw. RNA-Bande die größte, die hier nachgewiesen werden konnte. Es ist daher zu vermuten, daß es sich um die Replikative Form einer genomischen RNA des Ebereschenviruses handelt. Angaben über die Natur der restlichen dsRNA-Moleküle sind jedoch rein spekulativ. Aufgrund der Northern-Blot-Analysen mit der RNA-Sonde des Klons V492_21 ist allerdings anzunehmen, daß die niedermolekularen dsRNA-Moleküle von dem 7,6 kb großen RNA Molekül abstammen, was für ein monopartites Genom des Ebereschenvirus sprechen würde. Es könnte sich bei den niedermolekularen dsRNA-Banden also ebenfalls um subgenomische RNA-Moleküle handeln. Dagegen ist es fraglich, ob die niedermolekularen dsRNA-Moleküle oder

ein Teil von ihnen die replikativen Formen von defekten RNA-Molekülen (D-RNA) darstellen. Bei den D-RNAs handelt es sich um RNA-Moleküle, die von einer genomischen viralen RNA stammen, sich aber in ihrer Größen von dieser unterscheiden. MAWASSI et al. (1995) untersuchten verschiedene CTV-Stämme auf die Anwesenheit von D-RNAs. Die Autoren konnten bei den verschiedenen Stämmen Unterschiede in der Anzahl und Größe der auftretenden D-RNAs beobachten, die zudem in Abhängigkeit der Wirtspflanze variierten. In wie weit D-RNAs einen Teil der niedermolekularen dsRNAs des Ebereschenvirus ausmachen, bleibt zu klären. Da bei allen untersuchten kranken Ebereschen jedoch ein konstantes dsRNA-Muster beobachtet werden konnte, würde die Anwesenheit von D-RNAs dafür sprechen, daß es sich bei allen Isolaten um denselben Virusstamm handeln muß. Dies ist jedoch aufgrund der sehr unterschiedlichen Herkunft der Isolate aus ganz Deutschland eher unwahrscheinlich. Andererseits ist es aufgrund der genetischen Heterogenität der Eberesche auch wenig wahrscheinlich, daß alle Isolate des Ebereschenvirus ein identisches D-RNA-Muster aufweisen.

DAWSON et al. (1976) vermuten dagegen die Anwesenheit von "Sollbruchstellen" in der RF, die zum Auftreten niedermolekularer dsRNA-Moleküle führen können. Die Autoren diskutieren solche Sollbruchstellen in der RF von TMV als Erklärung für die niedermolekularen dsRNA-Moleküle des Tabak Mosaik Viruses. Demnach verursachte die Homogenisierung des Pflanzenmaterials im Zuge der dsRNA-Isolierung das reproduzierbare Zerbrechen der RF. CZARNIECKI und SREEVALSAN (1980) konnten in Untersuchungen des Sindbis Viruses, welches ein monopartites RNA-Genom ausweist, drei dsRNA-Moleküle nachweisen, von denen das größte der RF entsprach. Einige der RF-Moleküle wiesen einen "Nick" im codogenen RNA-Strang auf. Durch eine Nuklease-Behandlung konnten die Autoren nachweisen, daß diese RF-Moleküle reproduzierbar in die beiden kleineren dsRNA-Moleküle zerlegt wurden. Auch MORYIAMA et al. (1998) beschreiben die Anwesenheit von Nicks in dem codierenden RNA-Strang einer endogenen dsRNA in Reis. Obwohl in den eigenen Untersuchungen durch eine Addition der ca. 2,5 kb, 2,3 kb sowie der 1,4 kb Doppelbande die Größe der ca. 7,6 kb großen dsRNA-Bande gewonnen wird, scheinen Sollbruchstellen in der ca. 7,6 kb großen dsRNA-Banden nicht die Ursache für die Anwesenheit der niedermolekularen dsRNA-Banden zu sein. So wäre es zu erwarten, daß bei Anwesenheit solcher Bruchstellen alle "dsRNA-Bruchstücke" immer gleichmäßig durch die Gelelektrophorese nachgewiesen werden können. Wie bereits erwähnt, war jedoch der gelelektrophoretische Nachweis der ca. 2,5 kb großen dsRNA-Bande nicht in allen Fällen möglich. Außerdem müßten die selben Bruchstellen auch in der genomischen RNA vorliegen,

da sich das dsRNA- und das RNA-Muster entsprechen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß es sich bei den im Zuge der Northern-Blot-Analysen nachgewiesenen RNA-Molekülen um dsRNA-Moleküle handelt, da die gewählte Methode zur RNA-Isolierung (CHRIGWIN et al., 1979) nach WERNER (persönliche Mitteilung, 1999) zu einer Anreicherung der dsRNA-Fraktion in der Gesamt-RNA führt. So isolierten MAIß et al. (1987) die dsRNA aus Blättern von PPV-infizierten Kirschbäumen durch eine vergleichbare Methode. Aufgrund der ungewissen Natur der niedermolekularen dsRNA-Banden sollte daher, für eine Zuordnung des Ebereschenviruses, nur die ca. 7,6 kb große dsRNA-Bande herangezogen werden. Jedoch ist die Anzahl der in Frage kommenden Virusgruppen, die eine genomische RNA dieser Größenordnung aufweisen, immer noch zu groß, als daß eine nähere Einteilung des Ebereschenvirus möglich wäre.

4.3 cDNA-Synthese und RT-PCR aus dsRNA

Die Klonierung isolierter dsRNA stellt eine gute Möglichkeit zur Charakterisierung von Viren dar, bei denen die Isolierung ganzer Partikel oder aber ein serologischer Nachweis nicht möglich ist (JELKMANN et al., 1989). Sie wurde bereits mehrfach für isolierte dsRNA aus holzigen Wirtspflanzen beschrieben (JELKMANN et al., 1989, JELKMANN et al., 1992, JELKMANN, 1995, KEIM-KONRAD und JELKMANN, 1996, MENG et al., 1998, ZHANG et al., 1998 und 1998a). Alle Autoren berichten dabei von einer erfolgreichen konventionellen cDNA-Synthese aus isolierter dsRNA und nachfolgender Klonierung derselben. In den eigenen Untersuchungen konnte eine konventionelle cDNA-Synthese jedoch nur aus isolierter TMV-dsRNA erzielt werden. Eine cDNA-Synthese aus isolierter Ebereschen-dsRNA nach konventioneller Methode (OKAYAMA und BERG, 1982) war dagegen nicht möglich, was vermutlich auf einer zu geringen dsRNA-Ausgangskonzentration sowie einer möglichen unzureichenden Denaturierung der dsRNA beruhte. So ist nach COFFIN und COUTTS (1992) die vollständige dsRNA-Denaturierung die wichtigste Voraussetzung für die cDNA-Synthese, die nach JELKMANN et al. (1989) bei kleinen dsRNA Mengen (500 ng) nur möglich ist, wenn die dsRNA unter Verwendung von Methylquecksilberhydroxid denaturiert wird. So gelangen JELKMANN et al. (1992) die cDNA-Synthese von 500 ng dsRNA aus Blattgewebe von Apfelbäumen, die mit dem Appel stem pitting Virus-like Agens infiziert waren, nach entsprechender Denaturierung der dsRNA. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Untersuchungen von JELKMANN (1995), FAZELI et al. (1998), MENG et al. (1998), VIVES et al. (1999) und SABANADZOVIC et al. (2000) erzielt. In den eigenen Arbeiten wurde jedoch aufgrund der hohen Toxizität der Verbindung auf die Verwendung von

Methylquecksilberhydroxid verzichtet und eine Denaturierung der dsRNA durch Hitze erwirkt. Nach JELKMANN et al. (1989) führt die Hitze-Denaturierung jedoch nur zu einer cDNA. sehr geringen Ausbeute an So hatte ein Vergleich verschiedener Denaturierungsverfahren, wie die Verwendung von Methylquecksilberhydroxid oder das Aufkochen der dsRNA vom PPV gezeigt, daß eine signifikant höhere cDNA-Ausbeute bei der Verwendung von Methylquecksilberhydroxid erzielt werden konnte (JELKMANN et al., 1989). Als Ursache für die geringe cDNA-Ausbeute Hitze-denaturierter dsRNA wird eine unvollständige Denaturierung der dsRNA, sowie eine schnelle Renaturierung diskutiert, die durch die sehr stabile A-Helix-Struktur der dsRNA verursacht ist (COFFIN und COUTTS, 1992; QIAN und KIBENGE, 1994; GOODIN, 1995; BATTEN et al. 2000). Es ist daher zu vermuten, daß aufgrund der geringen Ausgangskonzentration an Ebereschen-dsRNA von weniger als 500 ng sowie der unzureichenden Denaturierung derselben, eine erfolgreiche cDNA-Synthese verhindert wurde. Zusätzlich ist anzunehmen, daß es im Verlauf der konventionellen cDNA-Synthese zu weiteren Verlusten aufgrund der Notwendigkeit häufiger Fällungsschritte gekommen ist.

Im Gegensatz zu der konventionellen cDNA-Synthese ist nach ZHANG und ROWHANI (2000) die RT-PCR aus dsRNA mit anschließender Klonierung eine wesentlich effizientere Methode. So kann im Zuge der RT-PCR auf viele für die cDNA-Synthese notwendige Arbeitsschritte, welche die Edukt- und Produktmenge reduzieren, verzichtet werden. Durch die direkte Klonierungsmöglichkeit der PCR-Produkte fallen zudem die Anlagerung von Linkern oder Adaptern, die ebenfalls noch einmal zu einem Verlust an Produkt führen können, weg. Die RT-PCR mit anschließender Klonierung ermöglicht daher die Verwendung einer sehr kleiner dsRNA-Menge, die zudem durch Hitze denaturiert werden kann (ZHANG und ROWHANI, 2000). So berichten FAZELI et al. (1998) von einer RT-PCR mit Hitzedenaturierter GLRV-4 (Grapevine leafroll-associated virus 4)-dsRNA, isoliert aus 0,1 g Weinreben-Rinde. Für die cDNA-Synthese mußten die Autoren dagegen eine dsRNA-Konzentration verwenden, die aus 5 g Weinreben-Rinde isoliert wurde. OSAKI et al. (1998) konnten ebenfalls durch RT-PCR mit einem Zwanzigstel der dsRNA-Konzentration aus 5 g Rindengewebe des Japanischen Pfirsich Kultivars 'Niitaka' eine erfolgreiche Amplifikation von PCR-Produkten erzielen. Und ähnliche Ergebnisse wurden auch in Untersuchungen von ZHANG et al. (1998b) und NASSUTH et al. (2000) beim Nachweis von Viren in verschiedenen holzigen Wirtspflanzen (Vitis, Malus, Rubus und Prunus) erzielt. Es wurde daher in den eigenen Untersuchungen eine weitere Klonierungstrategie zur Charakterisierung des Ebereschenviruses etabliert, wobei abweichend von der reinen RT-PCR die RT-DOP-

PCR verwendet wurde, da keine spezifischen Primer für das Ebereschenvirus vorlagen. Die DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primer PCR) ermöglicht die direkte Amplifikation unbekannter DNA-Templates durch die Verwendung degenerierter Primer (TELENIUS et al., 1992, PICH et al., 1994). Die Methode wurde von ROTT (persönliche Mitteilung, 1999) als RT-DOP-PCR bereits erfolgreich für die Amplifikation Hitze-denaturierter viraler dsRNA verwendet. In den eigenen Untersuchungen konnte die Eignung der RT-DOP-PCR für die Amplifikation viraler Ebereschen-dsRNA bestätigt werden. Die Größen der amplifizierten Produkte waren jedoch mit max. 500 bp sehr klein. Als Grund ist die Verwendung von Randomprimern für die Reverse Transkription zu nennen. Diese Primer besitzen aufgrund ihrer zufälligen Nukleotidkomposition potentiell mehrere Bindungsstellen auf der dsRNA. Zusätzlich ist nicht auszuschließen, daß die Verwendung von Hitze zur Denaturierung der dsRNA die Entstehung längerer reverser Transkripte beeinträchtigte. So führt nach JELKMANN et al. (1989) die Hitze-Denaturierung der dsRNA im Zuge einer cDNA-Synthese während zu mehreren kleinen cDNA-Fragmenten, durch eine Methylquecksilberhydroxid-Denaturierung cDNA-Fragmente der vollen Länge von PPV gewonnen werden konnten. Es bleibt weiterhin zu klären, in wie weit auch die DOP-PCR an sich einen Einfluß auf die Größe der amplifizierten Fragmente aufwies, da schon in den DOP-PCR-Etablierungsversuchen, unter Verwendung von Kontroll-DNA der Firma Roche, nicht die erwarteten Fragmentgrößen bis 3000 bp amplifiziert werden konnten. Das Screening der im Anschluß an die RT-DOP-PCR durch Klonierung gewonnenen Klone ergab zudem eine überwiegende Anzahl von Klonen mit einem Insert zwischen 20 und 105 bp, was jedoch auf der, vom Hersteller (INVITROGEN) bescheinigten, hohen Effizienz des "TOPO™ TA Cloning[®], Systems für Fragmente unter 100 bp beruht. Insgesamt konnten jedoch 110 rekombinante Klone, deren Inserts größer als 105 bp waren, in der Kolonie-Filter-Hybridisierung untersucht werden. In den anschließenden Northern-Blot-Analysen zeigten 2 Klone ausschließlich mit gelelektrophoretisch aufgetrennter Gesamt-RNA erkrankter Ebereschen Signale, während keine Hybridisierung mit der Gesamt-RNA symptomloser Ebereschen nachgewiesen wurde. Durch die Southern-Blot-Analysen konnte zudem bestätigt werden, daß diese beiden Klone nicht von einem pflanzlichen Gen herrühren, das im Zuge der Infektion aktiviert wurde. Im Rahmen der zweiten Klonierungsstrategie konnten somit zwei Klone (V272_33 und V283_2/1) nachgewiesen werden, die in allen Kontrollversuchen eine virusspezifische Reaktion aufgewiesen haben. Die übrigen Klone zeigten dagegen in den Northern-Blot-Analysen überwiegend eine Reaktion mit ribosomaler RNA. Auch BATTEN et al. (2000) beobachteten bei der cDNA-Synthese aus dsRNA von Monosporascus

cannonballus einen hohen Anteil von rRNA-Klonen, während nur ein dsRNAspezifischer Klon gewonnen werden konnte. Die Autoren hatten degenerierte Oligonukleotid-Primer für die cDNA-Synthese verwendet. Bei einer gleichzeitig durchgeführten cDNA-Synthese unter Verwendung von Randomprimern konnte gar kein dsRNA-spezifischer Klon nachgewiesen werden. Selbst in den Untersuchungen von JELKMANN (1995) ergab die Klonierung von cDNA-Fragmenten aus dsRNA von CVA einen Anteil von nur 7,5 % die virusspezifischer Klone. obwohl dsRNA unter Verwendung von Methylquecksilberhydroxid erfolgt war. Als Ursache für den hohen Anteil unspezifischer Klone ist die Natur einzelsträngiger RNA zu nennen. So weisen viele RNA-Moleküle intramolekulare Basenpaarungen auf und besitzen dadurch eine dsRNA-ähnliche Struktur, die in einer 300 mM MgCl₂-Lösung von den RNAsen nicht angegriffen werden kann. Ausgedehnte Doppelhelixbereiche bilden z. B. die großen rRNAs aus. Diese wiederum bilden definierte dreidimensionale Strukturen, die eine wichtige Komponente in der Funktion der Ribosomen darstellen. Aufgrund dieser Eigenschaft einzelsträngiger RNA erklärt sich auch der hohe Prozentsatz falsch positiver Klone, die im Zuge der Kolonie-Filter-Hybridisierung detektiert wurden, da in der ECL-markierten dsRNA-Sonde auch eine ssRNA-Kontamination angenommen werden muß. Eine Möglichkeit, die Kontamination an doppelsträngiger ssRNA zu reduzieren, ist die Aufreinigung einzelner dsRNA-Banden durch Gelelution. So raten JELKMANN et al. (1989) zu diesem Schritt, wenn nur kleine Mengen an dsRNA zur Verfügung stehen. In den eigenen Untersuchungen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl spezifischer Klone beobachtet werden, wenn die EbereschendsRNA nach Aufreinigung durch eine Gelelution oder aber direkt verwendet wurde. Auch BATTEN et al. (2000), die ebenfalls geleluierte dsRNA verwendet hatten, konnten nur eine geringe Ausbeute an dsRNA-spezifischen Klonen gewinnen. Eine Beeinträchtigung der Gewinnung virusspezifischer Klone durch die Anwesenheit pflanzlicher ssRNA mit dsRNA-Struktur kann somit nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Sie erschwerte die Gewinnung virusspezifischer Klone ebenso, wie die geringe Größe der PCR-Produkte, die durch die RT-DOP-PCR gewonnen wurden. Daß trotzdem zwei virusspezifische Klone charakterisiert werden konnten, spricht aber für die Eignung der gewählten Vorgehensweise. Jedoch besteht durch ATTOUI et al. (2000) seit kurzem die Möglichkeit, mit der SPAT-Methode (Single Primer Amplifikation Technique) trotz anwesender ssRNA-Kontamination cDNA-Klone der vollen Länge (full-length clones) aus 1 ng Hitze-denaturierter dsRNA zu synthetisieren. Die Methode beruht dabei auf der Anlagerung eines "3 blocked DNA-oligonucleotide" an die 3'-Enden der dsRNA durch eine T4 RNA-Ligase, und anschließende Amplifikation der dsRNA

durch die Verwendung eines komplementären Primers. Aufgrund der geringen Größe der virusspezifischen Klone, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, sollte die Eignung der SPAT-Methode in weiteren Untersuchungen zur Gewinnung von Klonen der vollen Länge überprüft werden.

4.4 RT-PCR und RACE-Analysen auf der Basis der Klone V272_33 und V283_2/1

Von den Klonen V272_33 und V283_2/1 wurden spezifische Primer für RT-PCR-Reaktionen und spätere RACE-Analysen abgeleitet. RT-PCR- und PCR-Untersuchungen sind aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität besonders zur Detektion von Viren in Gehölzen geeignet, da sie Schwierigkeiten, die sich durch eine unregelmäßige Verteilung sowie einen niedrigen Virustiter ergeben überbrücken können (HENSON und FRENCH, 1993; ROWHANI et al., 1995; REVILL und WRIGHT, 1997; WERNER et al., 1997; VASKOVÁ et al., 1999; ZHANG und ROWAHINI, 2000). Durch alle von den verschiedenen Klonen abgeleiteten Primer war ein eindeutiger spezifischer Nachweis von PCR-Produkten mit den jeweiligen erwarteten Größen in der Gesamt-RNA erkrankter Ebereschen möglich, während in keinem Fall eine Amplifikation von PCR-Produkten in symptomlosen Ebereschen erzielt wurde. Diese Tatsache bestätigt, wie schon die RNA-Northern- und Southern-Blot-Analysen, die virale Natur der Klone V272_33 und V283_2/1. Unter Verwendung der Primer des Klons V272_33 und V492_21 (vgl. Kapitel 3.10) wurden RT-PCR Untersuchungen zum Nachweis des Ebereschenviruses in Blättern erkrankter Ebereschen von unterschiedlichen Standorten in Deutschland vorgenommen (vgl. Kapitel 3.15, Abb. 58). In beiden Versuchsreihen konnten jeweils in allen untersuchten erkrankten Ebereschen identische PCR-Produkte mit den jeweils erwarteten Größen beobachtet werden, während keine PCR-Produkte in den smptomlosen Ebereschen amplifiziert wurden. Der Nachweis gleicher PCR-Produkte und dsRNA-Muster in ausschließlich erkrankten Ebereschen von unterschiedlichen Standorten in Deutschland, die alle die charakteristischen Symptome (chlorotische Ringflecken und Blattscheckungen) aufwiesen, verstärkt den Verdacht, daß das nachgewiesene Virus mit der Erkrankung der Eberesche korreliert ist. Eine genaue Klärung dieser Tatsache ist jedoch nur durch die Erfüllung der Koch'schen Postulate möglich. Doch schon jetzt liegt durch die etablierten RT-PCR-Reaktionen ein Diagnosesystem vor, das sowohl zur Testung von Ebereschen in Baumschulen und im Freiland, als auch von anderen potentiellen Wirtspflanzen sowie z. B. Vektoren herangezogen werden kann. Hierdurch können Hinweise auf die Bedeutung des Ebereschenvirus für andere wirtschaftlich wichtige Gehölzarten, sowie auf seine Verbreitung erhalten werden. So konnte bereits der von BÜTTNER und FÜHRLING (1993) geäußerte Verdacht der Samenübertragbarkeit des Ebereschenviruses durch erste RT-PCR-Untersuchungen erhärtet werden (MIELKE, 1999). Durch eine frühzeitige Diagnose des Virus ist es zudem möglich, rechtzeitige phytosanitäre Maßnahmen durchzuführen, um eine Verbreitung des Virus zu verhindern.

Nachdem die Spezifität der abgeleiteten Primer gegenüber dem unbekannten Virus durch RT-PCR-Analysen bestätigt worden war, konnten diese Primer für die RACE-Untersuchungen eingesetzt werden. Die RACE-Methode ermöglicht die direkte Amplifikation von RNA 5'und 3'-Enden und ist bereits erfolgreich für die Amplifikation viraler RNA-Enden verwendet worden. So berichten TACAHASHI und UYEDA (1999) von 3'RACE-Analysen, durch welche die Amplifikation des 3'-Endes verschiedener Potyviren möglich war, und LI et al. (2000) beschreiben 5'RACE-Untersuchungen zur Charakterisierung der Enden der RNA 1 und RNA 2 des Apple Latent Spherical Virus (ALCV). Auch ZHANG et al. (1998a) gelangen die 5'- und 3'RACE-Analysen zur Charakterisierung der viralen Enden des Grapevine Rupestris Stem-Pitting Virus_1. Dagegen konnte in den eigenen 3'RACE-Untersuchungen auf der Basis der Klone V272_33 und V283_2/1, weder ein RACE-PCR-Produkt noch eine Amplifikation der viralen Positiv-Kontrolle erzielt werden. Die 3'RACE-Analyse beruht auf der Anlagerung eines Poly A-Schwanz-spezifischen Primers an das polyadenylierte 3'-Ende einer RNA bei der Reversen Transkription. Eine Polyadenylierung des 3'-Endes ist charakteristisch für die meisten eukaryotischen mRNAs, und tritt bei einigen Virusgruppen wie z. B. den Poty-, Potex-, Capillo-, Como-, Nepo- und Furoviren auf (Plant Viruses oneline Datenbank, 1998). Der fehlende Nachweis eines 3'-RACE-Produktes und vor allem auch des viralen Kontroll-PCR-Produktes läßt darauf schließen, daß das Ebereschenvirus zu einer Virusgruppe gehört, deren Vertreter keinen Poly A-Schwanz an ihren 3'-Enden aufweisen.

Doch auch in den 5'RACE-Analysen unter Verwendung klonspezifischer Primer konnte keine Amplifikation des viralen 5'-Endes erzielt werden. Die Ursache hierfür bleibt zu klären. Nach WENG und XIONG (1995) ist die Bestimmung viraler 5'- und 3'-Enden jedoch generell schwierig. So weisen viele Viren z. B. kovalent gebundene Proteine (VPg) an den 5'-Enden ihrer RNAs auf, die eine 5'RACE verhindern könnten. Und auch das Fehlen der Cap-Struktur, die nicht bei allen Pflanzenviren vorhanden ist, kann die Amplifikation des 5'-Endes verhindern. Die genaue Ursache für die fehlende Amplifikation des viralen 5'-Endes bleibt zu klären. Jedoch kann in weiteren Arbeiten die Anwesenheit eines VPg durch einen RNase Verdau der Gesamt-RNA erkrankter und symptomloser Ebereschen und anschließender Auftrennung möglicher VPg's in einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese erfolgen (PAGE) (MÄKINEN et al., 2000). Nur in der erkrankten Eberesche dürfte dann bei Anwesenheit eines viralen VPg's eine Proteinbande beobachtet werden. Als mögliche Alternative zu den RACE-Untersuchungen ist in weiteren Arbeiten die Eignung der bereits beschriebenen SPAT-Methode von ATTOUI et al. (2000) zu nennen, da bei einer erfolgreichen Klonierung von viralen Klonen der vollen Länge auch die viralen Enden ermittelt werden könnten.

Im Rahmen der 5 RACE-Analysen mit dem Klon V272_33 spezifischen Primer 195_UP wurde allerdings beim alleinigem Einsatz dieses Primers, aufgrund einer unerwarteten zweiten Primerbindungsstelle ein ca. 1, 5 kb (Klon V492_21) großes PCR-Produkt amplifiziert (vgl. Kapitel 3.10, Abb. 38). Durch die Auswertung der Sequenz des Klons V492_21 wurde eine Übereinstimmung mit dem Klons V272_33 (vgl. Kapitel 3.10.1, Abb. 40) nachgewiesen, und zudem die zweite Primerbindungsstelle bestätigt. Sie wies allerdings nur eine 80 % Übereinstimmung mit der Primersequenz auf. Es ist daher zu vermuten, daß bei Anwesenheit des Primers 401_LP (ebenfalls von Klon V272_33) eine erfolgreiche Amplifikation des ca. 1,5 kb großen PCR-Produktes vollkommen inhibiert wurde, was sich in den Ergebnissen der RT-PCR- und Southern-Blot-Analysen (vgl. Kapitel 3.9, Abb. 36) widerspiegelt.

Die gesamte Sequenz aus den Klonen V272_33 und V492_21 wies eine Länge von 1754 bp auf und wurde in den weiteren Arbeiten als Alignment_1 bezeichnet. Trotz der Größe dieses Fragmentes war es nicht möglich, spezifische Hinweise auf ein virales Protein in der Datenbank zu finden. Wie schon bei den Klonen V272_33 und V283_2/1 wurden nur bei einem Vergleich der Proteinsequenz des Alignments_1 Hinweise auf verschiedene humanund pflanzenpathogene Viren nachgewiesen. Doch waren diese insgesamt zu kurz und zudem in unterschiedlichen Leserahmen lokalisiert, als daß sie einen relevanten Hinweis darstellen könnten. Da die Virusspezifität des Klons V492_21 durch Northern- und Southern-Blot-Analysen bestätigt werden konnte, ist zu vermuten, daß die Sequenz des Alignment_1 in einem wenig konservierten Bereich des Ebereschenvirus-Genoms liegt oder aber, daß das Ebereschenvirus sogar noch unbekannt ist.

4.5 RT-PCR zum Nachweis des potentiellen Zwischenstückes zwischen dem Klon V283_2/1 und dem Alignment_1 und Charakterisierung des Klons V571_10

Da zwischen dem Klon V283_2/1 und dem Alignment_1 keine Übereinstimmung nachgewiesen werden konnte, sollte durch weitere RT-PCR-Analysen versucht werden, daß potentielle Zwischenstück zwischen diesen beiden Klonen zu amplifizieren. Die für diese

Untersuchungen notwendige Kenntnis über die Orientierung des Klons V283_2/1 sowie des Alignment_1 konnten aus den Sequenzanalysen ermittelt werden. Da jedoch keine Hinweise auf die mögliche Reihenfolge der beiden Sequenzabschnitte vorlagen, wurden zwei Primerkombinationen gewählt, durch die beide möglichen Reihenfolgen berücksichtigt wurden. Als Ergebnis dieser Untersuchungen konnte nur mit der Primerkombination V283_2/1-120LP und Alignment_1-519_LP die Amplifikation eines ca 2,6 kb großen PCR-Fragmentes (Klon V571_10) erzielt werden. Die Sequenzanalyse dieses Klons ergab eine erwartete Übereinstimmung des 3'-Endes mit dem 5'-Ende des Alignment_1 (vgl. Kapitel 3.11.1, Abb. 47), wodurch eine korrigierte Gesamtsequenz von 3838 bp erhalten wurde, die als Alignment_2 bezeichnet wurde. Dagegen konnte keine Homologie des 5'-Endes zum Klon V283_2/1 nachgewiesen werden. Wie schon bei den 5'RACE-Untersuchungen konnte jedoch eine zweite Primerbindungsstelle für den verwendeten Primer 519_LP ermittelt werden, obwohl in den Kontroll-RT-PCR-Untersuchungen, unter Verwendung der Primer 519_LP und 195_UP, und auch den anschließenden Southern-Blot-Analysen nur das aufgrund der Lage der Primer zueinander erwartete PCR-Fragment von 538 bp nachgewiesen wurde. Da die Amplifikation des ca. 2,6 kb großen PCR-Fragmentes bei der Anwesenheit des Primers 195_UP komplett inhibiert wurde ist zu vermuten, daß auch in diesem Fall die zweite Primerbindungsstelle des Primers 519_LP eine leicht abweichende Sequenz aufweist. Jedoch wurden keine Untersuchungen zur Klärung dieser Vermutung durchgeführt. Das im Rahmen dieser Arbeit beobachtete mehrfache Auftreten von zweiten Bindungsstellen eines Primers scheint durch die Natur der viralen Sequenz bedingt zu sein, die sich durch häufige Basenwiederholungen auszeichnete. Aufgrund der zweiten Bindungsstelle des Primers 519_LP und der fehlenden Homologie des Klons V571_10 zum Klon V283_2/1 wurde das potentielle Zwischenstück zwischen dem Alignment_1 und dem Klon V283_2/1 nachweislich nicht amplifiziert.

Ein Vergleich des 3838 bp großen Alignment_2 mit der Datenbank ergab eine Homologie des 5'-Endes auf der Proteinebene über 2346 nt zu einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) des Bunyamwera Virus (BUNYW, Bunyaviren), TSWV, einigen weiteren Vertretern der Bunyaviren sowie einigen Influenza A Viren (Orthomyxoviren). Das ist ein sehr starker Hinweis darauf, daß dieser Bereich des Alignments_2 einen Teil der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des Ebereschenvirus darstellt. Der Nachweis einer RdRP belegt überzeugend die virale Natur des Erregers. Der Nachweis der TSWV-RdRP ergänzt dabei eine Reihe von Hinweisen auf eine mögliche Infektion der Eberesche durch ein TSWV-ähnliches Virus (EBRAHIM-NESBAT und IZADPANAH, 1992; FÜHRLING, 1994). Allerdings konnten

BENTHACK et al. (1998) durch RT-PCR-Untersuchungen die TSWV-Ähnlichkeit des Ebereschenvirus nicht eindeutig bestätigen. Eine Zugehörigkeit des Ebereschenvirus zu der Gruppe der Tospoviren war dagegen nicht auszuschließen. Auch in den eigenen Untersuchungen konnte die TSWV-Ähnlichkeit des Ebereschenviruses nicht bestätigt werden. So wurde, wie schon in den Untersuchungen von FÜHRLING (1994), keine Übereinstimmung zwischen dem tripartites Genom von TSWV, das aus einer negativ-sense L-RNA (8897 bp) und zwei ambisense RNAs (M-RNA, 4821 bp und R-RNA, 2916 bp) besteht und zudem vier subgenomische RNA-Moleküle (1,2 kb und 1,7 kb) aufweist (MOYER, 1999), und dem dsRNA- bzw. RNA-Muster des Ebereschenvirus beobachtet. Auch die geringe Homologie zwischen dem Alignment_2 und der RdRP von TSWV von nur 26 % spricht gegen eine TSWV-Ähnlichkeit des Ebereschenviruses. TSWV weist zudem eine nur sehr niedrige Aminosäure-Homologie von max. 27 % seiner RdRP zu den RdRP's der Vertreter der Bunyaviren auf, während zu anderen Tospoviren Homologien von z. B. 69 % (TSWV und Impatiens Necrotic spot Virus, INSV) oder 46 % (TSWV und Peanut Bud Necrosis Virus, PBNV) erreicht werden (ELLIOTT, 1989; MUMFORD et al., 1996; GOWDA et al., 1998). Sollte es sich bei dem Ebereschenvirus um einen Vertreter der Gruppe der Tospoviren handeln, wäre daher eine Übereinstimmung mit der RdRP von weiteren Vertretern der Tospoviren zu erwarten gewesen. Gegen eine Zugehörigkeit des Ebereschenvirus zu der Gruppe der Tospoviren sprechen auch die auffallend vielen Hinweise auf virale Polyproteine, die im Rahmen der Sequenzierungen nachgewiesen wurden. Zwar waren die einzelnen Hinweise auf virale Polyproteine zu kurz, um relevant zu sein, doch kann aufgrund der Vielzahl der Hinweise die Anwesenheit eines Polyproteins nicht ausgeschlossen werden. Vergleicht man allerdings die Sequenzhinweise aus der Datenbank, so fällt auf, daß nur Viren mit einem Minusstrang-RNA-Genom (TSWV, Bunyaviren, Orthomyxoviren, Marburg Filovirus) gefunden wurden. Dies könnte somit ein Hinweis darauf sein, daß auch das Ebereschenvirus ein Genom mit einer negativen RNA aufweist. Ein erster Hinweis hierauf könnte der Nachweis eines konservierten Aspartat-Aspartat- (DD-) Motivs in der Position 1331 nt -1332 nt im Alignment_2 sein, daß charakteristisch für Viren mit einem Minusstrang RNA-Genom ist. So wurden bei BUNYW sieben DD-Motive am C-terminalen Ende nachgewiesen, die auch bei anderen Viren mit einem Minusstrang-RNA-Genom ein- bis zweimal auftreten (ELLIOT, 1989). Das Ebereschenvirus-DD-Motiv ist in eine Sequenz aus sieben Aminosäuren (MVHSDDS) eingebettet, die eine hohe Homologie zu entsprechenden Sequenzen von BUNYW (MVHSDDN) und TSWV (IVHSDDN) aufweist. Für BUNYW ist die genannte Sequenz durch ELLIOTT (1989) als eine typische konservierte Region von L-

Proteinen charakterisiert worden. Die ist allgemein das am stärksten konservierte Protein innerhalb der Gruppe der Viren (ZANOTO et al., 1996), deren konservierte Regionen in Clustern lokalisiert sind und vor allem am C-terminalen aber auch N-terminalen Ende der RdRP auftreten. Es liegen jedoch deutlich Unterschiede zwischen den RdRPs der Viren mit einem dsRNA- bzw. Plusstrang-RNA-Genom und Viren mit einem Minusstrang-RNA-Genom vor (BRUENN, 1990). So weisen Viren mit einem Plusstrang-RNA- bzw. dsRNA-Genom als ein besonders charakteristisches konserviertes Motiv das Glycin-Aspartat-Aspartat-Motiv (GDD) nahe dem C-terminalen Ende auf, das von einer Reihe weiterer konservierter Bereiche flankiert wird. Viren mit einem Minusstrang RNA-Genom fehlt dieses GDD-Motiv. Sie besitzen dafür andere konservierte Motive, die bei Viren mit einem dsRNAoder Plusstrang-RNA-Genom nicht auftreten. In dem Alignment_2 konnten jedoch weder typische konservierte Regionen der RdRP von Viren mit einem dsRNA- bzw. Plusstrang-RNA-Genom, noch nennenswerte Homologie zu den RdRPs der entsprechenden Viren gefunden werden. Der Nachweis eines konservierten Motivs, das typisch für Viren mit einem Minusstrang-RNA-Genom ist, verstärkt den Hinweis darauf, daß das Ebereschenvirus ebenfalls ein Minusstrang-RNA-Genom aufweisen könnte. Innerhalb der Pflanzenviren weisen neben den Tospoviren mit ihrem ambisense Genom auch die Rhabdoviren ein Minusstrang-RNA-Genom auf. Die Genomgrößen der Rhabdoviren liegen allerdings zwischen 11 kb-13 kb und sind damit wesentlich größer als die für das Ebereschenvirus postulierte genomische RNA. Es ist somit unwahrscheinlich, daß es sich bei dem Ebereschenvirus um einen Vertreter der Rhabdoviren handelt. Inwieweit das Ebereschenvirus aber in die Gruppe der Viren mit einem Minusstrang-RNA-Genom und damit in die Gruppe der Tospoviren einzuordnen ist, bleibt noch zu klären. Die Gruppe der Tospoviren ist eine ständig wachsende Gruppe. Galt TSWV lange als einziger Vertreter dieser Gruppe, wurden seit den 80 Jahren mehrere verschiedene Tospovirus-Isolate gefunden (LAW und MOYER, 1990; DE AVILÁ et al., 1990, 1992). Inzwischen gehören der Gruppe der Tospoviren zwölf Viren mit verschiedenen Wirtskreisen und Verbreitungsgebieten an (MOYER, 1999). Zusätzlich werden mehrere weitere Viren als mögliche Mitglieder der Tospovirus-Gruppe diskutiert (MUMFORD et al., 1996). Die Existenz neuer, noch völlig unbekannter Vertreter der Tospoviren kann somit nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt ist die eindeutige Charakterisierung des Ebereschenvirus jedoch erst möglich, wenn Kenntnisse über seine Genomorganisation, Replikationsstrategie und Partikelmorphologie, sowie seine Verbreitung und seinen Wirtspflanzenkreis vorliegen. Es müssen jedoch mindestens 80-90 % des Genoms eines unbekannten Virus ermittelt werden, um erste sichere Hinweise auf Virus erhalten zu

können (MAIß, persönliche Mitteilung, 1999). So konnten KAUFMANN et al. (1992) erst nach der Sequenzierung des gesamten Genoms von BSBV eine Zuordnung dieses Viruses zur Gruppe der Furoviren erzielen. Auch MAIA et al. (2000) benötigten fast die gesamte Sequenz des Sugarcane Yellow Leaf Virus (ScYLV), um eine Zuordnung dieses Viruses zur Gruppe der Luteoviren erzielen zu können. Doch oft ist auch bei Kenntnis des viralen Genoms eine genaue Einteilung eines Virus noch schwierig. So untersuchten LI et al. (2000) ein noch nicht charakterisiertes Virus, das die "Apple Russet Ring Diesase" verursacht und als Apple Latent Spherical Virus (ALSV) bezeichnet wird. Aufgrund der Genomorganisation und der Partikelmorphologie ist das Virus nach Angaben der Autoren der Familie der Comoviridae zu zuordnen, muß jedoch aufgrund abweichender Hüllproteinanzahl und der Anwesenheit eines zusätzlichen Leserahmens als eigenes Genus angesehen werden. SONG et al. (1998) untersuchten das Garlic Virus X (GVX). Die Genomorganisation dieses Virus ähnelt stark den Vertretern der Gruppen der Carla- und Potexviren, seine Replicase zeigte jedoch auch hohe Homologien zu den Gruppen der Tymo- und Closteroviren. Genauere Proteinanalysen belegten zudem eine hohe Übereinstimmung zwischen dem ORF 4 von GVX und dem ORF 4 des Shallot Virus X (ShVX). Die Autoren gehen daher nicht davon aus, daß GVX der Gruppe der Carla- oder Potexviren angehört, sondern ordnen es zusammen mit ShVX einer neuen nicht-eingeteilten Gruppe innerhalb der Pflanzenviren zu. Auch MARTELLI und JELKMANN (1998) etablierten während der Charakterisierung des Apple Stem Pitting Virus (ASPV) ein neues Genus mit dem Namen Foveavirus. Interessanterweise zeigen die Vertreter der Foveaviren eine Partikelmorphologie ähnlich der Clostero-, Crini-, Tricho-, Vitti-, Capillo- und Allexiviren, während die Struktur und Organisation des Genoms Übereinstimmungen mit den Vertretern der Potex-, Carla- und Allexiviren aufweist. Das Beet soil-born virus (BSBV) wurde in Untersuchungen von KOENIG et al. (1997), bei bekannter Genomorganisation, erst aufgrund einer Homologie von 52-72 % zwischen den Aminosäuresequenzen des BSBV-Hüllprotein und den Hüllproteinen verschiedener Furoviren als Virus dieser Gruppe charakterisiert, obwohl es deutlich Abweichungen in seiner Genomorganisation zu den Vertretern der Furoviren aufwies. Innerhalb der Furoviren zeigt BSBV zudem nur zu PMTV (Potato Mop Top Furovirus) eine nähere Verwandtschaft (KOENIG et al., 1997). Diese Untersuchungen verdeutlichen, daß es in den eigenen Arbeiten für eine Zuordnung des Ebereschenviruses in eine Virusgruppe, auf der Basis der vorliegenden Sequenzergebnisse, noch zu früh ist. Trotzdem können weitere Hinweise auf das Ebereschenvirus anhand des Alignment_2 erzielt werden. So ist aufgrund seiner Größe davon auszugehen, daß es auf der ca. 7,6 kb großen RNA des Ebereschenvirus lokalisiert ist, bei der

es sich vermutlich um die genomische RNA handelt. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit die Hälfte des viralen Genoms charakterisiert werden. Innerhalb des Alignment_2 wurde kein weiterer Leserahmen sowie keine Start- bzw. Stoppcodon nachgewiesen. Es ist daher zu vermuten, daß der RdRP-homologe Bereich des Alignment_2 den mittleren Bereich einer RdRP darstellt. Für diese Annahme würde auch die Tatsache sprechen, daß die nachgewiesenen Homologien zu den RdRP's von TSWV und den Bunyaviren mitten in deren jeweiligen RdRP-Sequenzen lagen. Es ist daher anzunehmen, daß die eigentliche RdRP-Sequenz größer als 2346 Nukleotide ist und sich vermutlich über das gesamte Alignment_2 und wahrscheinlich darüber hinaus erstreckt. Die RdRP des Ebereschenvirus wäre somit mind. 4 kb groß. Vergleicht man die Größen der RdRP der verschiedenen Viren, so weisen Tobamoviren eine RdRP von über 4,0 kb auf. Auch Potato Calravirus M besitzt eine RdRP von ca. 5,9 kb und GVX sowie ShVX weisen eine RdRP von ca. 4,7 bzw. ca. 5,1 kb auf (SONG et al., 1998). Die RdRP des Grapevine Rupestris Stem-Pitting Virus_1 ist ca. 6,5 kb groß (MENG et al., 1998) und die RdRP des Apple Latent Spherical Virus 1 ist sogar 6,8 kb groß (ZHANG et al., 1998b). Es ist somit durchaus denkbar, daß auch das Ebereschenvirus eine sehr große RdRP besitzt. Hierfür würden auch die Hinweise auf virale RdRP's sprechen, die in den Sequenzanalysen der Klone V492_21 und V272_33 gefunden wurden. Diese beiden Klone machen das Nicht-RdRP-homologe 3'-Ende des Alignment_2 aus. Die insgesamt aber geringe Übereinstimmung des gesamten 3'-Endes des Alignment_2 mit einer viralen RdRP verstärkt den Verdacht, daß es sich bei dem Ebereschenvirus um ein noch unbekanntes Virus handelt.

Der Nachweis der putativen RdRP des Ebereschenvirus ist ein eindeutiger Beweis für die Eignung der gewählten Arbeitsmethode und bestätigt endgültig die virale Natur des Ebereschen-Agens. Obwohl auf der Basis der Sequenz keine Zuordnung des Ebereschenvirus möglich war, stellt der Nachweis der RdRP einen wichtigen Schritt in der Charakterisierung des Ebereschenvirus dar. Aufgrund der hohen Konservierung der RdRP innerhalb der Pflanzenviren eröffnet gerade der Hinweis auf eine RdRP neue Möglichkeiten zur Charakterisierung des Ebereschenvirus. So wurden die meisten RdRP auf der Basis ihrer konservierten Bereiche identifiziert (O'REILLY und KAO, 1998). Durch eine Auswahl von degenerierten Primern gegen solche konservierten Bereiche kann versucht werden, größere Fragmente der RdRP zu amplifizieren. Die Kenntnis der gesamten RdRP ermöglicht dann direkt oder aber auf der Basis eines Phylogenie-Vergleichs erste Hinweise auf eine mögliche Virusgruppe. So war es IWANAMI et al. (1999) durch eine phylogenetische Analyse der RdRP des Satsuma Dwarf Virus (SDV), welches aufgrund seiner Genomorganisation der Gruppen der Nepoviren zugeordnet wurde, aber auch Übereinstimmungen mit den Como- und Fabaviren aufwies, möglich, deutliche Unterschiede in der RdRP von SDV zu den Vertretern der Nepo-, Como- und Fabaviren nachzuweisen. Aufgrund dieser Unterschiede gehört nach Angaben der Autoren SDV nicht in die Gruppe der Nepo-, Como- oder Fabaviren, sondern muß in ein neues Genus eingeordnet werden. Auch ZHANG et al. (1998) konnten aufgrund einer phylogenetischen Analyse der RdRP des Cherry Green Ring Mottle Virus (CGRMV), welches aufgrund seiner Genomorganisation Homologien zu Vertretern der Poty- und Carlaviren aufwies, trotzdem aber den Closteroviren zugeordnet wurde, eine Übereinstimmung mit ASPV nachweisen. Aus diesem Grund ordnen die Autoren CGRMV in dieselbe Gruppe wie ASPV.

Die Charakterisierung der RdRP des Ebereschenviruses sollte daher verstärkt vorangetrieben werden.

4.6 Das Agens der Eberesche und seine möglichen Eigenschaften

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die virale Natur des Agens aus erkrankten Ebereschen eindeutig durch den Nachweis von dsRNA sowie einer RdRP bestätigt werden. Das Virus konnte durch RT-PCR-Untersuchungen in allen untersuchten erkrankten Ebereschen, von verschiedenen Standorten in Deutschland, nachgewiesen werden. Dies ist ein deutliches Indiz für eine Korrelation des nachgewiesenen Virus mit der Erkrankung. Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse dieser Arbeit ist zu vermuten, daß keine Mischinfektion in den erkrankten Ebereschen vorliegt und das noch unbekannte Virus im Blattgewebe lokalisiert ist. Durch die Ergebnisse der Northern-Blot-Analysen kann angenommen werden, daß es ein monopartites Genom mit einer genomischen RNA von 7,6 kb aufweist. Bedingt durch die Größe der 7,6 kb großen dsRNA bzw. RNA kann es sich zudem wahrscheinlich nur um einen Vertreter aus Virusgruppen mit Genomen über 7 kb handeln. Es ist weiterhin anzunehmen, daß die virale RdRP mind. 4 kb groß ist. Die Anwesenheit eines Polyproteins ist aufgrund zahlreicher Hinweise im Rahmen der Sequenzierung möglich. Aufgrund der RACE-Untersuchungen ist weiterhin zu vermuten, daß das Ebereschenvirus keinen Poly A-Schwanz aufweist, während die Anwesenheit eines VPg nicht ausgeschlossen werden kann. Trotz dieser Hinweise ist eine genauere Zuordnung des Ebereschenvirus in eine Virusgruppe immer noch nicht möglich.

4.7 Ausblick

In weiteren Arbeiten sollte die vollständige Charakterisierung des viralen Genoms durchgeführt werden. Hierfür ist neben der SPAT-Methode besonders auch eine Charakterisierung durch Primer-Extention unter Einsatz spezifischer Primer und Randomprimer geeignet. Die Primer-Extention bietet dabei den Vorteil, daß sie auf der Basis der vorhandenen virusspezifischen Klone erfolgen kann. Parallel zu diesen Untersuchungen scheinen weitere Versuche zur Amplifikation des potentiellen Zwischenstückes zwischen dem Alignment_2 und dem Klon V283_2/1 durch die Wahl neuer Primer sinnvoll. Hierdurch können Hinweise auf die Anzahl der genomischen RNA-Moleküle erzielt werden. Sollte eine Verbindung zwischen dem Alignment_2 und dem Klon V283_2/1 vorliegen, würde dies den Verdacht des monopartiten Genoms des Ebereschenvirus verstärken.

Neben der Charakterisierung des viralen Genoms können durch die etablierten RT-PCR-Reaktionen, wie bereits in Kapitel 4.4 erwähnt, Untersuchungen zur Ermittlung des Wirtspflanzenkreises sowie der Verbreitung des Ebereschenvirus durchgeführt werden, wodurch Hinweise auf die Bedeutung des Ebereschenvirus, erzielt werden können. Durch die Kenntnis möglicher Vektoren können zudem Übertragungen des Ebereschenvirus von Ebereschen auf verschiedene krautige Indikatorpflanzen versucht werden. Bei erfolgreicher Übertragung könnten, aufgrund des meist wesentlich höheren Virustiters krautiger Pflanzen, elektronenmikroskopische Untersuchungen Hinweise auf die Partikelmorphologie liefern. Eventuell ist aus krautigen Pflanzen auch eine Isolierung von Partikeln möglich. Auf der Basis der Kenntnisse über die Genomorganisation, die Verbreitung, den Wirtskreis sowie die Partikelmorphologie sollte eine Charakterisierung des Ebereschenvirus möglich sein. Für den Beweis der Korrelation des Ebereschenvirus mit der Erkrankung der Eberesche müssen dann allerdings auch die Koch'schen Postulate erfüllt werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das unbekannte Agens der Ebereschenringfleckigkeit auf der Basis isolierter doppelsträngiger RNA (dsRNA) mit Hilfe molekularbiologischer Arbeitsmethoden untersucht.

Nach Etablierung einer geeigneten Methode zur dsRNA-Isolierung wurde dsRNA reproduzierbar in Blättern und Rinde erkrankter, nicht jedoch symptomloser Ebereschen nachgewiesen. Der ausschließliche Nachweis von dsRNA in erkrankten Bäumen ist ein deutliches Indiz für die virale Natur des Ebereschenpathogens. Das dsRNA-Muster besteht aus einer 7,6 kb, 2,5 kb, 2,3 kb, 1,4 kb/Doppelbande und 1,3 kb großen dsRNA-Bande. Bei Rindenproben traten zwei niedermolekulare dsRNA-Banden (1,1 kb und 0,9 kb) zusätzlich auf. In Blättern erkrankter Ebereschen von verschiedenen Standorten in Deutschland konnte in allen Fällen ein identisches dsRNA-Muster nachgewiesen werden, weswegen eine Korrelation zwischen den Krankheitssymptomen und dem Ebereschenvirus anzunehmen ist. Diese Vermutung konnte durch spätere RT-PCR-Untersuchungen erhärtet werden.

Durch RT-DOP-PCR Untersuchungen unter Verwendung von Randomprimern für die Reverse Transkription war es möglich, die dsRNA zu amplifizieren und anschließend direkt in einen TA-Vektor zu klonieren. Nach Auswertung rekombinanter Bakterien durch Kolonie-Filter-Hybridisierungen mit einer ECL-markierten dsRNA-Sonde, sowie Northern- und Southern-Blot-Analysen mit Dig-markierten RNA- bzw. DNA-Sonden, wurden zwei Klone (V272_33 und V283_2/1) isoliert, die in allen Kontrollreaktionen eindeutig virusspezifische Reaktionen aufwiesen. In RT-PCR-Versuchen mit Primern, die von beiden Klonen abgeleitet wurden, konnten zudem ausschließlich in den erkrankten Ebereschen spezifische PCR-Fragmente mit den jeweils erwarteten Größen amplifiziert werden. Dagegen konnte in RACE-Analysen die auf der Basis sämtlicher gewonnener Sequenzen aufbauten, unter Verwendung der Poly-A-Schwanz-spezifischen Primer bzw. klonspezifischer Primer, weder das virale 3'noch das 5'-Ende amplifiziert werden. Es ist somit anzunehmen, daß das Ebereschenvirus keinen Poly-A Schwanz besitzt, während ein VPg am 5'-Ende nicht auszuschließen ist. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde allerdings, aufgrund einer zweiten Primerbindungsstelle mit 80 % iger Übereinstimmung zur Primersequenz, ein ca. 1,5 kb großes Fragment (Klon V492_21) amplifiziert, das eine partielle Übereinstimmung mit dem Klon V272_33 aufwies. Die gesamte Sequenz wurde als Alignment_1 bezeichnet. Die Virusspezifität des Klons V492_21 konnte durch Northern- und Southern-Blot-Analysen bestätigt werden, wobei in den Northern-Blot-Analysen ein RNA-Muster auftrat, das in Größe und Anzahl der RNA-Moleküle dem dsRNA-Muster entsprach. Es daher zu vermuten, daß

das Ebereschenvirus ein monopartites Genom aufweist, wobei aufgrund der isolierten dsRNA-Muster und der Northern-Blot-Analysen anzunehmen ist, daß die genomische RNA 7,6 kb groß ist. In der Sequenzanalyse des Klons V492_21 wurde jedoch noch kein spezifischer Hinweis auf eine Virusgruppe oder ein spezifisches Virus gefunden.

Aufgrund einer fehlenden Sequenz-Homologie zwischen den Klonen V283_2/1 und dem Alignment_1 wurden RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt, um das potentielle Zwischenstück zu amplifizieren. Dabei wurde ein ca. 2,6 kb großes Fragment gewonnen, das jedoch nur mit dem Alignment_1 eine Übereinstimmung aufwies, wodurch eine 3838 bp lange korrigierte Gesamtsequenz ermittelt werden konnte. Auch bei diesen Untersuchungen konnte eine weitere Primerbindungsstelle für einen der verwendeten Primer nachgewiesen werden.

Ein Vergleich der korrigierten Gesamtsequenz mit der Datenbank zeigte auf der Proteinebene eine Homologie des 5'-Endes der Gesamtsequenz zwischen 19-27 % mit einer viralen RNAabhängigen RNA-Polymerase (RdRP) von verschiedenen Bunya- und Orthomyxoviren. Der Nachweis einer viralen RdRP ist der erste Hinweis auf ein Protein des Ebereschenviruses und bestätigt damit endgültig die virale Natur des Agens der Erkrankung der Eberesche.

6. Literatur

AAS, G. und HOLDENRIEDER, O.; 1992. Die Vogelbeere (Sorbus aucuparia L.) Der vielseitige Pionier. Wald und Holz 15, 48-50

ALBRECHTOVÁ, L., KARESOVA, R., PLUHAR, Z.; 1989: Zur Bewertung der Resistenz von Pflaumensorten und –hybriden gegenüber dem Scharka-Virus (plum pox virus). Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz 96 (5), 455-463

ATTOUI, H., BILLOIR, F., CANTALOUBE, J. F., BIABINI, P. DE MICCO, P., DE LAMBALLERIE, X.; 2000: Strategies for sequence determination of viral dsRNA genomes. J. Virol. Methods 89, 147-158

BATTEN, J. S., SCHOLTHOF, K.-B. G., MILLER, M., E., MARTYN, R. D.; 2000: cDNA probes detection of specific dsRNAs from the fungal *pathogen Monosporascus cannonballus*. J. Virol. Methods 84, 209-215

BAUR, E,; 1907: Über infektiöse Chlorosen bei Ligustrum, Laburnum, Fraxinus, Sorbus und Ptelea. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 25, 410-413

BENTHACK, W.; 1998: Virologische Untersuchungen an Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.). Diplomarbeit Universität Hamburg, 106 S.

BENTHACK, W., BÜTTNER, C., FÜHRLING, M. MÜHLBACH, H.-P., RENNENBERG, H., WERNER, R.; 1998: Untersuchungen an viruskranken *Sorbus aucuparia* L. (aus Eichenstandorten) mit PCR und Hybridisierung. BDGL-Schriftreihe Bd. 16, 11

BENTHACK, W., MIELKE, N., BÜTTNER, C. MÜHLBACH, H.-P.; 2000: Charakterisierung von dsRNA aus Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) mit unbekannter Virusinfektion. BDGL-Schriftreihe Bd. 18, 104

BIRNBOIM, H. C., DOLY, J.; 1979: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523

BOCCARDO, G., LISA, V., MILNE, R. G.; 1983: Cryptic viruses in plants. Adv. Virus Res. 32, 171-214

BRUENN, J. A.; 1990: Relationship among the positive strand- and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. NAR 19 (2), 217-226

BÜTTNER, C.; 1993: Viruserkrankungen an Laubgehölzen. Deutsche Baumschule 11, 552-554

BÜTTNER, C.; 1994: Die Verbreitung sowie die Bedeutung der Laubbaumvirosen als prädisponierender Faktor im Zusammenwirken mit anderen Stressoren im Ursachenkomples der Waldschäden. Habilitationsschrift. Universität Hamburg, 164 S.

BÜTTNER, C. und FÜHRLING, M.; 1993: Beobachtungen zu virusbedingten Symptomen an erkrankten Stieleichen (*Quercus robur* L.) – eine Abgrenzung zu ähnlichen, nicht virusbedingten Krankheitsbildern. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 45, 110-115

BÜTTNER, C., FÜHRLING, M., WERNER, R. MÜHLBACH, H.-P., LUKAS, N.; 1996: Phytopathogene Viren in Laubbäumen des öffentlichen Grüns und Baumschulen sowie in Böden und Gewässern – eine diagnostische Vorgehensweise. Gesunde Pflanze 48 (3), 95-103 CHIRGWIN, J. M., PRZYBYLA, a. E., MacDONALD, R. J., RUTTER, W. J.; 1979: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. Biochem. 18, 5294-5299

COFFIN, R. S. und COUTTS, R. H. A.; 1992: dsRNA cloning and diagnosis of beet pseudoyellows virus by PCR and nucleic acid hybridization. Intervirology 33, 197-203

COHEN, Y., GISEL, A., ZAMBRYSKI, P. C.; 2000: Cell-to-Cell and systemic movement of recombinant green fluorescent protein-tagged turnip crinkle viruses. Virology 273, 258-266

CONDIT, C. und FRAENKEL-CONRAD, H.; 1979: Isolation of replicative forms of 3'terminal subgenomic RNAs of tobacco necrosis virus. Virology 97, 122-130

COOPER, J. I.; 1993: Virus diseases of trees and shrubs. Second edition, Vlg. Chapman & Hall, London, 205 S.

CZARNIECKI, c. W., SREEVALSAN, T.; 1980: Sindbis virus RNA replication. II. strand composition and metabolic fate of the multi-stranded RNA-species. J. Gen. Virol. 48, 75-85

DALE, J. L., PHILLIPS, D. A., PARRY, J. N.; 1986: Double-stranded RNA in banana plants with bunchy top disease. J. Gen. Virol. 67, 371-375

DAWSON, O. W. und DODDS, J. A.; 1982: Charaterization of subgenomic double-stranded RNAs from virus-infected plants. Biochem. Biophys. Res. Commun. 170, 1230-1235

DAWSON, O. W., GERMAN, T. L., SCHLEGEL, D. E.; 1976: Homogeniszation-resistant and -susceptible components of tobacco mosaic replicative form RNA. J. Gen. Virol. 32, 205-215

DE AVILÁ, A. C., DE HAAN, P., KITAJIMA, E. W., KORMELINK, R., RESENDE, R. de O., GOLDBACH, R. W., PETERS, D.; 1992: Characterisation of a distinct isolate of tomato spotted wilt virus (TSWV) from *impatiens* spp. in the Netherlands. J. Phytopathology 134, 133-151

DE AVILÁ, A. C., HUGUENOT, C., RESENDE, R. de O, KITAJIMA, E. W., GOLBACH, R. W., PETERS, D.; 1990: Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. J. Gen. Virol. 71, 2801-2807

De CUVELAND, J. 1996: Gesund trotz schlechter Luft. Robust und ökologisch wertvoll: die Eberesche ist "Baum des Jahres 1997". Die Welt –Wissenschaft-, 01.11.1996

DING, X., SHINTAKU, M. H., CARTER, S. A., NELSON, R. S.; 1996: Invasion of minor veins of tobacco leaves inoculated with tobacco mosaic virus mutants defective in phloem-dependent movement. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11155-11160

DODDS, J. A., BAR-JOSEPH, M.; 1983: Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses. Phytopathology 73, 419-423

DODDS, J. A., JARUPAT, T., LEE, J. G., ROISTACHER, C. N.; 1987: Effects of strain, host, time of harvest and virus concentration on double-stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. Phytopathology 77, 442-447

DODDS, J. A., MORRIS, T. J. JORDAN, R. L.; 1984: Plant viral double-stranded RNA. Ann. Rev. Phytopathol. 22, 151-168

DODDS, J. A., VALVERDE, R. A., MATHEWS, M.; 1988: Detection and interpretation of dsRNA. In: Viruses of Fungi and simple eukaryotes. Koltin, Y. and Leibowitz, M. J. (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York, N. Y. S. 309-326

DONG, J.-Z. und DUNSTAND. I.; 1996: A reliable method for extraction of RNA from various conifer tissues. Plant Cell Reports 15, 516-521

EBERT, W.; 1973; Mehr Vogelbeerbäume für Landschaftspflege und Vogelschutz! Der Forstund Holzwirt 11, 216-217

EBRAHIM-NESBAT, F. und IZADPANAH, K.; 1992: Viruslike particles associated with ringfleck mosaic of mountain ash and mosaic diesase of raspberry in the Bavarian forest. Eur. J. For. Path., 22, 1-10

ELLIOTT, R. M.; 1989: Nucleotide sequence analysis of the large (L) genomic RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family *Bunyaviridae*. Virology 173, 423-436

FAIRBANKS, D. J., SMITH, S. E., BROWN, J. K.; 1988: Inheritance of large mitochondrial RNAs in alfalfa. Thero. Appl. Genet. 76, 619-622

FALK, B. W. und TSAI, J. H.; 1984: Identification of single- and double-stranded RNAs associated with mize stripe virus. Phyotathology 74, 909-915

FAZELI, C., F., HABILI, N., REZAIAN, M. A.; 1998: Efficient cloning of cDNA from grapevine leafroll-associated virus 4 demonstration of probe specificity by the viral antibody. J. Virol. Methods 70, 201-211

FÖRSTEL-NEUHAUS, A.; 1991: Untersuchungen über Reaktionen von Pappelklonen auf die Infektion des Pappelmosaikvirus (PoMV) mit und ohne Belastung durch Luftverunreinigungen und klimatischen Streß. Dissertation Universität Bonn, 147 S.

FUCHS, E. und GRÜNTZIG, M.; 1994: Der serologische Nachweis von mechanisch übertragbaren Viren des Kern- und Steinobstes. Nachrichtenbl. Pflanzenschutz DDR 42, 208-211

FUCHS, E. OTTO, G., GRÜNTZIG, M.; 1993: Beitrag zur Ermittlung quantitativer Resistenz bei den Virus/Wirt-Kombinationen PNRV/Sauerkirsche, PPV/Pflaume und ApMV/Apfel. Nachrichtenbl. Pflanzenschutz DDR 42, 208-211

FUKUHARA, T., MORIYAMA, H., PAK, J. K., HYAKUTAKE, T., NITTA, T.; 1993: Enigmatic double-stranded RNA in Japonica rice. Plant Molecular Biology 21, 1121-1130

FÜHRLING, M.; 1994: Virologische Studien an erkranken Stieleichen (*Quercus robur* L.) und Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) in Norddeutschland sowie Untersuchungen von stoffwechselphsysiologischen Veränderungen durch abiotische Stressoren an ausgewählten virusinfizierten Forstgehölzen. Dissertation Universität Hamburg, 142 S.

FÜHRLING, M. und BÜTTNER, C.; 1995: Transmission experiments of viruses to woody seedlings (*Quercus robur* L. and *Sorbus aucuparia* L.) by grafting and mechanical inoculation. Euro. J. For. Path. 25, 131

FÜHRLING, M. und BÜTTNER, C.; 1998: Studien zum Auftreten der Ringfleckigkeit und Scheckung der Blätter von Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) Forstw. Cbl. 117, 327-338

GARGOURI, R., JOSHI, R. L., BOL; J. F., STIER-MANIFACIER, S., HAENNI, A.-

L.; 1989: Mechanism of synthesis of turnip yellow mosaic coat protein subgenomic RNA *in vivo*. Virology 171, 386-393

GERMAN, S., CANDRESSE, T., LE GALL, O., LANNEAU, M., DUNEZ, J.; 1992: Analysis of the dsRNAs of apple chlorotic leaf spot virus. J. Gen. Virol. 73, 767-773

GIBBS, M. J., KOGA, R., MORIYAMA, H., PFEIFFER, P., FUKUHARA. T.; 2000: Phylogenetic analysis of some large double-stranded RNA replicons from plants suggests they evolved from a defective single-stranded RNA virus. Journal of Gen. Virol. 81, 227-233

GILDOW, F. E., BALLINGER, M. E., ROCHOW, W. F., 1983: Identification of doublestranded RNA associated with cytoplasmatic male sterility in *Vicia fava*. Proc Nat. Acad. Sci. 78, 7043-7046

GOODIN, M. M.; 1995: Characterization of two viruses associated with *Agaricus bisporus*. Dissertation, Pennsylvania State University, University Park. 167 S.

GOWDA, S., SATYANARAYANA, T., NAIDU, R. A., MUSHEGIAN, A., DAWSON, W. O., REDDY, D. V. R.; 1998: Characterization of large (L) RNA of peanut bud necrisis *tospovirus*. Arch. Virol. 143, 2381-2390

GREGER, O.; 1987; Waldgeschichte und Waldbau im Hochharz. Der Forst- und Holzwirt 10, 264-269

GRILL, L. K. und GARGER, S. J.; 1981: Identification and characterisation of double-stranded RNA associated with cytoplasmatic male sterility in *Vicia faba*. Proc Natl. Acad. Sci. USA 78, 7043-7046

HAMACHER, J.; 1994: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Laubbäumen unter verschiedenen Stresswirkungen. Dissertation, 179 S, Dr. Kovac Verlag Hamburg

HENSON, J. M. und FRENCH, R.; 1993: The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol. 31, 81-109

HILLEBRAND, K. und LEDER, B., 1995. Auch die Vogelbeere kann erhebliche Dimensionen erreichen. AFZ 49, 582-584

HILLEBRAND, K. und ROSENBERG, A.; 1996. Hinweise zu höhenzonalem Wachstum und Ökotypen der Vogelbeere. Forst und Holz 51, 216-220

IWANAMI, T. KONDO, Y. KARASEV, A. V.; 1999: Nucleotide sequence an taxonomy of satsuma dwarf virus. J. Gen. Virology 80, 793-797

JELKMANN, W., 1995: Cherry Virus A: cDNA cloning of dsRNA nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. J. Gen. Virol. 76, 2015-2024

JELKMANN, W., KUNZE, L., VETTEN, h.-J., LESEMANN, D.-E.; 1992: cDNA cloning of dsRNA associated with apple stem pitting disease and evidence for the relationship of the virus-like agents associated with apple stem pitting and pear vein yellows. Acta Horticulutrare 309, 55-62

JELKMANN, W., MARTIN, R. R., MAIB, E.; 1989: Cloning of four plant viruses from small quantities of double-stranded RNA. Phytopathology 79, 1250-1253

JORDAN, R. L. DODDS, J. A. OHR, H. D.; 1983: Evidence for viruslike agents in avocado. Phytopathology 79, 1250-1253

KAUFMANN, A., LI, Y., KOENIG, R., BREYEL, E., MAIB, E., LÜDDECKE, P., COMMANDEUR, U.; 1992: Single- and double-stranded RNAs associated with an isolate of beet soil-borne virus. Intervirology 32, 97-102

KEGLER, H.; 1960: Das Ringfleckenmosaik der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.). Phytopathol. Z. 37, 214-216.

KOENIG, R., COMMANDEUR, U., LOSS, S., BEIER, C. KAUFMANN, A., LESEMANN, D.-E.; 1997: Beet soil-born virus RNA 2: similarities and dissimilarities to the coat protein genecarrying RNAs of other furoviruses. J. Gen. Virol. 78, 469-477

KEIM-KONRAD, R. und JELKMANN, W.; 1996: Genom analysis of the 3'-terminal part of little cherry disease associated dsRNA reveals a monopartite clostero-like virus. Arch. Virol. 141, 1-14

KONTZOG, H.-G., KLEINHEMPEL, H., MATSCHKE, J.; 1990: Combined effects of environmental stress and virus infection on the growth of forest trees. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz, Berlin 26,359-362

LAULHERE, J. P. und ROZIER, C.; 1976: One-step extraction of plant nucleic acids. Plant Science Letters 6, 237-242

LAW, M. D. und MOYER, J. W.; 1990: A Tomato spotted wilt-like virus with serologically distinct N protein. J. Gen. Virol. 71, 933-938

LEDER, B., 1989: Schädigung der Weichhölzer durch Eisanhang. AFZ 44, 50.

LEDER, B. 1992: Weichhölzer: Vejüngungsökologie. Jugendwachstum und Bedeutung in Jungbeständen der Hauptbaumarten Buche und Eiche. Schr. LaFo-NRW (Sonderbd.): arnsberg. 413 S.

LEFEBRE, A., SCALLA, R., PFEIFFER, P.;1990: The double-stranded RNA associated with the '447' cytoplasmatic membranous vesicles. Plant Molecular Biology 14, 477-490

LI, C., YOCHIKAWA, N., TAKAHASHI, T., ITO, T., YOSHIDA, K. KOGANEZAWA, H.; 2000: Nucleotide sequence and genome organisation of Apple latent spherical virus: a new virus classified into the family *Comoviridae*. J. Gen. Virology 81, 541-547

LUISONI, E., MILNE, R. G., ACCOTTO, P., BOCCARDO, G.; 1987: Cryptic viruses in hop trefoil (*Medicago lupulina*) and their relationship to other cryptic viruses in legumes. Intervirology 28, 144-156

MAIA, I. G., GONCALVES, M. C., ARRUDA, P., VEGA, J.; 2000: Molecular evidence that sugarcane yellow leaf virus is a member of the *luteoviridae* family. Arch. Virol. 145, 1009-1019 MAIB, e., BREYEL, E., CASPER, R., LESEMANN, D. E.; 1987: Detection of plum pox virus by isolation of double-stranded ribonucleic acid (dsRNA). Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 17, 91-95

MARTELLI, G. P., JELKMANN, W.; 1998: *Foveavirus*, a new plant virus genus. Arch. Virol. 143 (6), 1245-1249

MATTHEWS, R. E. F.; 1991: Plant Virology. Academic Press, London, Inc. 3rd ed., 835 S.

MAWASSI, M., MIETKIEWSKA, E., HILF, M. E., AOULIN, L., KARASEV, A., GAFNY, R., LEE, R. F., GARNSEY, S. M., DAWSON, W. O., BAR-JOSEPH, M.; 1995: Multiple species of defective RNAs in plants infected with Citrus tristeza virus. Virology 214, 264-268

MENG, B., PAN, S., FORSLINE, P. L., McFERSON, J. R., GONSALVES, D.; 1998: Nucleotide sequence and genome structure of grapevine rupestris stem pitting associated virus-1 reveal similarities to apple stem pitting virus. J. Gen. Virol. 79, 2059-2069

MIELKE, N., 1999: Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren aus Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) mit virusähnlichen Krankheitssymptomen. Diplomarbeit Universität Hamburg, 82 S.

MÄKINEN, K., MÄKELÄINEN, K., ARSHAVA, N., TAMM, T., MERTIS, A., TRUVE, E., ZAVRIEV, S., SAARMA, M.; 2000: Caracterization of VPg and the polyprotein processing of cocksfoot mottle virus (genus Sobemovirus). J. Gen. Virol. 81, 2783-2789

MORIYAMA, H., HORIUCHI, H., KOGA, R., FUKUHARA, T.; 1999: Molecular characterisation of two endogenous double-stranded RNAs in rice and their inheritance by interspecific hybrids. Jounral of Biological Chemistry 274, 6882-6888

MORIYAMA, H., KANAYA, K., WANG, J. Z., NITTA, T. FUKUHARA, T.; 1996: Stringently and developmentally regulated levels of a cytoplasmatic double-stranded RNA and its high-efficiency transmission via egg and pollen in rice. Plant Molecular Biology 31, 713-719

MORIYAMA, H., NITTA, T., FUKUHARA, T.; 1995: Double-stranded RNA in rice: a novel RNA replicon in plants. Mol. Gen. Genet. 248, 364-369

MORRIS, T.J. und DODDS, J. A.; 1979: Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. Phytopathology 69, 854-858

MORY, B. 1997: Baum des Jahres 1997. Die Eberesche-*Sorbus aucuparia.* http://www.bgbm.fuberlin.de/bgbm/pr/Pflanzen/Baum+des+Jahres/1997+ +Die+Eberesche+ +Sorbus+aucuparia.htm. Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem, Referat PR, 14.01.1997

MOYER, J. W.; 1999: Tospoviruses (Bunyaviridae). In: Granoff, A., Webster, R. G. (eds) Encyclopaedia of virology. Academic Press, New York, S. 1803-1807

MUMFORD, R. A., BARKER, I. WOOD, K. R.; 1996: The biology of the tospoviruses. Ann. Appl. Biol 128, 159-183

NAMVAR, K. und SPETHMANN, W.; 1985: Die Baumarten der Gattung Sorbus: Vogelbeere, Mehlbeere, Elsbeere und Speierling. AFZ 36, 937-943

NASSUTH, A., POLLARI, E., HELMECZY, K., STEWART, S., KOFALVI, S. A.; 2000: Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. J. Virol. Methods 90, 37-49

NEWBURY,H. J., und POSSINGHAM, J. V.; 1979: Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissue containing interfering phenolic compounds. Plant Physiol. 60, 543-547

NIENHAUS, F.; 1985: Krankheitsentstehung und Symptome. In: Viren, Mycoplasmen und Rickttsien. (ed. F. Nienhaus), Ulmer Verlag Stuttgart, S. 168-206

NIENHAUS, F.; 1985: Zur Frage der parasitären Verseuchung von Forstgehölzen durch Viren und primitive Mikroorganismen. Allg. Forstz. 6, 119-124

NIENHAUS, F. und CASTELLO, J. D.; 1989: Viruses in forest trees. Ann. Rev. Phytopathology 27, 165-186

OKAYAMA, H., BERG, P., 1982: High-efficiency cloning of full-length cDNA. Mol. Cell. Biol. 2, 161

O'REILLY, E. K. und KAO, C. C.; 1998: Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guide by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. Virology 252, 287-303

OSAKI, H., KUDO, A., OHTSU, Y.; 1998: Nucleotide sequence of seed- and pollen-transmitted double-stranded RNA which encodes a putative RNA-dependent RNA polymerase, detected from Japanese pear. Biosc. Biotechnol. Biochem. 62 (11), 2101-2106

PARES, R. D., GILLINGS, M. R., GUNN, L. V.; 1992: Differentiation of biologically distinct cucumber mosaic virus isolates by PAGE of double-stranded RNA. Intervirology 34, 26-29

PFEIFFER, P.; 1998: Nucleotide sequence, genetic organisation and expression strategy of the double-stranded RNA associated with the '447'cytoplasmatic male sterility in *Vicia faba*. Journal of Gen. Virol. 79,2349-2358

PICH, U., HOUBEN, A., FUCHS, J., MEISTER, A., SCHUBERT, I.; 1994: Utility of DNA amplified by degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR) from the total genome and defined chromosomal regions of field bean. Mol. Gen. Genet. 243, 173-177

POLÁK, Z., OUKROPEC, I., KOMINEK, P., KRISKA, B., BITTOOVA, M.; 1997: Detection and evaluation of resistance of apricots and peaches to plum pox virus. Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz 104 (5), 466-473

POÁK, Z., PROCHÁZKOVÁ, Z., BRANIAOVÁ, H.; 1990: Recent findings of viruses of forest trees on the territory of the Czech Republic. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz, Berlin 26, 389-393

POLÁK, Z. und ZIEGLEROVA, J.; 1996: Towards ringspots and variegation in mountain ash leaves. Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz 103, 432-435

Pressemitteilung SDW, 1997: Presseinformation vom 25.04.1997-,, Tag des Baumes" Schutzgemeinschaft Deutscher Wald fördert die Anpflanzung der Eberesche. Schutzgemeinschaft Deutscher Wald e. V.: http://www.dainet.de/sdw/presse/pr_1597.htm

QIAN, B. und KIBENGE, F. S. B.; 1994: Observation on polymerase chain reaction amplification of infectious bursal disease virus dsRNA. J. Virol. Methods 47, 237-242

SCHMELZER, K.; 1977: Zier-, Forst- und Wildgehölze. In: Pflanzliche Virologie, Bd. 4 (eds. K. Schmelzer und D. Spaar). Akademie Verlag Berlin, 276-405

RASPÉ, O., JACQUEMART, A.-L.; 1998: Allozyme diversity an genetic structure of European populations of *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae: Maloideae).Heredity 81,537-545

RASPÉ, O., SAUMITOU-LAPRADE, P. CUGUEN, J., JACQUEMART, A.-L.; 2000:

Chloroplast DNA haplotype variation and population differentiation in *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae: Maloideae.: Molecular Ecology 9, 1113-1122

RENNECKE, B., 1998: Molekularbiologische und serologische Charakterisierung des little cherry Closterovirus (LChV) und *in vivo* Nachweis des ribosomalen frameshifts zur Expression der RNA-Polymerase. Dissertation Universität Hamburg, 99 S.

REVILL, P. A., WRIGHT, P. J.; 1997: RT-PCR detection of dsRNA associated with La France disease of cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange). Imbach. J. Virol. Methods 63, 17-26

REZAIAN, M. A., KRAKE, L. R.; 1987: Nucleic acid extraction and virusdetection in grapevine. J. Virol. Methods 17, 277-285

REZAIAN, M. A., KRAKE, L. R., CUNYING, Q., HAZZAKIN, C. A.; 1991: Detection of virus-associated dsRNA from leafroll infected grapevines. J. of Virol. Methods 31, 325-334

ROLOFF, A.; 1997: Der Baum des Jahres 1997: Die Eberesche oder Vogelbeere (*Sorubs aucuparia* L.). IN: Jahrbuch der Baumpflege 1997 (eds. D. Dujesiefken und P. Kockerbeck). Thalacker-Medien, Braunschweig, S. 141-145

ROWHANI, A., MANINGAS, M. A., LILE, L. S., DAUBERT, S. D., BOLINO, D. A.; 1995: Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilised virions. Phytopathology 85, 347-352

RYABOVE. V., ROBINSON, D. J., TALIANSKY, M. E.; 1999: A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of herterologues viral RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 1212-1217

SABANADZOVIC, S., ABOU-GHANEM, N., CASTELLANO, M., DIDIARO, M., MARTELLI G. P. MARTELLI, G. P.; 2000: Grapevine fleck virus-like viruses in *vitis*. Arch. Virol. 145, 553-565

SAMBROOK, J., FRISCH, E. F., MANIATIS, T., 1989: Molecular cloning: a laboratory manual (2nd ed.). Cold Spring Laboratory Habor Press, New York

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R.; 1977: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467

SCHIMANSKI, H.-H., KEGLER, H., FUCHS, E.; 1987: Wild-growing woody rosaceous plants as natural reservoirs of pome and stone fruit viruses. Zentralbl. Mikrobiol. 142, 239-255

SÈRON, K., HAENNI, A.-L.; 1996: Vascular movement of plant viruses. MPMI 9 (6), 435-442

SONG, S. I., SONG, J. T., KIM, C. H., LEE, J. S., CHOI, Y. D.; 1998: Molecular characterization of garlic virus X genome. J. Gen. Virology 79, 155-159

STARK-LORENZEN, P., GUITTON, M.-C., WERNER, R., MÜHLBACH, H.-P.; 1997: Detection and tissue distribution of potato spindle tuber viroid in infected tomato plants by tissue print hybridization. Arch. Virol. 142, 1289-1296

SWEET, J. B.; 1980: Fruit tree virus infections of woody exotic and indigenous plants in Britain. Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae 15 (1-4), 231-238

SWEET, J. B. und CAMPBELL, A. I.; 1976: Pome fruit virus infections of some woody ornamental and indigeneous species of *Rosaceae*. J. Hort. Sci. 51, 91-97

TACAHASHI, Y. und UYEDA, I.; 1999: Restoration of the 3'end of potyvirus RNA derived from poly (A)-deficient infectious cDNA clones. Virology 265, 147-152

TELENIUS, H., CARTER, N. P., BEBB, C. E., NORENSKJOLD, M., PONDER, B. A., TUNNACLIFFE, A.; 1992: Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. Genomics 13, 718-725

THOMSON, D. und DIETZGEN, R. G.; 1995: Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. J. Virol. Methods 54, 85-95

VALVERDE, R. A., DODDS, J. A., HEICK, J. A.; 1986: Double-stranded ribonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. Phytopathology 76, 459-465

VALVERDE, R. A. und FONTENOT, J. F., 1990: Variation in double-stranded ribonucleic acid among pepper cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science 116, 903-905

VALVERDE., R. A., NAMETH, S. T., JORDAN, R. L.; 1990: Analysis of double-stranded RNA for plant viruses diagnosis. Plant Disease 74, 255-258

VASKOVÁ, D., PETRZIK, K. KARESOVÁ, R.; 1999: Variability and molecular typing of woody-tree infecting prunus necrotic ringspot ilarvirus. Arch. Virol. 145, 699-709

VIVES, M. C., RUBIO, L., LÓPEZ, C., NAVAS-CASTILLO, J., ALBIACH-MARTÍ, M. R., DAWSON, W. O., GUERRI, J., FLORES, R., MORENO, P.; 1999: the complete genome sequence of the major component of a mild citrus tristeza virus isolate. J. Gen. Virol. 80, 811-816

WAKARCHUK, D. A. und HAMILTON, R. I., 1985: Cellular double-stranded RNA in *Phaseolus vulgaris*. Plant Molecular Biology 5, 496-499

WARD, C. W.; 1993: Progress towards a higher taxonomy of viruses. Res. Virol. 144, 419-453

WEIHS, U.; 1995: Die Eberesche – eine ökologisch wertvolle Baumart bei der Walderneuerung auf Problemstandorten. Weichlaubhölzer. Schr. LÖBF 4, 69-82

WENG, Z. und XIONG, Z.; 1995: A method for accurate determination of terminal sequence of viral genomic RNA. Genome Research 5, 202-207

WERNER, R., MÜHLBACH, H.-P. BÜTTNER, C.; 1997: Detection of cherry leaf roll nepovirus (CLRV) in birch, beech and petunia by immuno-capture RT-PCR using a conserved primer pair. Euro. J. For. Path. 27, 309-318

WERNER, R., MÜHLBACH, H.-P. BÜTTNER, C.; 1997a: Detection of poplar mosaic carlavirus (PoMV) by immunocapture RT-PCR. In: Diagnosis and identification of plant pathogens. Kluwer Academic Puplishers, AA Dordrecht, The Netherlands S. 403-405

XU, P., ROOSSINCK, M. J.; 2000: Cucumber mosaic virus D satellite RNA-induced programmed cell death in tomato. Plant Cell, 12 (7), 1079-1092

ZABALGOGEAZCOA, I. A. und GILDOW, F. E.; 1992: Double-stranded ribonucleic acid in 'Barsoy' barley. Plant Sci. 83, 187-194

ZANOTO, P., A., GIBBS, M., GOULD, E. A., HOLMES; E.; 1996: A reevaluation of higher taxonomy of viruses based on RNA polymerases. J. Virology 70 (9), 6083-6096

ZELCER, A., WEABER, K. F., BALÀZS, E., ZAITLIN, M..; (1981): The detection and characterization of viral-related double-stranded RNAs in Tobacco Mosaic Virus-infected plants. Virology 113, 417-427

ZERBE, S. 1993: Die Eberesche (*Sorbus aucuparia*) in Wald- und Gebüschgesellschaften unter besonderer Berücksichtigung schuztwürdiger Ebereschen-Buchenwälder in hochmontanen Lagen des Thüringer Waldes. Fragm. Florist. et Geobot 38 (1), 183-198

ZHANG, Y.-P., KIRPATRICK, B. C., SMART, C. D., UYEMOTO, J. K.; 1998: cDNA cloning and molecular characterization of cherry green ring mottle virus. J. Gen. Virol. 79, 2275-2281

ZHANG, Y.-P., ROWHANI, A.; 2000: A strategy for rapid cDNA cloning from double-stranded RNA templates isolated from plants infected with RNA viruses by using Taq DNA polymerase. J. Virol. Methods 84, 59-63

ZHANG, Y.-P.,UYEMOTO, J. K., GOLINO, D. A., ROWHANI, A.; 1998a: Nucleotide sequence and RT-PCR detection of a virus associated with grapevines rupestris stem-pitting disease. Phytopathology 88, 1231-1237

ZHANG, Y.-P., UYEMOTO, J. K., KIRKPATRIK, B. C.; 1998b: Analysis of double-stranded RNAs from cherry trees with stem pitting in California. Plant Disease 82, 871-874

ZHU, Y., GREEN, L., WOO, Y.-M., OWENS, R. DING, B.; 2001: Cellular basis of potato spindle tuber viroid movement. Virology 279, 69-77

7. Anhang

7.1 Vektorkarte



Abb. 60: Vektorkarte: pCR[®] 2.1-TOPO

7.2 Sequenzen

Im folgenden sind die Sequenzen der Klone V272_33 (Abb. 61), V283_2/1 (Abb. 62), des Alignment_1 (Abb. 63) sowie der Konsensussequenz (Abb. 64) dargestellt.

3 TTATGTGCTTCTAGATATTCTAGGACCAAATTGACAAGAAGGTATGAGTAAGTGCGTT	
AATTGTAAACGACCAAAAGAAGTTTGAGGAATGATGTTTGCAATCCTCAACTGTGGGGCA TTAACATTTGCTGGTTTTCTTCAAACTCCTTACTACAAACGTTAGGAGTTGACACCCCGT	
TAATCAGAAGCTATTTTTTTAGAGATCTCATCAAATGCCTGTCTATGTTGCATGCCATGT ATTAGTCTTCGATAAAAAAATCTCTAGAGTAGTTTACGGACAGATACAACGTACGGTACA	
CTCAATAATAGCATCGAAAAAGTGACACCACCACCAATCGTTTTGGTCTGGACTTTAACA GAGTTATTATCGTAGCTTTTTCACTGTGGTGGTGGTTAGCAAAACCAGACCTGAAATTGT	
ACTGTTGATTGATACATATAAAGTGCAATTGAAGCATTTGGATCTAAAGGTTCACTGTCA TGACAACTAACTATGTATATTTCACGTTAACTTCGTAAACCTAGATTTCCAAGTGACAGT	
GTTTTCATCAACCAATGATTCCAGACACGCCTGTTCAGATTCATGACTCTCATTAATGTT CAAAAGTAGTTGGTTACTAAGGTCTGTGCGGACAAGTCTAAGTACTGAGAGTAATTACAA	
TGGAAATTTATTTCATTCATCATGTAAAGAAATAGATTGTAGCTGAAATCTGTTGTGCTT ACCTTTAAATAAAGTAAGTAGTACATTTCTTTATCTAACATCGACTTTAGACAACACGAA	
TTCATTTCAGCAATTATATCAGAGTATTTCCAACTGAAATCTGGAAATCAGGTGATTCAG AAGTAAAGTCGTTAATATAGTCTCATAAAGGTTGACTTTAGACCTTTAGTCCACTAAGTC	
TCATTTGGATGAATAAACTAGGATCATTTGCAACTAGAGAACAAATGAATTTAAATGGTT AGTAAACCTACTTATTTGATCCTAGTAAACGTTGATCTCTTGTTTACTTAAATTTACCAA	
CACGTAAATTCCTTACTTTCATTGTTG 3	

GTGCATTTAAGGAATGAAAGAAGTAACAAC 5

Abb. 61: Sequenz des Klons V72_33

 $\begin{array}{l} 5`TGTTGTGTGTTGTTGTACAAAATATCTGTGTGTTGTTGAATCATGCTTACAAATCAAT\\ 3`ACAACAACAACAACATGTTTTATAGACACAACAACATTAGTACGAATGTTTAGTTA\\ \end{array}$

 ${\tt GTGTGGCAACTGTCAGATGACTCATAGGTGACTGAAATTTTCACACCATTCTGACAATCA}\\ {\tt CACACCGTTGACAGTCTACTGAGTATCCACTGACTTTAAAAGTGTGGTAAGACTGTTAGT}$

 ${\tt TAGCAGCCATAAACTTCAATTTTTTTAACAGATACAAGCGATTCACAAAAACCACCAGCT\\ {\tt ATCGTCGGTATTTGAAGTTAAAAAAATTGTCTATGTTCGCTAAGTGTTTTTGGTGGTCGA$

AAATAACCCCACATC 3 TTTATTGGGGTGTAG 5

Abb. 62: Sequenz des Klons V283_2/1

 $5 \ 'CCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGC\\ 3 \ 'GGTACTAATGCGGTTCGAACCATGGCTCGAGCCTAGGTGATCATTGCCGGCGGTCACACG$

 ${\tt TGGAATTCGCCCTTGACACTCTATCTCGTTCAAATGTGGGACTGATTATTGTTACGATCT\\ {\tt ACCTTAAGCGGGAACTGTGAGATAGAGCAAGTTTACACCCTGACTAATAACAATGCTAGA$
GATTTATGGTGTTTTCTTTATAGGCAATATCTGGTTTAAGATCAGTTAAAGCTGCTATAT CTAAATACCACAAAAGAAATATCCGTTATAGACCAAATTCTAGTCAATTTCGACGATATA

 ${\tt TAACATTACAAATACACGAAGATCTATAAGATCCTGGTTTAACTGTTCTTCCATACTCATACTCATATGTAATGTTTATGTGCTTCTAGATATTCTAGGACCAAATTGACAAGAAGGTATGAGTA$

 $\label{eq:gcgcataatcagaagctatttttttagagatctcatcatcatgcctgtctatgttgcacagcacagatacaacgtctcatgtctatgtcttcgataaaaaatctctagagtagtttacggacagatacaacgt$

 $\label{eq:cactgtcagtttcatcaaccaatgattccagacacgcctgttcagattcatgactctca} GTGACAGTCAAAAGTAGTTGGTTACTAAGGTCTGTGCGGACAAGTCTAAGTACTGAGAGT$

 ${\tt GTGATTCAGTCATTTGGATGAATAAACTAGGATCATTTGCAACTAGAGAACAAATGAATTCACTAAGTCAGTAAACCTACTTATTTGATCCTAGTAAACGTTGATCTCTTGTTTACTTAA$

 ${\tt TAAATGGTTCACGTAAATTCCTTACTTTCTTCATTGTTGGCATTAGTTTTTCATTTGCGGATTAACCAAGTGCATTTAAGGAATGAAAGAAGTAACAACCGTAATCAAAAAGTAAACGCC$

 ${\tt CAAATCTTGACAACCAATATTCATCAAACCTGTTGGTTCTTATATGTGATATGTATATTTTGTTAGAACTGTTGGTTATAAGTAGTATTGGACAACCAAGAATATACACTATACAATATAAA$

 $\label{eq:tradist} TTGATGATATTTCATCTCTTCATTAAAGAATCTAATGTCATTATGATGGAATTTGGAG\\ AACTACTATAAAGTAGAGAGAAGTAATTTCTTAGATTACAGTAATACTACCTTAAACCTC\\ \end{array}$

 $\label{eq:constraint} \textbf{ACCTGACCATTAATCCTTGGAATATTAGCTTGTTATTGTACACATCAAATGCATATTCTGTGGACTGGTAATTAGGAACCTTATAATCGAACAATAACATGTGTAGTTTACGTATAAGAC$

 ${\tt CCAAATGTTGATGAGGTTGAATTAGACCCATGGTTGCATCTTTTAATGTGTATTTAAATTGGTTTACAACTACTCCAACTTAATCTGGGTACCAACGTAGAAAATTACACATAAATTTAA$

 ${\tt CAATATATTTCCTGAAATCATCATCAATATCTTCAGGATCTCTATAGATCTTAATATCAC}\\ {\tt GTTATATAAAGGACTTTAGTAGTAGTAGTATATAGAAGTCCTAGAGATATCTAGAATTATAGTG}$

 $\label{eq:cacaccgctgcagaacatgtttgcagaatgatgatgatttttcaacctttgaatcaacttgtgtgcgacgtcttgtacaaacgtcttactatacttaaaagttggaaacttagttgaa$

 ${\tt TACCATATTCTTCAGCATATACACTTCTTGGCATAATAACCTTTGTAAATTCAGGTCGAG\\ {\tt ATGGTATAAGAAGTCGTATATGTGAAGAACCGTATTATTGGAAACATTTAAGTCCAGCTC\\ {\tt C}$

 ${\tt TTTTAACTAATACCTGTACTTTGCTATAGTATACTTGAAGTGCGACCAGAGATTTTTTTAAAAATTGATTATGGACATGAAACGATATCATATGAACTTCACGCTGGTCTCTAAAAAAAT$

GATATTTTATCATCAAGCTTCTTATAGATAGTTTTTATACCCTGTTTCTTTTCTTTTCA

CTATAAAATAGTAGTTCGAAGAATATCTATCAAAAATATGGGACAAAGAAAAGAAAAAGT

 $\label{eq:construction} TCAAGTGCAGATTTCGAAAATATTAGTGAAATCTTTAAAGTTTTGGATTCATGTAAATTTGCC\\ AGTTCACGTCTAAAGCTTTTATAATCACTTAGAAATTTCAAACCTAAGTACATTAAACGG\\ \end{array}$

ACACAGCTAGTCAA3` ATACCTTATGTGTT5`

Abb. 63: Sequenz des Alignment_1

5 ' ATGTGTGGCAACTGTCAGGAATTAGGAAATAATGGTAATCTATCATTCTCATTTCAAGCA 3 ' TACACACCGTTGACAGTCCTTAATCCTTTATTACCATTAGATAGTAAGAGTAAAGTTCGT

ATGTTTTTAACTTCCAAAGTGGCATATGCAAAGTTATTGAACAACACTGATGAAATAAGG TACAAAAATTGAAGGTTTCACCGTATACGTTTCAATAACTTGTTGTGACTACTTTATTCC

 $\label{eq:timestata} TTGATATAAAGACAAATTGAACAAAGGTATTGTTTTATTGCCTAAACTGATATTAACAAACTAATATTTCTGTTTAACTTGTTTCCATAACAAAATAACGGATTTGACTATAATTGT$

 ${\tt GAAATTCAAGAAGAAAAATTAAGAGGGTTTTATAAAGGATATATAACAGAAGGGGATCTT\\ {\tt CTTTAAGTTCTTCTTTTTAATTCTCCCAAAATATTTCCTATATATTGTCTTCCCCTAGAA}$

 ${\tt TTGGTAAGAATCTTTAATAAAGATCAAAGGACCACAGATGATCGTGAAATCTACACAGGT\\ {\tt AACCATTCTTAGAAATTATTTCTAGTTTCCTGGTGTCTACTAGCACTTTAGATGTGTCCA$

 ${\tt CAACGTCTTGCATTGATAAAAACTAAAAGACAATTTAACAAGTCAGGTTATAAAACTGAGGTTGCAGAACGTAACTATTTTGATTTTCTGTTAAATTGTTCAGTCCAATATTTTGACTC$

 $\label{eq:construct} a tatta a gcatter can be a constructed a tatta to the tatta to the tatta a construction of tatta a construction$

 $TTATTGGTTAGGTATTATGATAAAAAGATAGTGTTAACAGATTCTGCCTTTAGTAATGCT\\ AATAACCAATCCATAATACTATTTTTCTATCACAATTGTCTAAGACGGAAATCATTACGA$

TTAAGATTTAGTAGAGAAGATATCAATGGTAAATATGAAGAGATGACTAACAATTTTACA

AATTCTAAATCATCTTCTTATAGTTACCATTTATACTTCTCTACTGATTGTTAAAATGT

 ${\tt CAAAACTGGTTTAATGTTAGATCTAATTGGCTACAGGGCAATCTCAACATGACCTCATCAGTTTTGACCAAATTACAATCTAGATTAACCGATGTCCCGTTAGAGTTGTACTGGAGTAGT$

 ${\tt TTTGTTCATCATTGTAGTACAATTATGACTGATACGCTTTTATCAATTAGTGCTAAACACAAAACAAGTAGTAACAACATGTTAATACTGACTATGCGAAAATAGTTAATCACGATTTGTG$

 $\label{eq:transform} TTTATAATTCGCTGATAACATACTCAAACAAGAAACACTGTATAACTTTAAATGAAAAGAAAAGAAATATTAAAAGCGACTATTGTATGAGTTTGTTCTTTGTGACATATTGAAATTTACTTTTC$

 ${\tt CTATTTTTCTTTTACATGGCTGATCTTATGCCCATATCTAGCGACACTAGTTACAAGTCT\\ {\tt GATAAAAAGAAAATGTACCGACTAGAATACGGGGTATAGATCGCTGTGATCAATGTTCAGA$

 ${\tt CCTATTCAAATTTTGAAATGTGCAATCACTCTCCTAAATCATCTAACATTATCAACATATGGATAAGTTTAAAAACTTTACACGTTAGTGAGAGGATTTAGTAGATTGTAATAGTTGTATA$

AACATGCAATATACTTCTGAGAAGAATCCTAGATGTAATATACCAAATTCTACTGATTTG TTGTACGTTATATGAAGACTCTTCTTAGGATCTACATTATATGGTTTAAGATGACTAAAC CCTATACAGATTTATCCAAGATATAAATTACCATTATCATTAGCTGGTTGTATTCCATAT GGATATGTCTAAATAGGTTCTATATTTAATGGTAATAGTAATCGACCAACATAAGGTATA

 $\label{eq:constraint} A CACTTGTGAATAAGCAAAAAGCCTGAATATGCCAAAATATATTCAAGCTTGCCTATTGACTTGTGAACAACTTATTCGTTTTCGGAACTGAACTGATAACTGAACGGATAACTGA$

ACTTATACTTATAAAAAATATTTAGAAAATGAAACAGATATTAGATTGACTAGCTGTGTG TGAATATGAATATTTTTTATAAATCTTTTACTTTGTCTATAATCTAACTGATCGACACAT

 ${\tt GAAAAAGAAAAGAAACAGGGTATAAAAACTATCTATAAGAAGCTTGATGATAAAATATCT\\ {\tt CTTTTTCTTTTCTTTGTCCCATATTTTGATAGATATTCTTCGAACTACTATTTTATAGA$

CGACCTGAATTTACAAAGGTTATTATGCCAAGAAGTGTATATGCTGAAGAATATGGTAAA

GCTGGACTTAAATGTTTCCAATAATACGGTTCTTCACATATACGACTTCTTATACCATTT

 ${\tt AATTCCAACATCTATGGTTGAAAATTTATTGGTGGAACAGTACTGTGAGATAGAGCAATTAAGGTTGTGTAGATACCAACTTTTAAATAACCACCTTGTCATGACACTCTATCTCGTT$

 $\label{eq:transform} TTTAAATACACATTAAAAGATGCAACCATGGGTCTAATTCAACCTCATCAACATTTGGCAAAATTTATGTGTAATTTTCTACGTTGGTACCCAGATTAAGTTGGAGTAGTTGTAAACCGT$

 $\label{eq:transform} TTCATTGTTCTCTAGTTGCAAATGACTGAATGACTCAAATGACTGAATCACCT\\ AAGTAAACAAGAGATCAACGTTTACTAGGATCAAATAAGTAGGTTTACTGACTTAGTGGA\\ \end{array}$

 ${\tt GATTTCCAGATTTCAGGTTGGAAATACTCTGATATAATTGCTGAAATGAAGAGCACAACACTAAAAGGTCTAAAGTCCAACCTTTATGAGACTATATTAACGACTTTACTTCTCGTGTTGT$

 ${\tt TTGAGGATTGCAAACATCATTCCTCAAACTTCTTTTGGTCGTTTACAATTTTGCGTGAAT\\ {\tt AACTCCTAACGTTTGTAGTAAGGAGGTTTGAAGAAAAACCAGCAAATGTTAAAAACGCACTTA$

 ${\tt GAGTATGGAAGAACAGTTAAACCAGGATCTTATAGATCTTCGTGTATTTGTAATGTTAATCTCATACCTTCTTGTCAATTTGGTCCTAGAATATCTAGAAGCACATAAACATTACAATTA}$

ATAGCAGCTTTAACTGATCTTAAACCAGATATTGCCTATAAAGAAAACACCATAAATCAG TATCGTCGAAATTGACTAGAATTTGGTCTATAACGGATATTTCTTTTGTGGTATTTAGTC

ATCGTAACAATAATCAGTCCCACATTTGAACGAGATAGAGTGTCAAGGGCGAATTCCAGC TAGCATTGTTATTAGTCAGGGTGTAAACTTGCTCTATCTCACAGTTCCCGCTTAAGGTCG

ACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGG 3' TGTGACCGCCGGCAATGATCACCTAGGCTCGAGCCATGGTTCGAACCGCATTAGTACC 5'

Abb. 64: Sequenz des Alignment_2

7.3 Lage der verwendeten Sonden



Abb. 65: Übersicht über die Lage sämtlicher Sonden auf dem Alignment_2 und dem Klone V283_2/1

8. Lebenslauf

Name:	Wynja Benthack
Geburtstag und -ort:	16.03.1971, Hamburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Ausbildung:	
Schulbildung:	Grundschule und Gymnasium mit Abitur am Gymnasium
(08/77-06/91)	Lerchenfeld,
Hochschulstudium:	Biologie, Universität Hamburg, 10/91-02/98
Diplomarbeit:	(05/97-02/98) am Institut für Allgemeine Botanik, Abt.
	Genetik, Universität Hamburg (05/97-08/97, 01/98-02/98) und
	am Institut für Forstbotanik und Baumphysiologie, Albert-
	Ludwig-Universität Freiburg (09/97-12/97)
Diplom:	06.02/98 (Angewandte Botanik, Mikrobiologie, Zoologie)
-	
Promotionsstudium:	03/98-04/01, wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für
	Allgemeine Botanik, Abt. Genetik, Universität Hamburg

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach für die Betreuung der Arbeit. Sein kreatives Engagement und seine Unterstützung haben in großem Maße zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Frau Prof. Dr. Carmen Büttner gilt mein herzlicher Dank für die vielen hilfreichen Ratschläge und Anregungen, sowie die Übernahme des schriftlichen Zweitgutachtens

Frau Dr. Martina. Bandte möchte ich danken für die stete Hilfsbereitschaft in jeder Situation und die anregenden Diskussionen

Vielen Dank besonders auch an Nikole Mielke für die tolle Zusammenarbeit, die vielen Anregungen und das Korrekturlesen.

Für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft, besonders bei methodischen Fragen, möchte ich mich bei Herrn Dr. Ralf. Werner bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Mitstreitern im Labor, durch die es niemals langweilige wurde.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei all denjenigen bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie für die wunderbare Unterstützung in jeder Situation

Die vorliegende Arbeit wurde finanziert von Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) in Bonn.

Bestätigung

Hiermit bestätigte ich, Wynja Benthack, daß die vorliegende Arbeit die einzige Doktorarbeit ist die ich bis jetzt gemacht habe, und das ich an keiner weiteren Doktorarbeit arbeite. Ich habe auch zuvor noch keine andere Doktorarbeit begonnen oder vorzeitig abgebrochen.

Hamburg den 02.03.2001

Wynja Benthack