

**Tobamoviren:
Differenzierung aufgrund ihrer genetischen
Heterogenität und die diagnostische Relevanz**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Biologie
der Universität Hamburg



vorgelegt von
Bettina Letschert
aus Wilhelmshaven

Hamburg 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. G. ADAM
Weitere Gutachter der Dissertation:
Frau Professor Dr. C. BÜTTNER

Tag der Disputation: 27. Juni 2003

Hamburg, den 13. Juni 2003



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Frühwald'.

Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

1	EINLEITUNG.....	8
1.1	HISTORISCHER ÜBERBLICK, BIOLOGIE UND BEDEUTUNG VON TOBAMOVIREN	8
1.2	MORPHOLOGIE, GENOMAUFBAU UND EXPRESSIONSSTRATEGIE.....	9
1.3	KLASSIFIZIERUNG VON TOBAMOVIREN	12
1.4	DIAGNOSTIK.....	14
1.5	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT.....	17
2	MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1	MATERIAL	18
2.1.1	Chemikalien.....	18
2.1.2	Oligonukleotide.....	18
2.1.3	Restriktionsendonukleasen.....	19
2.1.4	Virusisolate	19
2.1.5	Nährmedien.....	19
2.2	METHODEN.....	20
2.2.1	Wirtspflanzenanzucht und Virusvermehrung.....	20
2.2.2	Herstellung reiner Virusisolate über Lokalläsionentransfer.....	20
2.2.3	Reinigung von Viruspartikeln.....	21
2.2.4	Methoden zur Isolierung viraler Nukleinsäure	22
2.2.4.1	Gewinnung von RNA aus einer Virusreinigung	22
2.2.4.1.1	Phenolextraktion zur Proteinentfernung.....	22
2.2.4.1.2	Nukleinsäurefällung aus wässriger Lösung.....	22
2.2.4.2	Präparation von Gesamtnukleinsäure aus Blattmaterial mit Hilfe von Silika nach Rott und Jelkmann (2001)	22
2.2.4.3	Präparation von Gesamt-RNA aus Blattmaterial mit Phenol nach Verwoerd (1989)	24
2.2.4.4	Präparation von Gesamt RNA mittels E.Z.N.A Plant RNA Kit (peqLab)	24
2.2.4.5	Gesamt-RNA-Isolierung mittels TriFast (peqLab)	25
2.2.4.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
2.2.5	Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	25
2.2.5.1	Synthese von cDNA durch reverse Transkription.....	25
2.2.5.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
2.2.5.3	Zwei Methoden der „single tube“ PCR.....	27
2.2.5.3.1	„single tube“ PCR	27
2.2.5.3.2	„single tube“ PCR mit Eppendorf cMaster™ RT plus	28
2.2.6	RT-PCR ohne vorherige Nukleinsäureextraktion.....	28
2.2.6.1	„Spot-PCR“	28
2.2.6.2	"Immuno-Capture" PCR (IC-PCR).....	29
2.2.7	RT-PCR-RFLP („restriction fragment length polymorphism“).....	29
2.2.8	Agarose-Gelelektrophorese.....	30
2.2.8.1	Analytische DNA-Gelelektrophorese	30
2.2.8.2	Präparative Agarosegele und Reinigung der DNA-Fragmente	30
2.2.8.3	Analytische RNA-Gelelektrophorese	30
2.2.9	Klonierung von PCR-Fragmenten.....	31

2.2.9.1	Konstruktion von T-Vektoren für die Klonierung von PCR-Produkten	31
2.2.9.2	Restriktionsverdauung von DNA.....	31
2.2.9.3	Addition von Thymin an die stumpfen Enden des Vektors	31
2.2.9.4	Reinigung von PCR-Fragmenten.....	32
2.2.9.5	Ligation	32
2.2.9.6	Transformation von Bakterien mit Plasmid DNA.....	32
2.2.9.7	Kolonie –PCR.....	33
2.2.9.8	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	34
2.2.9.9	Sequenzierung	34
2.2.10	<i>Computeranalyse (Sequenzanalyse)</i>	35
2.2.11	<i>Klonierung und Expression des SFBV Hüllproteingens</i>	35
2.2.12	<i>Expression von Fusionsproteinen in E. coli</i>	35
2.2.12.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen	35
2.2.12.2	Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brillantblau.....	37
2.2.13	<i>Elektroblot Immuno Assay (Western-Blot)</i>	37
2.2.13.1	Elektroblotting.....	37
2.2.13.2	Immunfärbung von Proteinen.....	38
2.3	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	39
3	ERGEBNISSE	40
3.1	AUSWAHL UND VORBEREITUNG DER VIRUSISOLATE ZUR ETABLIERUNG DER GENERELLEN UND DIFFERENZIERENDEN UNTERSUCHUNGEN	40
3.1.1	<i>Reinigung der Virusisolate</i>	40
3.1.2	<i>Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen</i>	40
3.1.3	<i>cDNA Synthese</i>	40
3.1.4	<i>Auswahl der Oligonukleotide</i>	41
3.1.4.1	Generelle PCR zum Nachweis von Tobamoviren.....	41
3.1.5	<i>Klonierung und Sequenzierung ausgewählter PCR-Fragmente</i>	44
3.2	DIFFERENZIERUNG VON AUSGEWÄHLTEN SPEZIES DER SOLANACEAE SUBGRUPPE	45
3.2.1	<i>Differenzierung mit Hilfe der Restriktionsverdauung von PCR-Fragmenten (RT-PCR- RFLP)</i> ..	45
3.2.1.1	Restriktionsmuster von Tobacco mosaic virus (TMV).....	46
3.2.1.2	Restriktionsmuster von Tomato mosaic virus (ToMV)	47
3.2.1.3	Restriktionsmuster von Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV).....	48
3.2.1.4	Restriktionsmuster von Pepper mild mottle virus (PMMV)	49
3.2.1.5	Differenzierung von Odontoglossum ringspot virus (ORSV).....	51
3.2.1.6	Überprüfung von Klonen mit nicht konformem Restriktionsmuster.....	51
3.2.1.6.1	Nicht konforme Restriktionsmuster bei Mischinfektionen.....	51
3.2.1.6.2	Nicht konforme Restriktionsmuster bei Isolaten mit deutlich veränderter Sequenz.....	51
3.2.2	<i>Nachweis der Spezies mit spezies-spezifischen Oligonukleotiden</i>	54
3.2.2.1	Entwicklung der spezies-spezifischen Oligonukleotide.....	54
3.2.2.2	Nachweis der Spezies mit cDNA oder als „semi-nested“ PCR.....	56
3.3	ANWENDUNG DER RT-PCR-RFLP UND DER SPEZIES-SPEZIFISCHEN OLIGONUKLEOTIDE ZUM NACHWEIS VON VIRUSGEMISCHEN	57
3.4	NACHWEIS VON TOBAMOVIREN MIT VEREINFACHTER PROBENAUFARBEITUNG	59

3.4.1	„single tube“ RT-PCR	59
3.4.2	Vereinfachung der Probenaufarbeitung durch „spot“-RT-PCR.....	59
3.4.3	„Immuno-Capture“ RT-PCR	60
3.5	NACHWEIS VON SPEZIES AUS DER CUCURBITACEAE SUBGRUPPE	60
3.6	DIFFERENZIERUNG DER ISOLATE AUS DER CRUCIFEREAE SUBGRUPPE	61
3.6.1	RT-PCR von Isolaten der Crucifereae Subgruppe	61
3.6.1.1	Turnip vein clearing virus (TVCV)	61
3.6.1.2	Oilseed rape mosaic virus (ORMV).....	64
3.6.1.3	Entwicklung eines generellen Oligonukleotides zum Nachweis der Spezies innerhalb der Crucifereae Subgruppe.....	65
3.6.1.4	Charakterisierung von weiteren Isolaten aus der Crucifereae Subgruppe.....	66
3.6.1.5	Überprüfung der generellen Oligonukleotide für die Crucifereae Subgruppe	68
3.7	KLONIERUNG UND SEQUENZANALYSE DES <i>STREPTOCARPUS FLOWERBREAK VIRUS (SFBV)</i>	68
3.7.1	Genom von SFBV und Vorhersage der offenen Leserahmen	69
3.7.2	Genomorganisation.....	70
3.7.2.1	ORF 1	71
3.7.2.2	ORF 2	71
3.7.2.3	ORF 3	72
3.7.2.4	ORF 4	72
3.7.3	Klonierung und Expression des Hüllproteingens von <i>Streptocarpus flowerbreak virus</i>	73
3.7.3.1	Klonierung des Hüllproteingens	73
3.7.3.2	Serologische Überprüfung des exprimierten Hüllproteinklones	74
3.8	EINORDNUNG VON TOBAMOVIREN AUF DER GRUNDLAGE VON SEQUENZDATEN.....	75
3.8.1	Zuordnung der Isolate in der Crucifereae Subgruppe zu Spezies	75
3.8.2	Zuordnung aller untersuchten Isolate zu Spezies	76
3.8.3	Frequenz und Verteilung von Homologien der Hüllproteinsequenzen	78
4	DISKUSSION	79
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	93
6	REFERENZEN.....	95
7	ANHANG	107

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro (10 ⁻⁶)
°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
BBA	Biologische Bundesanstalt
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CFMMV	<i>Cucumber fruit mottle mosaic virus</i>
CGMMV	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>
cDNA	„copy“ DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde(n)
HRV	<i>Holmes ribgrass virus</i>
kb	Kilobasen
l	Liter
m	Milli (10 ⁻³)
M	Mol
min	Minute(n)
N	G, A, T oder C
n	Nano (10 ⁻⁹)
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORMV	<i>Oilseed rape mosaic virus</i>
ORSV	<i>Odontoglossum ringspot virus</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMMV	<i>Pepper mild mottle virus</i>
PVP	Polyvinylpyrolidone
PVPP	unlösliches Polyvinylpyrolidone
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RMV	<i>Ribgrass mosaic virus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)

Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur; in Verbindung mit PCR auch Reverse Transkription
SFBV	<i>Streptocarpus flowerbreak virus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde(n)
T	Thymidin
TMGMV	<i>Tobacco mild green mosaic virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
ToMV	<i>Tomato mosaic virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TVCV	<i>Turnip vein clearing virus</i>
U	Einheit(en) (unit(s))
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht (weight) pro Volumen
nt	Nukleotide
PVDF	Polyvinylidenfluorid

1 Einleitung

1.1 Historischer Überblick, Biologie und Bedeutung von Tobamoviren

Im 16. Jahrhundert wurde eine Tulpenkrankheit mit Farbbrechung in der Blüte beschrieben. Diese Blütenbrechung stellte sich durch diffuse Verfärbungen oder Streifenbildung der Blüte dar. Ende des 19. Jahrhunderts wurde an Tabak eine Krankheit, die mosaikartige Symptome hervorruft, beschrieben (Zaitlin, 1998). Im Jahre 1892 zeigte Iwanowski an dieser Tabak Mosaik Erkrankung, dass das die Krankheit auslösende Agens

- nicht außerhalb von Zellen kultivierbar,
- nicht sichtbar,
- durch einen Bakterien dichten Porzellanfilter passierbar ist.

Martinus Willem Beijerinck wiederholt 1898 den von Iwanowski durchgeführten Versuch und ist überzeugt, dass dieses Phänomen etwas Neues ist. Er nennt dieses unbekanntes Agens „*contagium vivum fluidum*“ (Bos, 1999). Das heute als *Tobacco mosaic virus* (TMV) bekannte Agens war damit das erste bekannte Virus. Von da an standen TMV und andere Pflanzenviren bis heute im Mittelpunkt der Forschung. So gelang die erste chemische Reinigung eines Virus (TMV) durch Stanley (1935), wofür er 1946 den Nobelpreis in Chemie erhielt. Kausche *et al.* (1939) konnte TMV im Elektronenmikroskop darstellen. Mit der Hilfe von röntgen-kristallografischen Studien wurde von Bernal und Fankuchen (1941) in Cambridge die stäbchenförmige Struktur und die helikale Anordnung der Proteinmoleküle im Viruspartikel dargestellt. Etwa 10 Jahre später konnte die RNA im Inneren der stäbchenförmigen Partikel nachgewiesen werden (Caspar, 1963). Anhand von TMV RNA wurde gezeigt, dass diese allein ausreichend ist, um eine Infektion hervorzurufen (Fraenkel-Conrat, 1956; Gierer und Schramm, 1956).

Das Hüllprotein von TMV war auch das erste sequenzierte virale Protein, schon 1960 gelang es Tsugita *et al.* die 158-Aminosäuren zu entschlüsseln. Für die ersten transgenen Pflanzen wurde ebenfalls das TMV Hüllprotein verwendet (Powell Abel *et al.*, 1986). Im Jahre 1982 bestimmten Goelet *et al.* das 6395 Nukleotid lange RNA-Genom von TMV vulgare.

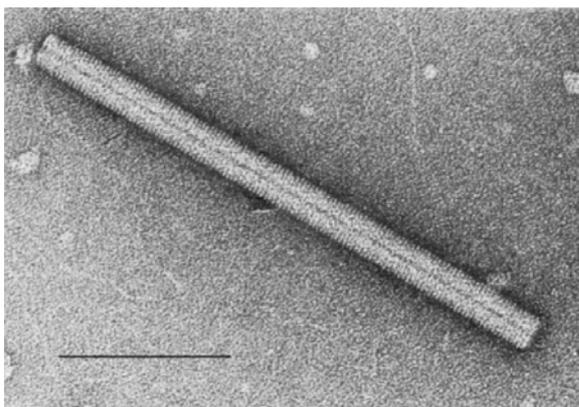
Mit einer der Gründe, warum TMV als erstes Virus gefunden und charakterisiert werden konnte, ist seine extrem stabile Struktur. Es wurde berichtet, dass TMV Partikel auch nach 50 Jahren Lagerung unter nicht sterilen Bedingungen und Raumtemperatur ihre Infektiosität nicht verloren haben (Silber und Burk, 1965). Diese hohe Stabilität zeigt unter anderem die Gefährdung, die von den Tobamoviren ausgeht. Jährlich verursachen diese Viren weltweit hohe Verluste in der Landwirtschaft und im Zierpflanzenanbau (Alonso *et al.*, 1989). TMV wird nicht durch Insekten, Nematoden oder andere Vektoren übertragen, sondern gelangt

durch direkten Kontakt von Pflanze zu Pflanze oder durch mechanische Inokulation in den Wirt, z.B. durch Kulturmaßnahmen bei, welchen Verwundungen entstehen, und Gießwasserkreisläufe. Außerdem können Tobamoviren auch durch das Saatgut übertragen werden, jedoch nicht durch den Pollen. Im Samen befindet sich das Virus in der Testa und nicht im Embryo. Die Überdauerung von TMV während der Vegetationsruhe erfolgt an abgestorbenen Pflanzenteilen im Boden.

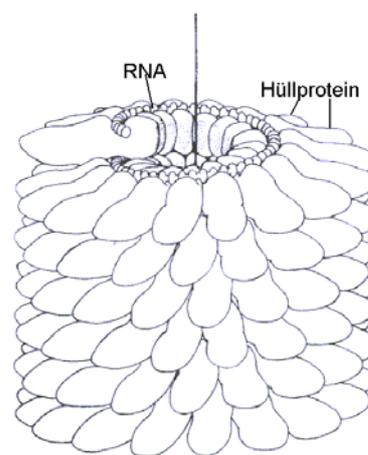
In Abhängigkeit von Pflanzenart, -alter, Umwelteinflüssen sowie Virulenz des jeweiligen Virustammes zeigen sich Frühsymptome wie ein leichtes Kräuseln und gleichzeitige Gelbscheckung der Blätter (Mosaik), bei fortschreitender Krankheit verstärken sich diese Symptome. Bei Tabak, Tomaten und anderen Arten aus der Familie der Solanaceae kann die Krankheit infolge starker Wachstumshemmung und Qualitätsminderung zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten führen.

1.2 Morphologie, Genomaufbau und Expressionsstrategie

Tobamoviren zeichnen sich durch starre stäbchenförmige Partikel mit einer Länge von 300 nm und einem Durchmesser von 18 nm aus. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist außerdem ein Mittelkanal zu erkennen (Abb. 1A). Die Partikel setzen sich aus einer einzelsträngigen, linearen, positiven RNA (6,4 kb) und 2130 identischen Hüllprotein-Untereinheiten zusammen (Abb. 1B, Klug *et al.*, 1960; Van Regenmortel, 1981).



A



B

Abb.: 1 A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von einem Viruspartikel aus der Familie der Tobamoviren. Balken = 100nm (www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/71010001.htm)

B) schematischer Aufbau eines Tobamoviruspartikels (www.plantpath.wisc.edu/pp300/docs/virmod.html)

Das 5'Ende der viralen RNA ist mit einer m⁷GpppG Cap-Struktur verbunden (Zimmern, 1975), gefolgt von einer 69 nt langen untranslatierten Region. Daran schließt sich ein offener Leserahmen („*open reading frame*“, ORF) an, der für das 126 K Protein kodiert (ORF 1). Durch Überlesen des ersten Stoppkodons kommt es zusätzlich zur Bildung des 183 K Proteins (Beier *et al.*, 1984, ORF 2). Dieses Fusionsprotein wird in einem Verhältnis von 10:1 gebildet. Für das Durchlesen des UAG Stoppkodons ist eine spezielle Supressor tRNA erforderlich (Beier *et al.*, 1984). Beide Proteine werden direkt von der viralen RNA translatiert und als 10:1 Heterodimer für eine effiziente Replikation benötigt (Lewandowski und Dawson, 2000). Osman und Buck (1997) isolierten einen TMV-RNA Polymerase Komplex aus den viralen Proteinen 126 K und 183 K und einem Wirtsprotein mit einer Größe von 56 kDa. ORF 1 enthält Motive einer Methyltransferase und einer Helikase (Hodgman, 1988; Gorbalenya und Koonin 1989; Rozanov *et al.*, 1992), das ORF 2 die Domäne einer RNA abhängigen RNA-Polymerase (Koonin, 1991).

Anschließend an die Polymerase sind zwei weitere Gene auf der RNA lokalisiert, die aber nicht direkt von der viralen RNA, sondern von subgenomischen RNAs exprimiert werden, welche erst im Verlauf der Infektion gebildet werden (Palukaitis *et al.*, 1986). Jede dieser subgenomischen RNAs fungiert separat als mRNA und kodiert für das Transportprotein (ORF 3) und das Hüllprotein (ORF 4).

Die ersten fünf Kodons des ORF 3 überlappen mit dem 183 K Proteingen des ORF 2. Dieser ORF 3 kodiert für ein Protein, welches für den Transport von Zelle zu Zelle benötigt wird (Taliensky *et al.*, 1982; Ohno *et al.*, 1983) und als Transportprotein („*movement protein*“, MP) bezeichnet wird. Das sich mit einem Abstand von zwei Nukleotiden anschließende ORF 3 kodiert für das 17,6 kDa große Hüllprotein. Das Hüllprotein schützt das virale Genom und wird außerdem für den Ferntransport benötigt (Saito *et al.*, 1990).

Später wurde ein weiterer ORF, welcher für ein 54 kDa Protein kodiert und sich innerhalb des 183 K Proteins befindet, postuliert (Sulzinski *et al.*, 1985). Dieses 54 K Protein konnte jedoch bisher nicht *in vivo* nachgewiesen werden (Saito *et al.*, 1986; Carr *et al.*, 1992; Zaitlin *et al.*, 1999), obwohl die subgenomische „*messenger*“ RNA *in vivo* nachgewiesen wurde. Es wird daher zur Zeit davon ausgegangen, dass das TMV Genom für vier Genprodukte kodiert.

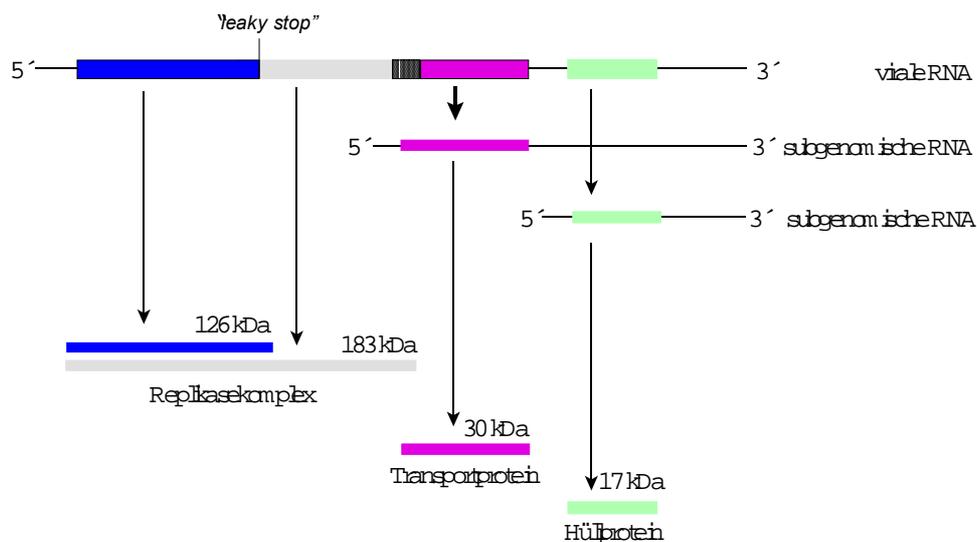


Abb. 2: Schematische Darstellung der Organisation von genomischer und subgenomischer RNA und den daraus resultierenden Proteinen von TMV. Die bunten Rechtecke in der obersten Zeile markieren die vier ORFs. Die beiden Translationsprodukte des ORF 1 und 2 fungieren als Replikasekomplex. Im ORF 1 (blau) sind eine Methyltransferase und eine Helikasedomäne enthalten, diesen wird durch Überlesen des ersten Stoppkodons („leaky stop“) noch die Polymerasedomäne (grau) zugefügt. In der zweiten und dritten Zeile sind die subgenomischen RNAs dargestellt, die für das MP ORF 3 (lila) und das CP ORF 4 (grün) kodieren. In der letzten Zeile sind die viruskodierten Proteine dargestellt.

Neben den ORFs befinden sich auf der viralen RNA wichtige strukturelle Bereiche, die zum Teil nicht translatiert werden, aber regulierende Funktionen haben. Vor dem ersten Startkodon befindet sich ein als Ω bezeichneter G-freier Bereich, der eine poly CAA Sequenz beinhaltet und als Translationsverstärker arbeitet (Sleat *et al.*, 1988; Gallie *et al.*, 1987). Die Initiierung der Stäbchenbildung ist an die Struktur des „origin of assembly“ (ori) gebunden, die sich bei TMV im ORF 3 befindet. Viele Experimente (Zimmern und Wilson, 1976; Lebourier *et al.*, 1977) zeigten, daß der ori eine spezielle Sequenz von Nukleotiden aufweist und ein hoch konservierter Bereich ist. Insgesamt beinhaltet dieser Bereich drei Schleifen (*loops*), die durch interne Basenpaarung zustande kommen. Die einleitende Sequenz besteht aus den drei Triplets -AAGAAGUCG- in Form einer Schlaufe, die sich am Ende eines durch Basenpaarung entstandenen Stammes befindet (Abb. 3).

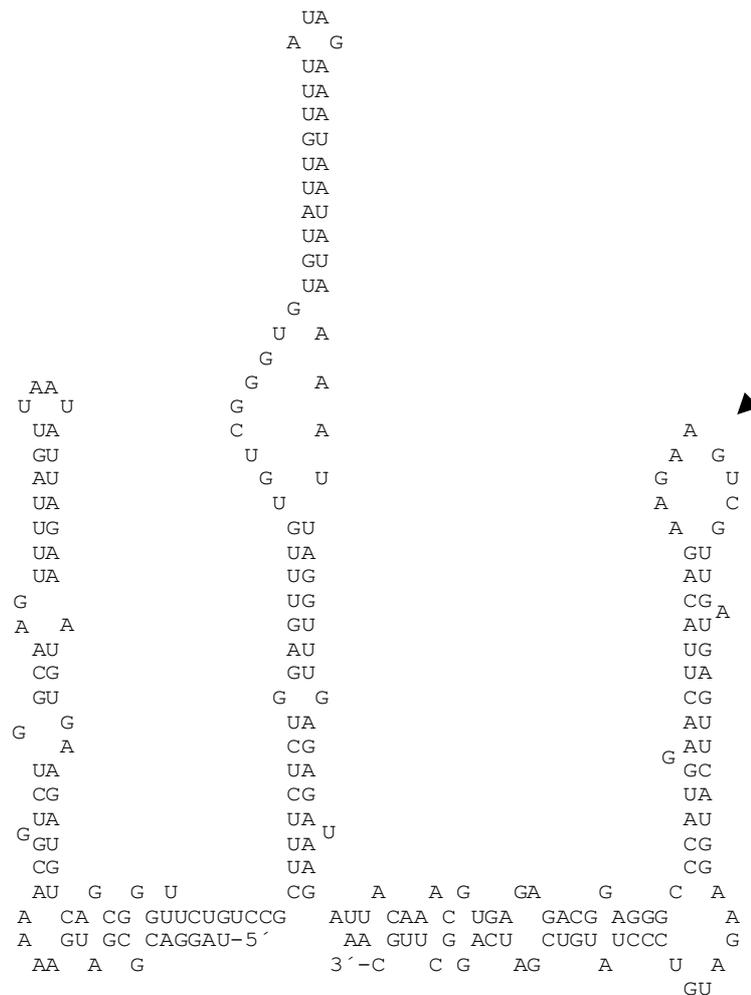


Abb. 3: Faltung der TMV RNA im Bereich des „*origin of assembly*“. Essentiell für die Initiierung der Stäbchenbildung ist der mit einem Pfeil gekennzeichnete „*loop*“ 3 nach Zimmern (1983)

Die ca. 200 nt große 3' untranslatierte RNA faltet sich ähnlich einer tRNA (Pleij *et al.*, 1985; Rietveld *et al.*, 1984) und kann wie eine tRNA mit Histidin aminoacyliert werden (Oberg und Philippon, 1972). Diese tRNA ähnliche Struktur ist hoch konserviert (Van Belkum *et al.*, 1985; Garcia-Arenal, 1988).

Die Genomstruktur der verschiedenen Tobamovirus Spezies zeigt Abweichungen, diese sind unter anderem Kriterien zur Differenzierung, wie in 1.3 beschrieben wird.

1.3 Klassifizierung von Tobamoviren

Das *Tobacco mosaic virus* (TMV) ist der Typstamm des Genus Tobamovirus. Im Genus Tobamovirus werden aufgrund von Gemeinsamkeiten in der Partikelmorphologie, Genomstruktur und Expressionsstrategie heute 14 Spezies gelistet. Möglicherweise gehören fünf weitere Spezies ebenfalls in dieses Genus (van Regenmortel *et al.*, 2000).

Ursprünglich erfolgte die Differenzierung in die Spezies aufgrund der Aminosäurezusammensetzung des Hüllproteins (Tsugita, 1962), später folgten serologische Methoden wie Präzipitationstests, Dekorationstiter oder ELISA. Van Regenmortel (1975) zeigte, dass die serologische Differenzierung mit der Aminosäurezusammensetzung korreliert. Daher verwundert es auch nicht, dass nach der Verfügbarkeit von RNA-Sequenzdaten eine ebenso gute Übereinstimmung der Differenzierung auf Nukleinsäure- wie Aminosäuresequenz im Bereich des Hüllproteins gefunden wurde (Gibbs, 1986).

Fukuda *et al.* (1981) unterteilte die Spezies aus dem Genus Tobamovirus in zwei Subgruppen. Der *ori* der Subgruppe der Cucurbitaceae befindet sich im ORF des Hüllproteingens. Es sind die Spezies *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) und *Sunn-hemp mosaic virus* (SHMV), die Cucurbitaceae und Leguminoseae infizieren, vertreten. Bei der Subgruppe der Solanaceae befindet sich diese Struktur des *ori* im ORF des Transportproteingens. Die meisten Spezies dieser Subgruppe infizieren Solanaceae wie das *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) und *Pepper mild mottle virus* (PMMV). Nur das *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) infiziert Orchideen (Park *et al.*, 1990; Paul, 1975).

Diese Einteilung in zwei Subgruppen wurde von Lartey *et al.* (1996) aufgrund weiterer Merkmale wie z. B. Sequenzhomologien bestätigt. Die Genomorganisation der Subgruppe der Solanaceae zeigt, dass der ORF des Hüllproteingens und der ORF des Transportproteingens durch einige Nukleotide getrennt sind, wohingegen es in der Subgruppe der Cucurbitacea zu einer kurzen Überlappung dieser beiden ORFs kommt.

Es gibt Tobamoviren, die aufgrund ihrer serologischen Merkmale, Genomorganisation, Wirtspflanzen und Sequenzvergleichen nicht in diese beiden Subgruppen eingeordnet werden können. Daraufhin wurde eine weitere, Crucifereae infizierende, Subgruppe etabliert. Diese Viren infizieren unter anderem *Plantago lanceolata* („Ribgrass“) und andere Spezies der Familie der Plantaginaceae sowie Crucifereae systemisch und werden deshalb als „Ribgrass-Viren“ bezeichnet (Oshima und Harrison, 1975). Eine weitere Gemeinsamkeit der Viren dieser Subgruppe ist ihre Genomstrategie. Zwischen den Genen der viralen Replikase (ORF 2) und des Transportproteins (ORF 3) gibt es keine Überlappung, wohingegen das Transportproteingens (ORF 3) und das Hüllproteingens (ORF 4) eine Überlappung von 76 nt aufweisen (Aguilar *et al.*, 1996).

Eine Einteilung der Tobamovirus Spezies in die drei Subgruppen wird von Lartey *et al.* (1996) anhand von Ähnlichkeitsdiagrammen der Hüllprotein- und Transportproteinsequenzen vorgeschlagen (Abb. 4). Bei der Einteilung in Subgruppen handelt es sich jedoch nicht um ein taxonomisches Kriterium.

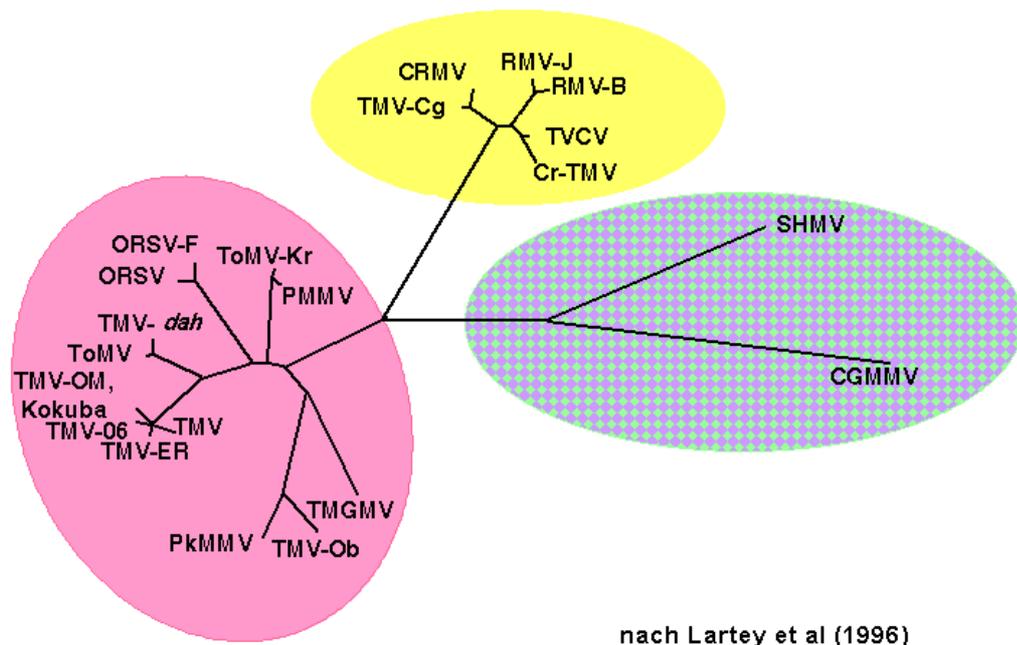


Abb. 4: Ähnlichkeitsdiagramm der Hüllproteine von Tobamoviren (nach Lartey *et al.*, 1996). Der rosa Bereich stellt die Solanaceae Subgruppe, der gelbe die Crucifereae Subgruppe und der grün-blaue die Cucurbitaceae Subgruppe dar.

1.4 Diagnostik

Zur Diagnose von Pflanzenviren stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die Tobamoviren lassen sich durch Biotest, Elektronenmikroskopie, serologisch oder mit Nukleinsäure basierenden Methoden nachweisen.

Bei dem Biotest wird virusverdächtiges Pflanzenmaterial auf verschiedene Testpflanzen inokuliert. Nach einigen Tagen, bei manchen Viren auch Wochen, entstehen lokale oder systemische Symptome. Dieser Test ist einfach und zeigt die Infektiosität des Erregers. Für den Biotest benötigt man viel Erfahrung bei der Auswahl der Pflanzen und der Beurteilung der Symptome, zudem kann bis zur Ausprägung der Symptome viel Zeit vergehen. Generell lassen sich die Tobamoviren im Biotest mit *Chenopodium quinoa* (Wild.) gut nachweisen, da sie stabil sind und die Symptome schon nach einigen Tagen bis maximal zwei Wochen

auftreten. Eine Diagnose von Spezies allein aufgrund von Symptomen ist schwierig, da es keine differenzierenden Wirtspflanzen gibt.

Eine andere Möglichkeit, um Pflanzenmaterial auf Viren zu testen, ist die Herstellung von elektronenmikroskopischen Präparaten. Hier kann die Form und Größe des Virus bestimmt werden. Meist ist somit auch die Zuordnung zu einer Gattung möglich. Die Tobamoviren lassen sich im Elektronenmikroskop, mit ihrer charakteristischen Gestalt von etwa 300 nm Länge, 18 nm Durchmessern und dem Mittelkanal, gut darstellen. Ein Elektronenmikroskop steht jedoch nicht immer zur Verfügung, da diese Geräte sehr teuer in der Anschaffung sind.

Es ist auch möglich, Pflanzenviren mit serologischen Verfahren nachzuweisen. Die elektronenmikroskopischen Präparate lassen sich auch mit serologischen Verfahren verknüpfen (Milne und Luisoni, 1975). Hierbei werden z. B. die Viruspartikel mit spezifischen Antikörpern markiert, diese sind im Elektronenmikroskop dann als Saum sichtbar. Mit diesem Verfahren ist eine Differenzierung in die Spezies möglich.

Eine weitere Möglichkeit zur Diagnose Viren ist der ELISA. Dieses Verfahren ist einfach in der Durchführung und auch relativ kostengünstig. Zudem steht diese Technik in den meisten Laboren zur Verfügung.

Der Nachteil der serologischen Verfahren besteht in den Kreuzreaktionen der Antiseren. Bei den verschiedenen Tobamoviruspezies sind die Hüllproteine sehr ähnlich und eine Differenzierung in die Spezies kann somit durch Kreuzreaktionen zu Problemen führen. Für eine eindeutige Differenzierung in die Spezies werden daher oft mehrere verschiedene Antiseren benötigt, womit dieses Verfahren dann zeitaufwendig und teuer wird. Bisher sind auch kaum monoklonale Antikörper zur Differenzierung in die Spezies verfügbar. Dieses ist nach einer Epitopenanalyse (van Regenmortel, 1999) und Sequenzanalysen von anderen Tobamoviruspezies auch nicht verwunderlich, da viele (potentielle) Epitope zwischen den verschiedenen Spezies konserviert sind.

Bei den nukleinsäure-basierenden Verfahren kann der Nachweis von Viren durch den spezifischen Nachweis ihres Genoms oder von Teilen ihres Genoms erfolgen. Hierbei unterscheidet man im Wesentlichen zwei Prinzipien. Bei der Hybridisierung wird die Nukleinsäure detektiert, ohne dass diese vorher vervielfacht wurde. Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird ein Teil des Genoms spezifisch amplifiziert. Da es sich bei den Tobamoviren um Viren mit einem RNA Genom handelt, muss vor der PCR die RNA in DNA (cDNA) umgeschrieben werden (Reverse Transkription).

Die Kombination von Reverser Transkription mit anschließender PCR Amplifikation (RT-PCR) hat sich zur Diagnose von verschiedenen Viren mit RNA Genom bewährt (Bateson und

Dale, 1995; de Blas *et al.*, 1994; Pappu *et al.*, 1993). Die RT-PCR hat vor allem den Vorteil, dass sie schnell und zuverlässig in der Anwendung ist. Außerdem ist diese Methode wesentlich sensitiver als der ELISA (Ryu und Park, 1995).

Für einzelne Spezies des Genus Tobamovirus sind RT-PCR Verfahren beschrieben worden (Eun *et al.*, 2000; Ryu und Park, 1995; Velasco *et al.*, 2002). Eine Kombination aus generellem Nachweis des Genus mit der Möglichkeit zur anschließenden Differenzierung in die Spezies wurde bislang allerdings nicht entwickelt.

In manchen Fällen ist sogar die Differenzierung der Spezies noch nicht ausreichend, sondern eine weitergehende Differenzierung in Pathotypen ist erforderlich. Schon geringe Veränderungen in der Sequenz können eine Veränderung in der biologischen Aktivität zur Folge haben. Eine Unterscheidung der Pathotypen ist mit serologischen Mitteln oft nicht möglich, da hier die Unterschiede im Protein nur minimal sind und damit keine differenzierenden Antikörper hergestellt werden können. Ein solches Problem besteht auch für die *Potato tuber necrotic ringspot disease*. Der PVY-NTN Pathotyp konnte sich in den meisten europäischen Ländern verbreiten, eine Differenzierung dieses Pathotyps von anderen Isolaten dieser Spezies ist mit serologischen Methoden nicht möglich. Lediglich Methoden, die auf der Variabilität des Genoms beruhen, sind in der Lage die verschiedenen Pathotypen zu unterscheiden (Weidemann und Maiss, 1996; Glais *et al.*, 1996).

Eine auf nukleinsäurebasierende Methoden, die in der Lage ist, die genetische Heterogenität darzustellen, ist die RT-PCR-RFLP, wobei das PCR-Produkt mit der Hilfe von Restriktionsendonukleasen verdaut wird, und es so zur Entstehung von differenzierenden Mustern kommt. Dies wurde von Velasco *et al.* (2002) und Tenllado *et al.* (1994) für Tobamoviren an Hand von PMMV-S und PMMV-I gezeigt. Bei Tenllado *et al.* (1994) wurde eine RT-PCR von resistenzbrechenden PMMV Isolaten im Bereich des Hüllproteingens durchgeführt. Die entstehenden PCR Produkte mit einer Länge von 395 bp wurden anschließend mit der Hilfe der Restriktionsendonuklease Taq I verdaut. Bei PMMV-S Isolaten konnten zwei Fragmente der Größe 356 und 59 bp detektiert werden. Die PMMV-S Isolate sind in der Lage, die Resistenz der L1 und L2 Gene von *Capsicum spp.* zu brechen. Für PMMV-I Isolate wurden vier Fragmente mit den Größen 135, 113, 107 und 40 bp dargestellt. Die PMMV-I Isolate können die Resistenz der L1, L2 und L3 Gene von *Capsicum spp.* brechen. Ein ähnliches Verfahren zur Differenzierung von PMMV Pathotypen wurde von Velasco *et al.* (2002) vorgestellt. Ein 836 bp großes RT-PCR Produkt wurde mit der Hilfe der Restriktionsendonuklease Eco R1 verdaut. Nur der Pathotyp PMMV-I weist eine Erkennungstelle für dieses Enzym auf und verdaut das 836 große PCR-Fragment in zwei Fragmente mit den Größen 260 und 570

bp. Die PMMV-S Isolate weisen eine solche Erkennungstelle nicht auf und eine Verdauung findet daher nicht statt.

Eine Differenzierung kann für die Resistenzzüchtung und für eine sinnvolle Kontrolle unter anderem von Sanierungsmaßnahmen von erheblicher Bedeutung sein.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Zum Routinenachweis von Tobamoviren haben sich serologische Verfahren etabliert. Jedoch verursachen Mangel an geeigneten Antisera und Kreuzreaktionen Schwierigkeiten bei der eindeutigen Differenzierung der einzelnen Spezies. Als Alternative bieten sich Nukleinsäure-basierende Verfahren wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) und die Hybridisierung an.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung eines praxistauglichen Tests zum Nachweis und zur Differenzierung von Tobamoviren. Dabei wurden wichtige Aspekte für einen praxistauglichen Test berücksichtigt:

- hohe Empfindlichkeit
- Testsicherheit
- Portierbarkeit in entsprechend ausgerüstete Labore
- einfaches, lösungsmittelfreies Extraktionsverfahren

Für fünf ökonomisch wichtige Spezies der Subgruppe der Solanaceae sollte daher ein generelles RT-PCR-Verfahren zum genusspezifischen Nachweis etabliert werden, welches zusätzlich eine Differenzierung in die Spezies gestattet. Das Hüllproteing sollte - wenn möglich - im PCR Amplifikat enthalten sein, um die Ergebnisse dieser nukleinsäure-basierenden Methode mit serologischen Daten vergleichen zu können.

Ein weitere Zielsetzung dieser Arbeit war die eindeutige Differenzierung der Isolate der Subgruppe der Cruciferae. Vor allem in der Subgruppe der Cruciferae herrscht eine große Verwirrung bei der Zuordnung der Sequenzen zu den einzelnen Spezies. Das *Streptocarpus flowerbreak virus* (SFBV), das serologisch mit Isolaten der Cruciferae Subgruppe verwandt ist, sollte molekularbiologisch charakterisiert und aufgrund der gewonnenen Daten taxonomisch zugeordnet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen

Roth GmbH (Karlsruhe)
 Merck (Darmstadt)
 Duchefa (Niederlande, Harlem)
 Serva (Heidelberg)
 MBI-Fermentas (St. Leon-Roth)
 Promega (Mannheim)

bezogen, falls im Text keine anderen Quellen vermerkt sind. Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser (MilliQ Plus) hergestellt, soweit nicht anders angegeben.

2.1.2 Oligonukleotide

Für die cDNA-Synthese und die PCR wurden spezifische Oligonukleotide entwickelt, die von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert wurden. Die Lage und die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3' Richtung in der nachfolgenden Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' - 3'	Position in	EMBL (Accessionsnr.)
Bluni 1	ATT TAA GTG GA(GC) GGA AAA (AGC)CA CT	6283 – 6260	X68110
Bluni 2	GTY GTT GAT GAG TTC (AG)TG GA	5479 – 5498	X68110
Tobamo 1	GGT TAG GGG GGG ATT CGA A	6381 – 6362	X68110
Tobamo2	CTG TCC GTT ATC TCT GGA GTT	5357 – 5378	X68110
CGMMV spec	GAT TCC TTA TCC GAG AAA GTT	5596 – 5575	D12505
RMV spec	TGA ACA GGG CAG AGT TCG AGG	6041 - 6021	U03387
TMV spec	CGG TCA GTG CCG AAC AAG AA	5609 – 5589	X68110
ToMV spec	CGG AAG GCC TAA ACC AAA AAG	5618 – 5597	X02144
TMGMV spec	CAG TGG TAA GAA GGG TTT TAA	5590 – 5565	M34077
TMGMV neu	AA(AG) TAA ATA A(CT)A GTG AGA AGG G	5566 – 5590	M34077
ORSV spec	GGT GAT AGT GAT GTT GGT ATT A	5630 – 5609	X82130
PMMV spec	GGG TTT GAA TAA GGA AGG GAA GC	5617 – 5595	M81413
HRV coat Hin	CGT TAA CAG GTG ATC CAG G	6235 – 6216	U03387
HRV coat Rück	ARC (CT)CG AAT CAG TAC CAG T	5639 – 5620	U03387
TVCV OSR	CG(AG) ACG TCG AAG GTT TCG AAG G	5422 - 5444	U03387
HRV cluster	AAT GTG TTA GAT AAG TAT AG	5043 – 5066	U03387
Strep 1	ACT GTG AAG CGG AAA TCG AG	5408 - 5428	-
Strep 2	GTG GAA (CT)TT TGA (AG)GC CAA A	4544 - 4524	-
Strep 2rc	ATA CCT ACC ACA GAA ATA ACC	4543 - 4523	-
Strep 3	GG(GT) AC(CT) CAA TAG CAA TTA CAG	3360 - 3339	-
Strep 3rc	GAA CGA ATA AAT TCG AAC CC	3384 - 3404	-
Strep 4	AGT TCA ACA AAT GAA GAA CT	2122 - 2102	-
Strep 4rc	AGG CTG ATA AGT AAT CAA C	2125 - 2144	-
Strep 5	AAG GAG TTT TTA GTT ACT AG	938 - 918	-
Strep 5 rc	AGT AAA ACT ACA GAA CCA CG	979 - 999	-
End 5	TA(AT) T(GT)C A(AC)C AAC AAC AAC AA	0 - 20	-
Strep Hind III	TAA TTA AGC TTC TCA TCA GAA AGC CTC TG	5955 - 5979	-
Strep SacI	CAT GCG AGC TCA TGG TAA GGT TGG GAA	5499 - 5480	-

2.1.3 Restriktionsendonukleasen

Die folgenden Restriktionsendonukleasen wurden verwendet:

Alu I, RsaI, MboI, DdeI, HinfI, TaqI, TasI, PvuII, EcoRI, SacI, EcoRV, HindIII
und wenn nicht anders beschrieben in dem mitgelieferten Puffer eingesetzt.

2.1.4 Virusisolate

Für die Etablierung und Testung der verschiedenen Oligonukleotide sowie für die Etablierung der RT-PCR-RFLP Analyse wurden Tobamovirusisolate verschiedener Spezies und Herkünfte einbezogen. Insgesamt wurden 14 *Tobacco mosaic virus* (TMV), 11 *Tomato mosaic virus* (ToMV), 7 *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV), 8 *Pepper mild mottle virus* (PMMV), 8 *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), 5 *Turnip vein clearing virus* (TVCV), 1 *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), 3 *Streptocarpus flowerbreak virus* (SFBV), 4 *Oilseed rape mosaic virus* (ORMV), 5 weitere Isolate der Crucifereae Subgruppe und je ein Isolat OHIO V und Ohio III verwendet. Die Isolate und ihre Herkünfte sind im Anhang 1 aufgeführt.

Die Virusisolate, die von Herrn Dr. Lesemann (BBA, Braunschweig) zur Verfügung gestellt wurden (Anhang 1), waren serologisch mit Hilfe von Dekorationstests im Elektronenmikroskop charakterisiert worden.

2.1.5 Nährmedien

Die Medien wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angesetzt. Die Zutaten wurden in Wasser gelöst und 20 min bei 121°C und 1 bar autoklaviert. Die temperaturempfindlichen Substanzen Ampicillin (amp, gelöst in 1 ml H₂O), Kanamycin (kana, gelöst in 1 ml H₂O), IPTG (Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid, gelöst in 1 ml H₂O) und X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid, gelöst in 1 ml Dimethylsulfoxid) wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren zugegeben.

(Luria-Bertani) LB-Flüssigmedium:	10 g	Tryptone
(je Liter)		5 g Hefeextrakt
		10 g NaCl
		pH 7,5

LBamp-Flüssigmedium	LB-Medium mit 150 mg Ampicillin/l
---------------------	-----------------------------------

LB-Agar	LB-Medium mit 15 g Microagar/l
---------	--------------------------------

LBamp-Agar	LB-Agar mit 150 mg Ampicillin/l	
AIX-Agar	LBamp-Agar mit 47 mg IPTG und 40 mg XGal/l	
SOB-Medium/l	20 g 5 g 0,5 g 0,2g	Tryptone Hefeextract NaCl KCl pH 7,5
SOC-Medium	SOB-Medium mit 20 mM Glukose und 20 mM Mg ²⁺	

2.2 Methoden

2.2.1 Wirtspflanzenanzucht und Virusvermehrung

Als Wirtspflanzen wurden angezogen:

- Nicotiana benthamiana* (Domin.)
- Capsicum annum* (L.)
- Datura stramonium* (L.)
- Chenopodium quinoa* (Wild.)
- Nicotiana tabacum* (L.) cv. Samsun nn
- Cucumis sativus* (L.)

Infiziertes Blattmaterial wurde in 0,02 M Na-Phosphatpuffer (pH 7) in einer Verdünnung von etwa 1:100 homogenisiert. Diese Suspension wurde auf mindestens zwei mit Karborundum bestäubte Blätter abgerieben, nach etwa 10 min mit Leitungswasser wieder abgespült und die Pflanzen zur Inkubation im Gewächshaus aufgestellt.

2.2.2 Herstellung reiner Virusisolate über Lokalläsionentransfer

Zur Reinigung der Virusisolate über Lokalläsionentransfer wurden je 6 Blätter einer Pflanze der Art *Datura stramonium* L. oder *Chenopodium quinoa* Wild. nach 2.2.1 inokuliert. Bei erfolgter Infektion zeigten diese Pflanzen nach 3 bis 8 Tagen Lokalläsionen. Einzelne Lokalläsionen wurden mit Hilfe eines Korkbohrers aus dem Blatt gestanzt und zwischen zwei Objektträgern mit etwas Natriumphosphatpuffer (0,02 M, pH 7,0) zerrieben, bevor dieses Material wieder auf eine Pflanze der oben genannten Spezies abgerieben wurde. Nach fünf-

maliger Lokalläsionenpassage wurde jeweils eine der Lokalläsionen auf einen systemischen Wirt überimpft. Systemische Wirte, die für die Vermehrung der jeweiligen Spezies eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2: Systemische Wirte für die verschiedenen Tobamovirus-Spezies

Systemischer Wirt	Virusspezies
<i>Nicotiana tabacum</i> L cv. Samsun nn	TMV
<i>Nicotiana tabacum</i> L cv. Samsun nn	ToMV
<i>Nicotiana tabacum</i> L cv. Samsun nn	TMGMV
<i>Nicotiana tabacum</i> L cv. Samsun nn	ORSV
<i>Capsicum annum</i> L.	PMMV
<i>Cucumis sativus</i> L.	CGMMV

2.2.3 Reinigung von Viruspartikeln

Die Partikelreinigung erfolgte nach Gooding & Herbert (1967). Blätter mit systemischen Symptomen wurden geerntet, mit dem vierfachen Volumen des Extraktionspuffers (0,1 M Natriumphosphat, pH 7,0) versetzt und homogenisiert. Zur Abtrennung der groben Pflanzenbestandteile wurde das Homogenisat zunächst durch vier Lagen Mull filtriert und anschließend zentrifugiert (15 min, 5.000 xg, 4°C, Sorvall, Rotor SLA 1500). Der Überstand wurde mit Butanol (9ml / 100ml Überstand) tröpfchenweise versetzt und 45 min bei RT gerührt. Nach einer erneuten Zentrifugation (15 min, 5.000 xg, 4°C, Sorvall, Rotor SLA 1500) wurde der Überstand mit 10 g Polyethylenglykol (PEG) 6000 und 2 g NaCl je 100 ml für 1h auf Eis gerührt. Durch Zentrifugation (15 min, 5.000 xg, 4°C, Sorvall, Rotor SLA 1500) wurde das gefällte Virus sedimentiert, in Viruspuffer (0,02 M Natriumphosphat, pH 7,0) aufgenommen und anschließend die Viruspartikel durch eine Ultrazentrifugation (90 min, 30.000 rpm, 4°C, Beckmann, Ti 45) erneut sedimentiert. Das Sediment wurde in 1 bis 2 ml Viruspuffer aufgenommen und bei 4°C gelagert. Die Konzentration der Viruspartikel in der Suspension wurde photometerisch (260 nm) bestimmt, wobei eine OD von 3,18 bei PMMV, 3,2 bei HRV, 3,16 bei TMGMV und 2,7-3,5 bei TMV einer Konzentration von 1 mg / ml entspricht.

2.2.4 Methoden zur Isolierung viraler Nukleinsäure

2.2.4.1 Gewinnung von RNA aus einer Virusreinigung

Zur Gewinnung der RNA aus der Partikelreinigung (2.2.3) wurde zunächst eine Phenol-extraktion (2.2.4.1.1) und anschließend die Nukleinsäure aus der wässrigen Lösung ausgefällt (2.2.4.1.2). Alle Arbeiten wurden steril durchgeführt.

2.2.4.1.1 Phenolextraktion zur Proteinentfernung

Um Nukleinsäure von Proteinen zu befreien, wurde das gleiche Volumen Roti- Phenol (redestilliert und äquilibriert in TE 10/1, Carl Roth GmbH) der Probe hinzugefügt, gründlich gemischt und anschließend 5 min zentrifugiert (18.300 xg). Die obere, wässrige Phase wurde zur Entfernung von Phenolresten zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgewaschen und wie oben zur Phasentrennung gebracht, bevor die Nukleinsäure als Natriumsalz mit Ethanol aus der wässrigen Phase präzipitiert wurde (2.2.4.1.2) .

2.2.4.1.2 Nukleinsäurefällung aus wässriger Lösung

Zur Isolierung von Nukleinsäure aus wässriger Lösung wurde die Probe mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, (pH 4,8) und dem 2,5 fachen des Volumens 96 %igen Ethanol mindestens 15 min bei -20°C präzipitiert und anschließend 30 min bei 4°C sedimentiert (18.300 xg). Das Sediment wurde mit 500 µl 70 %igen Ethanol zweimal gewaschen, um die Salze zu entfernen (5 min auf Eis inkubieren, 5 min zentrifugieren, 18.300 xg, 4°C). Das Sediment wurde im Heizblock getrocknet und anschließend in Wasser aufgenommen.

2.2.4.2 Präparation von Gesamtnukleinsäure aus Blattmaterial mit Hilfe von Silika nach Rott und Jelkmann (2001)

Die Gesamtnukleinsäure aus Blattmaterial wurde mit Hilfe von Silika nach Rott & Jelkmann (2001) extrahiert. Das Protokoll wurde leicht modifiziert.

Homogenisierungspuffer:	4 M	Guanidinthiocyanat
	0.2 M	NaOAc
	25 mM	EDTA
	1 M	KOAc
	2.5% (w/v)	PVP 40
		pH 5,2

Waschpuffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	0.5 mM	EDTA
	5 mM	NaCl
	50% (v/v)	Ethanol
NaI:	0.75 g	Na ₂ SO ₃ in 40 ml H ₂ O lösen
	36g	NaI (Fluka,71710) hinzufügen

Aufbereitung der Silikapartikel:

Zunächst wurden die Silikapartikel gewaschen. Dazu wurden 60 g Silika (Sigma S-5631) in 500 ml Wasser sorgfältig gemischt. Diese Dispersion wurde zur Sedimentation über Nacht bei RT inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig, aber vollständig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Es wurde erneut auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt, sorgfältig gemischt und vor dem Absaugen fünf Stunden inkubiert. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass der flüssige Überstand vollständig entfernt wurde, da feine Silikapartikel, die bei diesen Waschschriften nicht entfernt werden, nachfolgende Reaktionen (RT-PCR) stören können. Der pH-Wert des verbleibenden Sedimentes wurde anschließend mit HCl auf 2,0 eingestellt, bevor auf 60 ml mit Wasser aufgefüllt wurde. Diese Silikadispersion wurde autoklaviert, aliquotiert und unter Lichtabschluß bei 4°C gelagert.

Für die Gesamtnukleinsäureextraktion wurden 0,2 g Blattmaterial mit 2 ml Homogenisierungspuffer in Extraktionsbeuteln mit Netzeinlage (Bioreba GmbH, Schweiz), mit der Hilfe eines Handhomogenisators zermörsert. Vom Homogenat wurden 500 µl mit 100 µl 10 % (w/v) N-Laurylsarcosine versetzt, 10 min bei 70°C unter gelegentlichem Schütteln und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 10 min bei 18.300 xg zentrifugiert, bevor 300 µl des Überstandes mit 150 µl 96 %igem Ethanol, 300 µl 6 M NaI und 25 µl aufgeschütteltem Silika versetzt und für 10 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation (1 min, 6.000 xg, RT) wurde das Sediment in 500 µl Waschpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Das Sediment wurde getrocknet (5 min, 70°C), in 150 µl H₂O aufgenommen und unter Schütteln für 4 min bei 70°C inkubiert. Durch eine dreiminütige Zentrifugation (18.300 xg, RT) wurde das Silika vollständig sedimentiert, der Überstande (130 µl) wurde abgenommen und zur cDNA Herstellung (2.2.5.1) eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 Präparation von Gesamt-RNA aus Blattmaterial mit Phenol nach Verwoerd (1989)

Extraktionspuffer:	0,1 M	LiCl
	0,1 M	Tris-HCl
	0,01 M	EDTA
	1% (w/v)	SDS
	pH 8,0	
Phenol:	redestilliert, in 10 mM Tris, 1mM EDTA äquilibriert, pH 7,5-8,0 (Roth GmbH)	

In ein 2 ml Reaktionsgefäß wurde eine Mischung aus 300 µl Phenol und 300 µl Extraktionspuffer vorgelegt. Blattmaterial (250 mg) wurde unter flüssigem Stickstoff zermörsert. Das fein zermörserte Blattmaterial wurde, mit einem in Stickstoff gekühlten Löffel, in das vorbereitete Reaktionsgefäß gegeben und intensiv geschüttelt. Nach Zugabe von 300 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde etwa 30 sec erneut intensiv geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (5 min, 18.300 xg) wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und mit der gleichen Menge 4 M LiCl versetzt. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die über Nacht ausgefällte Nukleinsäure wurde 30 min bei 4°C (18.300 xg) sedimentiert. Das Sediment wurde in 184 µl H₂O aufgenommen. Durch die Zugabe von 10 µl RQ-DNase I (1U/µl, Promega), 5 µl 0,3 M MgCl₂ und Inkubation (30 min, 37°C) wurde die DNA abgebaut. Proteine wurden anschließend durch eine Phenolextraktion (2.2.4.1.1) entfernt, bevor die RNA aus der wässrigen Phase mit Natriumacetat gefällt wurde (2.2.4.1.2).

2.2.4.4 Präparation von Gesamt RNA mittels E.Z.N.A Plant RNA Kit (peqLab)

Blattmaterial (0,2 g) wurde unter flüssigem Stickstoff fein zermörsert, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl RPL-Puffer (inklusive 12 µl 2-Mercaptoethanol) sorgfältig vermischt, bevor der Probe 140 µl SP-Puffer zugegeben wurde. Die Mischung wurde bei 10.000 xg und RT (5 min) zentrifugiert und der nun geklärte Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäure aus diesem Überstand wurde durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol ausgefällt (2 min, 10.000 xg, RT). Der Überstand wurde vollständig verworfen und das Sediment mit 100 µl 60 °C warmem Wasser gelöst. Bei manchen Proben war eine zusätzliche Inkubation bei 60 °C für etwa 3 bis 5 min zur vollständigen Lösung des Sedimentes erforderlich. Nacheinander wurden 350 µl RB-Puffer (inklusive 7 µl 2-Mercaptoethanol) und 250 µl Ethanol zugegeben. Mit dieser Mischung wurden die Säulen beladen und für 30 sec bei 10.000 xg zentrifugiert, bevor zweimal mit je 750 µl Waschpuffer Kontaminationen entfernt wurden (30 sec, 10.000 xg). Zum Trocknen des Säulenmaterials

wurden die Säulen erneut zentrifugiert (1 min, 10.000 xg), bevor die RNA mit 50 bis 100 µl Wasser eluiert wurde.

2.2.4.5 Gesamt-RNA-Isolierung mittels TriFast (peqLab)

Blattmaterial (0,2 g) wurde unter flüssigem Stickstoff fein zermörsert und in 1 ml peqGOLD TriFast-Reagenz (peqLab) aufgenommen, 20 sec intensiv geschüttelt, nach 5 min Inkubation bei RT mit 100 µl Chloroform gründlich gemischt und anschließend 10 min bei RT erneut inkubiert. Durch eine 5 minütige Zentrifugation bei 18.300 xg wurden die Phasen getrennt und die RNA anschließend mit 250 µl Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt (15 min Inkubation bei -20 °C, Sedimentation für 10 min bei 10.000 xg und 4°C). Noch vorhandene Salze wurden aus dem Sediment durch zweimaliges Waschen mit 70%-igem Ethanol entfernt und das Sediment nach der Trocknung in 20 µl Wasser aufgenommen.

2.2.4.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Kontrolle von Nukleinsäureproben wurde die Absorption einer geeigneten Verdünnung bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm im Photometer (Ultrospec III, Pharmacia) gemessen und daraus die Konzentration und Reinheit berechnet.

Eine OD_{260nm} von 1,0 entspricht bei Doppelstrang-DNA (dsDNA) einer Konzentration von 50 µg/ml, bei RNA einer Konzentration von 40 µg/ml.

Alternativ zum photometrischen Verfahren wurden DNA-Gehalte auch in Agarosegelen durch Vergleich mit Standard DNA bekannter Konzentration abgeschätzt.

2.2.5 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

2.2.5.1 Synthese von cDNA durch reverse Transkription

M-MLV-Puffer (5x)	250 mM	Tris-HCl
	375 mM	KCl
	15mM	MgCl ₂
	50 mM	DTT pH 8,3
AMV-Puffer (5x)	250 mM	Tris-HCl
	500 mM	NaCl
	30mM	MgCl ₂
	50 mM	DTT pH 8,0

Neun μl Gesamt-RNA (2.2.4.3; 2.2.4.4.; 2.2.4.5) bzw. 0,1 – 1 μg RNA einer Partikelreinigung (2.2.4.1) wurden mit 1 μl Oligonukleotid (50 μM) gemischt, 5 min bei 94°C denaturiert und anschließend sofort für 1-2 min auf Eis abgekühlt („Annealing“).

Zur „annealten“ Probe wurden folgende Reagenzien für die reverse Transkription gegeben:

	5 μl	M-MLV Puffer (5x) oder AMV Puffer (5x)
	2 μl	dNTPs (2 mM)
	0,5 μl	RNAse Inhibitor (40 U/ μl , MBI-Fermentas)
	10-20 U	M-MLV-RT (MBI-Fermentas, Promega)
oder	1-2 U	AMV-RT (Promega)
	ad 25 μl	Wasser

und für 45-60 min bei 42°C inkubiert.

2.2.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Puffer (10x)	200 mM	Tris-HCl (pH 8,75)
	100 mM	KCl
	100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	1% (v/v)	Triton X-100

Mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide wurden Abschnitte der cDNA (2.2.5.1) in einem Personal Cycler 20, bzw. 48, mit Heizdeckel (Biometra) amplifiziert.

Folgender Standard Reaktionsmix wurde in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert:

1-5 μl	cDNA
2,5 μl	10 x PCR-Puffer
1,5-2,5 μl	MgCl ₂ (25 mM)
2 μl	dNTPs (2 mM)
1 μl	Oligonukleotid Hinreaktion (10 μM , 2.1.2)
1 μl	Oligonukleotid Rückreaktion (10 μM , 2.1.2)
0.5-1 U	Taq-Polymerase (Promega, Fermentas)
ad 25 μl	Wasser

Für die spezies-spezifischen Oligonukleotide wurde folgender Ansatz eingesetzt:

1 µl	cDNA
2,5 µl	10 x PCR-Puffer
1,5 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2 µl	dNTPs (2 mM)
1 µl	Oligonukleotid Bluni I, (2.1.2, 10 µM)
1 µl	Oligonukleotid spezies-spezifisch (2.1.2, 10 µM)
0.5-1 U	Taq-Polymerase (Promega, Fermentas)
	ad 25µl Wasser

Für die Amplifizierung wurde folgendes Programmschema verwendet:

1. Schritt	94°C	5 min	initiale Denaturierung
2. Schritt	94°C	1 min	Denaturierung
3. Schritt	50-70°C	45 sec	Oligonukleotid-Annealing
4. Schritt	72°C	1 min	Elongation (Synthese)
5. Schritt	72°C	5 min	abschließende Elongation (Synthese)
6. Schritt	4°C	∞	

Die Schritte 2 bis 4 wurden 25-30 mal wiederholt. Ein Aliquot des PCR Produktes wurde anschließend auf einem Agarosegel (2.2.8.1) kontrolliert.

2.2.5.3 Zwei Methoden der „single tube“ PCR

2.2.5.3.1 „single tube“ PCR

„single tube“ PCR-Puffer:	100 mM	Tris-HCl
	15 mM	MgCl ₂
	50 mM	KCl
	1 % (v/v)	Triton-X-100
		pH 8,8

Die „single tube“ PCR wurde mit verschiedenen RNA-Mengen und Oligonukleotid-kombinationen getestet:

1-5 µl	Gesamt-RNA
3 µl	Triton-x-100 (v/v 1,7 %)
2,5 µl	„single tube“ PCR-Puffer
2 µl	dNTPs (2 mM)
1 µl	Oligonukleotid Hinreaktion (10 µM, 2.1.2)
1 µl	Oligonukleotid Rückreaktion (10 µM, 2.1.2)
2 U	Taq-Polymerase (Promega, Fermentas)
1 U	AMV-RT (Promega)
	ad 25 µl Wasser

PCR Programm:

1. Schritt 42 °C	30	min	Reverse Transkription
2. Schritt 92 °C	2	min	Initiale Denaturierung
3. Schritt 94 °C	30	sec	Denaturierung
4. Schritt 60 °C	30	sec	Oligonukleotid Annealing
5. Schritt 72 °C	1	min	Elongation (Synthese)
6. Schritt 72 °C	5	min	abschließende Elongation (Synthese)
7. Schritt 4 °C	∞		

Die Schritte 3 bis 5 wurden 35 mal wiederholt.

2.2.5.3.2 „single tube“ PCR mit Eppendorf cMaster™ RT plus

Die „single tube“ PCR wurde mit dem cMaster™ RT plus PCR System (Eppendorf) laut Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden verschiedene RNA-Mengen (1-7,5 µl) und Oligonukleotidkombinationen gewählt.

In die Reaktionsgefäße wurden folgende Reagenzien gegeben:

1 µl	Oligonukleotid (10 µM, 2.1.2)
1 µl	Oligonukleotid (10 µM, 2.1.2)
0,5 µl	dNTP's (2 mM)
1–7,5 µl	RNA
	ad 10 µl Wasser

die folgenden Reagenzien wurden gemischt und dem obigen Absatz hinzugefügt, bevor das RT-PCR Programm (2.2.5.3.1) gestartet wurde:

12 µl	Wasser
2,5 µl	Puffer (RT plus PCR-Puffer mit MgCl ₂)
0,25 µl	cMaster RT Enzym-Mix
0,25 µl	cMaster PCR Enzym-Mix

2.2.6 RT-PCR ohne vorherige Nukleinsäureextraktion

2.2.6.1 „Spot-PCR“

GES Puffer:	0,1 M	Glycine
	50 mM	NaCl
	1mM	EDTA
	0,5% (v/v)	Triton-X-100
		pH 9,0

Puffer 1	50 mM	NaOH
	2,5 mM	EDTA

Die „Spot PCR“ wurde nach La Notte *et al.* (1997) durchgeführt. Dazu wurde Pflanzenpresssaft auf eine mit Puffer 1 angefeuchtete Membran (Nylon Hybond N+, Amersham) aufgetragen. Ein ca. 4 mm² großes Membranstück wurde mit 25 µl GES-Puffer und 0,5 µg Hexanukleotiden (Promega) für 10 min auf 90°C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Die Flüssigkeit wurde anschließend für die „*single tube*“ PCR (2.2.5.3) oder cDNA Synthese (2.2.5.1) eingesetzt.

2.2.6.2 „Immuno-Capture“ PCR (IC-PCR)

Beschichtungspuffer:	15 mM 35 mM	Na ₂ CO ₃ NaHCO ₃ pH 9,6
Waschpuffer (PBS):	137 mM 1,5 mM 8,1 mM 2,7 mM	NaCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ KCl pH 7,4
Probenpuffer:	2% (w/v)	PVP in Waschpuffer

In einem 0,5 ml oder 0,2 ml Reaktionsgefäß wurden über Nacht bei 4 °C 100 µl virus-spezifisches Immunglobulin G (IgG 2,5 µg/ml in Beschichtungspuffer) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde in die Gefäße 100 µl Pflanzensaft gegeben (1:10 in Probenpuffer homogenisiert). Der Pflanzensaft wurde für 2-6 h bei 37°C inkubiert. Es wurde erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen, bevor dieser vollständig entfernt wurde. In den so vorbereiteten Reaktionsgefäßen wurde eine „*single tube*“ PCR (2.2.5.3) durchgeführt.

2.2.7 RT-PCR-RFLP („*restriction fragment length polymorphism*“)

Die Verdauung von PCR-Produkten erfolgte direkt im PCR-Ansatz. Dazu wurden 15 µl PCR-Produkt (2.2.5.2) mit 1-2 U Restriktionsendonukleasen bei der jeweils vom Hersteller empfohlenen Temperatur für mindestens zwei Stunden inkubiert. Dieser Ansatz wurde dann auf einem 2,5% (w/v) Agarosegel (2.2.8) aufgetrennt und die Fragmentgröße anhand eines DNA-Längenstandards (pUC9/HaeIII) abgeschätzt.

2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Laufpuffer (1x):	40 mM 1 mM	Tris-Acetat EDTA pH 8,3
Probenpuffer (5x):	10 mM 0,25 % (w/v) 50 % (v/v)	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , Bromphenolblau Glycerol pH 7,0

2.2.8.1 Analytische DNA-Gelelektrophorese

Für die Gele wurde, je nach erwarteter Fragmentgröße, 1% bzw. 2,5% (w/v) Agarose in TAE-Laufpuffer geschmolzen und nach dem Abkühlen auf 50-60 °C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,1 µg EtBr/ml) versetzt. Die Proben wurden 5:1 mit dem Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Trennung erfolgte bei 40-100 V für 0,5-4 h. Anschließend wurden die Nukleinsäurebanden auf einem UV-Transilluminator bei 260 nm detektiert und zur Dokumentation fotografiert (Bio Print Fotodokumentation, Version 96.07; Vilber Lourmat).

2.2.8.2 Präparative Agarosegele und Reinigung der DNA-Fragmente

Präparative DNA-Gelelektrophoresen wurden wie unter 2.2.8.1 beschrieben, aber bei 50 Volt, durchgeführt und anschließend die gewünschte Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Agarose wurde mit dem Gel Extraction Kit (peqLab) nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll für Fragmente von 70 bp - 10 kbp entfernt und die DNA mit 30-50 µl Wasser eluiert.

2.2.8.3 Analytische RNA-Gelelektrophorese

RNA Präparationen aus Pflanzenmaterial wurden durch Gelelektrophorese auf eventuelle Degradierung überprüft. Hierzu wurden alle Lösungen autoklaviert und Gelkammer, -träger und Kamm für 1 h in 1 % (w/v) SDS gelegt, um sie von RNase-Kontaminationen zu befreien. Die RNA Trennung erfolgte analog zur analytischen DNA-Elektrophorese (2.2.8).

2.2.9 Klonierung von PCR-Fragmenten

Für die Sequenzierung und um definiertes Ausgangsmaterial zu erhalten, wurden die PCR-Fragmente in einen Vektor ligiert, das Konstrukt in ein Wirtsbakterium eingeschleust und vermehrt.

2.2.9.1 Konstruktion von T-Vektoren für die Klonierung von PCR-Produkten

Zur Konstruktion des T-Vektors wurde die Methode von Marchuk (1991) verwendet. Das Plasmid (pBluescript II SK-, Stratagene) wurde mit EcoRV linearisiert (2.2.9.2). An die Enden des linearisierten Plasmides wurde jeweils ein Thymin addiert (2.2.9.3).

2.2.9.2 Restriktionsverdauung von DNA

Die Verdauung von Plasmiden erfolgte mit Restriktionsendonukleasen.

Folgender Standardreaktionsmix oder ein vielfaches davon wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert:

x µl	DNA
1,5 µl	Restriktionspuffer (10x)
1-5 U	Restriktionsendonukleasen
	ad 15 µl Wasser

Dieser Reaktionsansatz wurde mindestens für zwei Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperaturen inkubiert. Ein Aliquot des Verdaus wurde dann auf einem Agarosegel auf Vollständigkeit der Reaktion kontrolliert und gegebenenfalls weiter inkubiert.

2.2.9.3 Addition von Thymin an die stumpfen Enden des Vektors

Ein linearisiertes Plasmid (2.2.9.2) wurde über Säulen (E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit, peqLab) oder durch Phenolextraktion (2.2.4.1.1) gereinigt. Um nun an die stumpfen Enden („*blunt end*“) Thymin zu addieren wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

5 µl	linearisiertes, gereinigtes Plasmid (pBluescript SK-, Stratagene)
8 µl	Tailingpuffer (5x, MBI-Fermentas)
1 µl	ddTTP (1mM)
7 µl	terminale Transferase (25 U/µl, MBI-Fermentas)
	ad 40 µl Wasser

Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend abermals über Säulen gereinigt. Die Abwesenheit von anderen Nukleotiden als ddTTP bewirkte die Addition von Thymin am 3'-OH Ende der stumpfen Enden. Da bei dieser Methode Didesoxy-Thymin eingesetzt wurde, welches nicht weiter oxidiert werden kann, konnte nur ein Nukleotid angeknüpft werden.

Die Konzentration wurde nach 2.2.4.6 bestimmt und auf ca. 20 ng/µl eingestellt.

2.2.9.4 Reinigung von PCR-Fragmenten

PCR-Fragmente wurden mit dem E.Z.N.A. Cycle Pure Kit (PeqLab) nach den Angaben des Herstellers gereinigt und je nach eingesetzter Menge in 50 - 100 µl Wasser eluiert. Ein Aliquot wurde zur Mengenabschätzung auf ein Agarosegel (2.2.8.1) aufgetragen.

2.2.9.5 Ligation

Gereinigte Fragmente (2.2.9.4) wurden in folgenden Ligationsansatz gegeben:

2 µl	10x Ligationspuffer (MBI Fermentas)
2-4 µl	gereinigtes Fragment
1 µl	T4-DNA Ligase (1U/µl, MBI Fermentas)
40 ng	T-Vektor (2.2.9.1) bzw. linearisiertes Plasmid
	ad 20 µl Wasser

und bei 4°C über Nacht inkubiert.

2.2.9.6 Transformation von Bakterien mit Plasmid DNA

Die Medien zur Kultivierung und Selektion von Bakterien wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angesetzt.

TFB-Puffer	100 mM	RbCl
	45 mM	MnCl ₂ x 4 H ₂ O
	10 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	3 mM	Hexamin-CoCl ₃
	10 mM	MES-KOH pH 6,3 sterilfiltrieren
DND	12,5 M	DMSO
	1 M	DTT
	10 mM	K-Acetat pH 7,5

Die Plasmide aus der Ligation (2.2.9.5) wurden zur Selektion und Vermehrung in *E. coli* NM 522 oder *M15* nach Hanahan (1983) transformiert.

Dazu wurde *E. coli* NM522 bzw. *M15* auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Mit einer Impföse wurde ein wenig Bakterienrasen (6-8 Einzelkolonien) abgenommen und in einem, mit 700 µl SOB (2.1.5) und 300 µl 2 M MgCl₂ gefüllten, Reaktionsgefäß resuspendiert. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde in einen 1 l Erlenmeyerkolben, welcher mit 29 ml SOB-Medium gefüllt war, überführt. Nach Erreichen des exponentiellen Wachstums (OD_{550nm} von 0,45-0,55) wurde die Suspension in ein 30 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min auf Eis abgekühlt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden steril und mit vorgekühlten Lösungen und Geräten ausgeführt. Durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C (200 rpm, Sigma 2K15, Rotor 12139) wurden die Zellen sedimentiert und dann in 10 ml TFB-Puffer vorsichtig gelöst. Diese wurden 10 min auf Eis inkubiert und wieder 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde nun in 4 ml TFB-Puffer resuspendiert und für weitere 10 min auf Eis gekühlt. Danach wurde im Abstand von 15 min der Suspension zweimal 140 µl DND hinzugefügt und durch vorsichtiges Umschwenken vermischt. Zweihundert µl der Bakterienzellsuspension wurden auf jeden Ligationsansatz (2.2.9.5) gegeben, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen für genau 90 sec einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und danach sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Durch den Hitzeschock wurde die Aufnahmeerhöhung. Die Transformationsansätze wurden mit 800 µl SOC versetzt und bei 37°C (45-60 min) unter Rotieren (Compact Line OV 4, Biometra) rekonstituiert. Je 200 µl wurden nun auf AIX-Agar („blue-white screening“, 2.1.5) ausgespatelt und über Nacht bei 37°C inkubiert, so dass Einzelkolonien entstanden.

2.2.9.7 Kolonie-PCR

Zur Kontrolle von transformierten *E. coli* Kolonien (2.2.9.6) wurden diese direkt in eine PCR-Reaktion eingesetzt, um mit spezifischen Oligonukleotiden das inserierte DNA-Fragment nachzuweisen. Nach Transformation (2.2.9.6) gewachsene Einzelkolonien wurden in 30 µl flüssigem Medium (2.1.5, LBamp) gelöst. Für die nachfolgende PCR wurde 1 µl der gelösten Bakterien eingesetzt, mit einem Standardprogramm amplifiziert (2.2.5) und anschließend auf einem Agarosegel (2.2.8.1) analysiert.

2.2.9.8 *Plasmidisolierung aus E. coli*

Lösung A:	25 mM 10 mM 50 mM	Tris- HCl EDTA Glukose pH 8,0
Lösung B:	200 mM 1 % (w/v)	NaOH SDS
Lösung C:	3 M	Na-Acetat pH 4,8
Lösung D:	100 mM 50 mM	Na-Acetat Tris-HCl pH 8,3

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurde die Methode von Birnboim & Doly (1979) modifiziert.

Bakterien wurden in 3 ml LBamp-Flüssigmedium (2.1.5) über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler vermehrt und am nächsten Morgen geerntet (1-2 min, 18.300 xg). Das Sediment wurde dann für mindestens 10 min eingefroren, danach in 200 µl Lösung A aufgenommen und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Mischung mit 400 µl Lösung B wurden die Zellen alkalisch lysiert und durch 300 µl Lösung C sowie Inkubation auf Eis für mindestens 15 min wurden Proteinmembrankomplexe ausgefällt. Durch Zentrifugation (10 min, 18.300 xg) wurden die Zelltrümmer und Proteinmembrankomplexe sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und nochmals zentrifugiert, um Proteine vollständig zu entfernen. Mit 600 µl Isopropanol wurden die Plasmide ausgefällt und durch 10 minütiges Zentrifugieren sedimentiert. Das Sediment wurde gewaschen, indem es in 200 µl Lösung D aufgenommen und die Plasmide anschließend wieder mit 400 µl Ethanol präzipitiert und durch Zentrifugation sedimentiert wurden. Das trockene Sediment wurde in 50 µl RNaseA-Lösung (1mg/ml) aufgenommen.

2.2.9.9 *Sequenzierung*

Rekombinante Plasmide wurden mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit (peqLab) nach Angaben des Herstellers gereinigt und 2-4 µg ausgefällt. Das Sediment wurde im Heizblock getrocknet und zur Sequenzierung zur Firma MWG-Biotech (Ebersberg) geschickt.

2.2.10 Computeranalyse (Sequenzanalyse)

Die Sequenzanalyse erfolgte mit den folgenden Programmen:

DNA Strider (Marck, 1988)
 UWGCG (Devereux *et al.*, 1984)
 Clustal X (Thompson *et al.*, 1994)
 FASTA (Pearson, 1990)
 pDRAW32 (<http://www.aacalone.com>)

2.2.11 Klonierung und Expression des SFBV Hüllproteingens

Zur Überprüfung des Leserahmens des Hüllproteingens von SFBV wurde dieses in einen Expressionsvektor kloniert und exprimiert.

2.2.12 Expression von Fusionsproteinen in *E. coli*

Expressionspuffer:	50 mM	Tris-HCl
	1 mM	EDTA
	50 mM	NaCl
		pH 8,0

Die Hüllproteinfragmente wurden als Fusionsproteine mit N-terminalen Histidinresten exprimiert. Das rekombinante Expressionsplasmid wurde nach 2.2.11 hergestellt. Dazu wurden 100 µl einer Übernachtskultur (30°C, 260 rpm) von *E. coli* M15 in 5 ml LB-Medium (2.1.5) mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin verdünnt und inkubiert (30°C, 260 rpm). Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 wurde die Expression der Fusionsproteine durch Zugabe von 5 µl 2 M IPTG induziert. Nach 2,5 h Inkubation wurde die Zellsuspension 15 min auf Eis gekühlt, bevor die Zellen aus 4 ml Suspension durch Zentrifugation (1 min, 18.300 xg) geerntet, in 500 µl Expressionspuffer aufgenommen und durch Ultraschall (3 min, 40 W, Cell Disruptor B15, Branson) aufgebrochen wurden. Der Überstand der anschließenden Zentrifugation (10 min, 15.000 xg, 4°C) wurde in 100 µl 2 x SDS-PAGE Probenpuffer (2.2.12.1) aufgenommen.

2.2.12.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Probenpuffer (2x):	20 mM	Tris-HCl
	2 mM	EDTA
	2 % (w/v)	SDS
	10 % (v/v)	2-Mercaptoethanol
	20 % (v/v)	Glycerol
	0,01 % (w/v)	Bromphenolblau
		pH 8,0

Sammelgelpuffer (4x): (SGP)	0,5 M 0,04 % (w/v)	Tris-HCl SDS pH 6,8
Trenngelpuffer (4x): (TGP)	1,5 M 0,04 % (w/v)	Tris-HCl SDS pH 8,8
Laufpuffer:	50 mM 38 mM 0,01 % (v/v)	Tris-HCl Glycine SDS pH 8,3
Acrylamid-/ Bisacrylamid-: Stammlösung (PAA)	30 % (w/v) 2,7 % (w/v)	Acrylamid N,N-Methylenbisacrylamid
APS	10 % (w/v)	Ammoniumpersulfat
TEMED:		Tetramethylethylendiamin

Viruspräparationen (2.2.3) und Fusionsproteine (2.2.12) wurden mit der SDS-PAGE nach Laemmli (1970) analysiert, bei welcher Proteine unabhängig von ihrer Ladung nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Dafür wurde eine Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur Mighty Small II (Hoefler Scientific Instruments) mit diskontinuierlichen Gelen aus einem 15 %igen Trenngel und einem darüberliegenden 4 %igen Sammelgel mit einer Größe von 80 mm x 100 mm x 1,5 mm verwendet.

Die Gele setzten sich wie folgt zusammen:

	Trenngel 15 %	Sammelgel 4 %
PAA	22,5 ml	1,3 ml
TGP	11,25 ml	-
SGP	-	2,5 ml
H ₂ O	10,8 ml	6,1 ml
APS	300 µl	50 µl
TEMED	30 µl	5 µl

Vor dem Gelauftrag wurden die Proben mit einem Volumen Probenpuffer (2x) versetzt und 5 min gekocht. Die Auftrennung erfolgte in Laufpuffer bei 30 mA.

Ein Größenstandard wurde jeweils zur Größenabschätzung parallel aufgetragen. Nach Abschluss der Auftrennung wurden die Proteine im Gel gefärbt (2.2.12.2) oder auf eine Membran übertragen (2.2.13)

2.2.12.2 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brillantblau

Die in der SDS-PAGE (2.2.12.1) getrennten Proteine können nach Weber & Osborn (1969) im Gel mit Coomassie –Brillantblau gefärbt werden.

Färbelösung:	0,25 % (w/v)	Coomassie-Brillantblau R 250
	50 % (v/v)	H ₂ O
	40 % (v/v)	Ethanol, technisch
	10 % (v/v)	Eisessig

Die Lösung wurde unter Rühren auf 60°C erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend durch einen Faltenfilter gegeben.

Entfärbelösung:	25 % (v/v)	Ethanol, technisch
	67,5 % (v/v)	Wasser
	7,5 % (v/v)	Eisessig

Zur Färbung der Proteine wurden die Trenngele der SDS-PAGE (2.2.12.1) mindestens 30 min in der Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung überschüssiger Farbstoff entfernt.

2.2.13 Elektroblob Immuno Assay (Western-Blot)

Der Elektoblot (Western-Blot) zum serologischen Nachweis von Proteinen wurde nach Towbin *et al.* (1979) ausgeführt.

Die Proteine wurden zunächst nach 2.2.12.1 in einer SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend nach 2.2.13 auf eine Membran übertragen.

2.2.13.1 Elektroblobbing

Blotting-Puffer:	25 mM	Tris-HCl
	192 mM	Glycine
	20 % (v/v)	Methanol
		pH 8,3

Ein Sandwich aus:

- Kathode
- Kunststoffgitter
- Schwamm
- Blotting Papier (Schleicher & Schuell)
- PVDF-Membran (0,45 µm, Roth)
- SDS-PAGE-Gel nach Elektrophorese (2.2.12.1)
- Blotting Papier (Schleicher & Schuell)
- Schwamm
- Kunststoffgitter
- Anode

wurde unter Blotting-Puffer zusammengebaut und in einer mit Blotting-Puffer gefüllte Vertikal-Elektroblot-Kammer (Hoefer Scientific Instruments) überführt. Der Proteintransfer erfolgte in Blottingpuffer über Nacht bei 100 mA unter Kühlung.

2.2.13.2 Immunfärbung von Proteinen

PBS-T	0,05% (v/v)	Tween 20 in PBS (2.2.6.2)
Fast Red-Naphthol-Substratlösung	6 mg	Naphthol AS-MX-Phosphate-disodium salt (Sigma) in 15 ml H ₂ O
	90 mg	+ Fast Red TR Salt (Sigma) in 15 ml 0,2 M Tris-HCl 2mM MgCl ₂ pH 8,0

Unspezifische Bindungstellen auf der PVDF-Membran (2.2.13.1) wurden mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-T 30 min blockiert und mit virusspezifischen polyklonalen Antikörpern (Rohserum, verdünnt 1:250 bis 1:1000 in 1%iger (w/v) Milch in PBS-T) für eine Stunde inkubiert. Mit dem zweiten anti-Immunglobulinantikörper (goat anti rabbit, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, verdünnt 1:10.000 in 1%iger (w/v) Milch in PBS-T) wurde ebenfalls eine Stunde inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurde dreimal 5 min mit PBS-T gewaschen. Detektiert wurde mit Fast-Red-Naphthol-Substratlösung. Alle Inkubationsschritte erfolgten auf einer Wippe bei Raumtemperatur.

2.3 Elektronenmikroskopie

Gereinigte Viruspartikel (2.2.3) sowie Pflanzenextrakte, homogenisiert in 0,1 M Na-phosphatpuffer (pH 7,0), wurden elektronenmikroskopisch auf Anwesenheit von Viruspartikeln untersucht. Dafür wurden Kupfernetze (300 Maschen), die mit Pioloform (0,5 % (v/v) in Chloroform) befilmt und durch Kohlebedampfung stabilisiert waren, benutzt.

Die Kupfernetze wurden 5 min auf einem 20 µl-Tropfen von Viruspartikelsuspension oder Pflanzensaft inkubiert, der Überschuss wurde mit ca. 40 Tropfen Wasser gewaschen und mit Filterpapier vorsichtig getrocknet. Anschließend wurden die Kupfernetze auf einem 1% (w/v) Uranylacetat Tropfen negativ kontrastiert und mit Filterpapier getrocknet.

Die Präparate wurden im Elektronenmikroskop (TEM 420, Philips) untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl und Vorbereitung der Virusisolate zur Etablierung der generellen und differenzierenden Untersuchungen

3.1.1 Reinigung der Virusisolate

Wenn notwendig, wurden die Virusisolate mit Hilfe von fünf Lokalläsionstransfers (2.2.2) vereinzelt und anschließend auf einem systemischen Wirt vermehrt.

3.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen

Aus Blättern mit deutlichen Symptomen bzw. nicht infizierten Pflanzen wurde die RNA mit Hilfe von Silika (2.2.4.2) isoliert. Isolierungen aus 0,2 g Pflanzenmaterial ergaben zwischen 100 µg und 300 µg RNA, wobei aus jüngeren Blättern in der Regel eine höhere RNA-Menge isoliert werden konnte.

Die Überprüfung von 1-2 µg Gesamt-RNA auf einem nativen Agarosegel (2.2.8.1) ergab bei infizierten wie bei gesunden Pflanzen das erwartete Bandenmuster aus ribosomaler RNA. Virale RNA-Banden konnten erwartungsgemäß mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Zum Vergleich wurde auch Gesamt-RNA mit der Methode nach Verwoerd (2.2.4.3), mit dem E.Z.N.A Plant RNA Kit (2.2.4.4) und mit TriFast (2.2.4.5) isoliert. Alle hier aufgeführten Methoden der RNA Isolierung eigneten sich gleichermaßen für die anschließende Amplifizierung mittels RT-PCR (2.2.5).

3.1.3 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese (2.2.5.1) konnte sowohl mit 1-2 U AMV (Promega) als auch mit 10-20 U M-MLV (Fermentas / Promega) erfolgen. Beide Enzyme lieferten gleichwertige Ergebnisse.

3.1.4 Auswahl der Oligonukleotide

3.1.4.1 Generelle PCR zum Nachweis von Tobamoviren

Zur Entwicklung der generellen Oligonukleotide wurden Sequenzinformationen der EMBL Sequenzdatenbank zu den Spezies TMV (X68110, Kob *et al.*, 1992), ToMV (X02144, Belenovich *et al.*, 1997), PMMV (M81413, Alonso *et al.*, 1991), ORSV (X82130, Ryu und Park, 1995) und TMGMV (M34077, Bodaghi *et al.*, 2000) zusammengetragen.

Es wurden die Oligonukleotidpaare Bluni I - Bluni II und Tobamo I - Tobamo II entwickelt. Beide Oligonukleotidpaare liegen in Regionen mit konservierter Sequenz (Abb. 5). Die Oligonukleotide, die für die cDNA-Synthese verwendet wurden, lagen am nicht-kodierenden 3'Ende in der tRNA-ähnlichen Struktur. Das zugehörige zweite Oligonukleotid lag im Bereich des „*origin of assembly*“, der wiederum Bestandteil des Leserahmens für das Transportprotein ist. Die Oligonukleotidpaare (Bluni I-II und Tobamo I-II) wurden also so gewählt, dass sie den Leserahmen für das Hüllproteingen flankieren.

Abb.5: Sequenzvergleich Oligonukleotid Tobamo I II und Bluni I II

Abb.: 5A

Oligonukleotide **Tobamo I** und **Bluni I**

```

Bluni I
tmv          TGTGTCCGTAATCACAC----G-TGGTGCGTACGATAACGCATAGTGBTTTTCCSTCCACTTAAAT
tomv        GTGTTTCTAAAACACAC----G-TGGTACGTACGATAACGTACAGTGTTTTTCCCTCCACTTAAATCGA
orsv        CACATTTAAAATAATGCGTCCG-TGGTGCATACGATAATGCATAGTGTTTGTCCCTCCACTTAAATCGA
pmmv        TGAACG-AACATTAACGTCG-TGGCGAGTACGATAACTCGTAGTGTTTTTCCCTCCACTTAAATCGA
tmgmv       TGAA---GACTTAAAATTCAGGGTGGCTGATACCAAATCAGCAGTGTGTGTTTCGTCCACTTAAATATA
cgmmv       TTCGAG-GGTCTT---CTGATGGTGGTGCACACCAAAGTGCATAGTGTTCCTCCGTTCACTTAAATCGA
              *   **   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

tmv          AGGGTTGT-GTCT-TGGATCGCGCG-GGTCAAATGTATA-TGGTTCA-TATACATCCGCAGGCACGTAA
tomv        AGGGTAGT-GTCT-TGGAGCGCGCG-GAGTAAACATATA-TGGTTCA-TATATGTCCGTAGGCACGTAA
orsv        AGGGTTGT-GTATATGGATCATGCG-GATAAAGT-TATACTGTTGCAGTATAACCCGTTATACACATAA
pmmv        AGGGTTGTGCG--TTGGGATGGAACGCAATTAATACATG-TG-TGACGTGTATTTGCGAACG-ACGTAA
tmgmv       ACGATTGCATATCTGGATCCAAC--AGTTAAAC-CATG-TGATGGTGTATACTGTGGTATG-GCGTAA
cgmmv       ACGGTTTGTCTCATTTGGTTTGC GGA--AACCTCTCACGTG-TGACGTTG-AAGTTTCTATGGG-CAGTAA
              * * *   * * *   * * *   * * *   * * *   * * *

tobamo I
tmv          T-AAA-GCGAGGGGTTCGAATCCCCCGTTACCCCGGTAGGGGCCA
tomv        A-AAAAGCGAGGGAATTCGAATCCCCCGGAACCCCGGTGAGGGGCCA
orsv        A-ATT-ATGAGGGAATTCGAATCCCCC-TTACCTCGGGTAGAGGGCCA
pmmv       TTATTTTTCAGGGGTTTCGAATCCCCCGGAACCGCGGGTAGCGGCCA
tmgmv       A-ACATCGGAGAGGTTTCGAATCCTCCCTAACCGCGGTAGCGGCCA
cgmmv       T-TCTGAAGGGGTTTCGAATCCCCCTTTCCCGGGTAGGGGCCA
              *   ** *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
    
```

Abb.: 5B

Oligonukleotide **Tobamo II** und **Bluni II**

```

Tobamo II
tomv        AAAGAACATATGGCAGGTCTTAGTAAATATTAATAATGTAATAATGAGTGCAGGGGCTACTGCCCTTTGTCATTAGA
tmv         GAAAAACGCTGGCAAGTTTATGTTAATATAGAAAATGTAAGATGTCAGCGGGTTTCTGTCCGCTTTCTCTGGA
tmgmv       GAAGCACCGTGGCAAGTGTAGTGAATATCAAAGGAGTGGCTATGGAAGAAGGATACTGTCCCTTATCTTTGGA
pmmv       GAGAAAAGTTGGCAAGTTTATGTTAATATAGAGGTGTGCCATGGAAGGGGTTTCTGTCTTTATCTTTGGA
orsv       TAAAGGAATATGGCAAGTTATGACAAATATAGAGGTGTGAAATGGAAGGGGTTTCTGCCATTATCTTTGGA
              * * *   * * *   * * *   * * *   * * *   * * *

cgmmv       TCGCGATCCTTGGTCTTTATTTGTGAGACTCTCTAATGTGGGTATTAAGATGGTTCATCCTTTGACTTTGGA
              *   ** *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

TobamoII
tmv         ATTGTGTCTGTGTATGTTTATAAAAAATAACAAAATGGGTTTGGAGGAGAAAGTAACGAGTGTGAACGA
tmv         GTTGTGTCTGTGTATGTTTATAGAAAATAATAAAAATAGGTTTGGAGAGAGAAGATTACAAACGTGAGAGA
tmgmv       GTTCGTTTCAATTTGTGTAGTACATAAAAATAATGTAAGAAAAGTTTGGAGGAGCGTATTTGAGTGTGACAGA
pmmv       GTTGTCTCAGTTTGTATGTACACAAATCAAATAAAAATAGGCTTGGAGAGAGAAAATTACTAGTGTGTCAGA
orsv       GTTGTGTTCTATTTGCGTGGTGTATTTAAATAATAATAAACTCGGACTGAGAGAGAAGATTTGAAACGTAACAGA
              **

cgmmv       GGTGCTTGTGTTAGTCTGCTACAATACTCTATTATCAAAAAGGGTCTTAGAG---CTTCTGTAGTCTGAGTCTGT
              * * *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Bluni II
tomv        TGGAGGACCCATGGAACCTTCAGAAGAAATTGTTGATGAGTTCATGGAAGTGTCCAAATGTCCGTTAGACTCGC
tmv         CGGAGGGCCCATGGAACCTTACAGAAGAAATCGTGTGATGAGTTCATGGAAGATGTCCCTATGTCGATCAGGCTTGC
tmgmv       CCGCTCCCAATTGAACTCACTGAAAAAGTTGTTGAGGAGTTCGTGGAATGAAGTACCAATGGCTGTGAAACTCGA
pmmv       AGGAGGACCCGTTGAACTTACAGAAGCAATCGTGTGATGAGTTCATGGAATCAGTTCCAATGGCTGACAGATTACG
orsv       AGGAGGGCCCACTGAACTTACTGAAAGCAATTTGTTGATGAGTTCGTGGAAGAAATTCCTATGGCTGCTAGGCTCAA
              * * *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

cgmmv       CGTCTCTCCGATCAGTCTATTGTCCTAG--ATTCCTTA-TCCGAGAAAGTTGAACCTTTCTTTGACAAAGTTCC
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
    
```

Abb. 5: Sequenzvergleich zur Entwicklung der generellen Oligonukleotide
 Sequenzvergleich der nicht kodierenden 3' Bereiche, die zur Auswahl der genuspezifischen Oligonukleotide (Bluni I und Tobamo I) geführt haben. Das Oligonukleotid Bluni I kann zur cDNA Synthese der Spezies TMV, ToMV, TMGMV, PMMV und ORSV verwendet werden. Das Oligonukleotid Tobamo I kann zur cDNA Synthese von RMV und CGMMV eingesetzt werden (A). Sequenzvergleich von Teilen des „origin of assembly“, die zur Auswahl der genuspezifischen Oligonukleotide Bluni II und Tobamo II geführt haben. Amplikons von TMV, ToMV, TMGMV, PMMV und ORSV konnten mit den Oligonukleotiden Bluni I-II erhalten werden, einige Isolate der Crucifereae Subgruppe konnten mit dem Oligonukleotid Tobamo I amplifiziert werden (3.6.1.1), CGMMV mit der Oligonukleotidkombination Tobamo I und CGMMV_{spec}. Die resultierenden Oligonukleotide sind über den Sequenzen des Sequenzvergleiches aufgeführt(B).

Das Oligonukleotid Bluni I kann zur cDNA Synthese der Spezies TMV, ToMV, TMGMV, PMMV, ORSV und SFBV verwendet werden. Das Oligonukleotid Tobamo I kann zur cDNA Synthese von RMV und CGMMV eingesetzt werden. Amplikons von TMV, ToMV, TMGMV, PMMV, ORSV und SFBV konnten mit den Oligonukleotiden Bluni I-II erhalten werden, TVCV Isolate (Crucifereae Subgruppe) konnten mit dem Oligonukleotid Tobamo I amplifiziert werden (3.6.1.1), CGMMV Isolate mit der Oligonukleotidkombination Tobamo I und CGMMV_{spec.}

Wie anhand der Sequenzvergleiche zu ersehen ist, liegt das Oligonukleotidpaar Bluni I - Bluni II in einer Region mit stärker konservierter Sequenz als das Oligonukleotidpaar Tobamo I - Tobamo II. RT-PCR Versuche mit diversen Isolaten ergaben zuverlässigere Ergebnisse mit der Oligonukleotidkombination Bluni I - Bluni II als mit der Oligonukleotidkombination Tobamo I - Tobamo II. Es konnte zudem gezeigt werden, dass das Oligonukleotidpaar Bluni I - Bluni II in der Lage war, innerhalb eines breiten Temperaturspektrums zu binden (50 °C – 70 °C), was die Testsicherheit erhöht. Allerdings traten bei Annealing Temperaturen unter 56°C in einigen Fällen unspezifische Reaktionen auf. Ein optimales Ergebnis wurde für dieses Oligonukleotidpaar bei einer Annealing Temperatur von 60°C ermittelt. Das nachfolgend aufgeführte PCR-Schema erwies sich als optimal:

1. Schritt	94°C	5 min	Initiale Denaturierung
2. Schritt	94°C	1 min	Denaturierung
3. Schritt	60°C	45 sec	Oligonukleotid-Annealing
4. Schritt	72°C	1 min	Elongation (Synthese)
5. Schritt	72°C	5 min	abschließende Elongation (Synthese)
6. Schritt	4°C	∞	

Die Schritte 2 bis 4 wurden 25 mal wiederholt. Eine höhere Anzahl von Zyklen verursachte unspezifische Banden.

Die erwarteten Fragmentgrößen von etwa 800 bp (Abb. 6a) bei einer RT-PCR mit der Oligonukleotidkombination Bluni I - Bluni II konnten für die Spezies TMV (Spur 1), ToMV (Spur 2), TMGMV (Spur 3) und PMMV (Spur 4) auf einem 1% Agarosegel detektiert werden. Bei der Detektion von ORSV-Isolaten ergab sich als Besonderheit eine Doppelbande. Dies wurde durch die Sequenzdaten bestätigt, da ORSV eine Sequenzwiederholung am nicht-kodierenden 3'-Ende aufweist, und genau in dieser Region das Oligonukleotid Bluni I bindet (Abb. 6a, Spur 5). Diese Doppelbanden sind für ORSV charakteristisch.

Abb. 6A

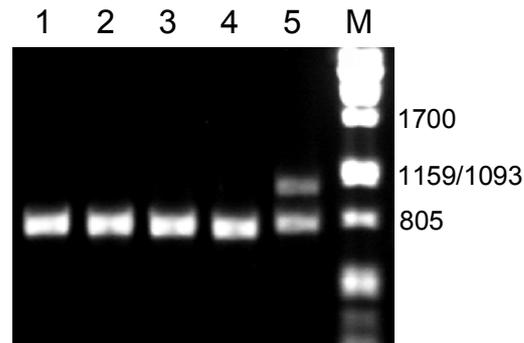


Abb. 6B



Abb. 6: PCR-Produkte unter Verwendung der Oligonukleotide Bluni I-Bluni II nach Elektrophorese in einem 1% Agarosegel. Spur 1 =TMV, Spur 2 = ToMV, Spur 3 = TMGMV, Spur 4 = PMMV, Spur 5 = ORSV, M = λ DNA verdaut mit PstI (in bp) (A). Oligonukleotidlage von Bluni I (obere Zeile) in dem Bereich von 6260-6400 nt bei ORSV (untere Zeile, Sequenz von Ryu und Park, 1995, X82130)(B).

CGMMV aus der Cucurbitaceae Subgruppe konnte mit keinem der beiden Oligonukleotidpaare amplifiziert werden, wie es aus der Abb. 7 deutlich wird. Das Oligonukleotid Bluni I bindet nur schlecht, die Oligonukleotide Tobamo II und Bluni II binden in der entsprechenden Region nicht. Eine Kombination des Oligonukleotides Tobamo I und einem CGMMV-spezifischen Oligonukleotid (2.1.2) war jedoch für den Nachweis geeignet. Die RT-PCR-Bedingungen zur Amplifikation eines 830 bp großen CGMMV PCR-Fragmentes waren identisch mit den oben Beschriebenen.

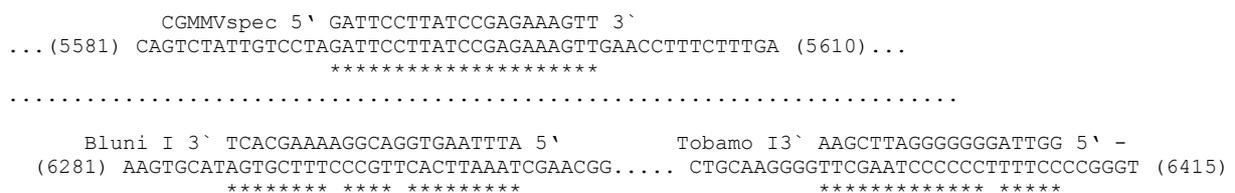


Abb. 7 Lage der Oligonukleotide CGMMV_{spec}, Bluni I und Tobamo I auf der Sequenz CGMMV (Ugaki *et al.*, 1991 (D12505)). * geben passende Basenpaarungen an.

3.1.5 Klonierung und Sequenzierung ausgewählter PCR-Fragmente

Ausgewählte PCR-Fragmente wurden nach 2.2.9.5 ligiert und anschließend nach 2.2.9.6 transformiert. Durch das Selektionsmedium (LBamp) wurden die Bakterienzellen auf Anwesenheit des Plasmides selektiert. Rekombinante Plasmide wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR (2.2.9.7) auf das Vorhandensein des ligierten PCR-Fragmentes getestet. Positiv getestete Klone wurden ausgewählt, nach 2.2.9.4 gereinigt und sequenziert(2.2.9.9).

3.2 Differenzierung von ausgewählten Spezies der Solanaceae Subgruppe

3.2.1 Differenzierung mit Hilfe der Restriktionsverdauung von PCR-Fragmenten (RT-PCR- RFLP)

Für die Etablierung der RT-PCR-RFLP wurden PCR-Fragmente von ein bis sieben Isolaten jeder Spezies in Bakterien kloniert, um einheitliches Material zu erhalten. Zur Differenzierung der verschiedenen Spezies der Solanaceae Subgruppe wurden die PCR-Fragmente, die mit einer RT-PCR mit dem Oligonukleotidpaar Bluni I – Bluni II gewonnen und kloniert (3.1.5) worden waren, mit den Restriktionsendonukleasen AluI, RsaI, MboI, DdeI, HinfI, TaqI und TasI verdaut (2.2.9.2). Die Restriktionsmuster von jeweils zwei bis sieben Klonen einer Spezies wurden auf Einheitlichkeit mit Hilfe der RFLP-Analyse untersucht. Jeweils ein Klon eines Isolates mit repräsentativem Muster wurde für die Sequenzierung ausgewählt. In den meisten Fällen waren die Restriktionsmuster der verschiedenen Klone eines Isolates gleich und konnten einer Spezies zugeordnet werden. Im Wesentlichen stimmten die durch die RT-PCR-RFLP gewonnenen abgeschätzten Fragmentgrößen mit den durch Computeranalysen berechneten Fragmentgrößen überein. Die erhaltenen Fragmentgrößen sind in den nachfolgenden Tabellen für die einzelnen Spezies zusammenfassend dargestellt. In der linken Spalte ist jeweils das berechnete Restriktionsmuster von Referenzisolaten bereits publizierter Sequenzen angegeben. Rechts davon befinden sich die Restriktionsmuster der eigenen Untersuchungen, die den Referenzisolaten entsprechen. Daran anschließend werden die Isolate mit Abweichungen dargestellt, diese Abweichungen sind grau gekennzeichnet. Die resultierenden PCR-Fragmente einiger Isolate wurden sequenziert (2.2.9.9 / 3.1.5) und somit ist auch die Angabe von genauen Fragmentgrößen in den nachfolgenden Tabellen möglich. Die Fragmentgrößen der RT-PCR-RFLP für Isolate, bei welchen keine Sequenzinformationen vorlagen, konnten nur anhand des Längenstandards abgeschätzt werden. Darüber hinaus sind Fragmentgrößen unter 100 bp auf den hier verwendeten Agarosegelen nicht mehr nachweisbar und daher für nicht sequenzierte Isolate in den Tabellen nicht aufgeführt, bei sequenzierten Isolaten sind solche Werte kursiv gedruckt.

Im Folgenden werden die Restriktionsmuster der einzelnen Spezies aufgeführt, die eine Grundlage für die Praxisanwendung darstellen.

3.2.1.1 Restriktionsmuster von Tobacco mosaic virus (TMV)

Für die Spezies TMV konnten mit der RT-PCR-RFLP drei Muster nachgewiesen werden, wie dies in der Tabelle 4 dargestellt ist. Wie Isolat T5 verhielt sich Isolat T7, wie T1 die Isolate T3 und T6. Zum Vergleich ist in der nachfolgenden Tabelle 3 ein Restriktionsmuster, das aus einer Sequenz (X68110, Kob *et al.*, 1992) berechnet wurde, angegeben. Für die Restriktionsendonukleasen Rsa I, Hinf I und Tas I sind die Restriktionsmuster der in einem 2,5 % Agarosegel darstellbaren Fragmente gleich. Für die Restriktionsendonukleasen Alu I, Mbo I, Dde I und Taq I konnten deutliche Unterschiede festgestellt werden, diese sind in der nachfolgenden Tabelle grau hinterlegt. Da das Restriktionsmuster der Isolate T1, T3, T5 und T7 geringfügig von dem Muster des Referenzisolates abwichen, wurden diese sequenziert, durch die Sequenz konnten die Restriktionsmuster bestätigt werden.

Tab. 3: Restriktionsmuster von TMV-Isolaten

Restriktionsenzyme	X68110**	T1/ T3/T6/T8 T9/T10/T11	T5/T7*	T4
AluI	356 307 130 12	356 307 130 12	356 307 89 41 12	356 307 130 12
RsaI	319/319 127 34 6	319/319 127 34 6	319/319 127 34 6	319/319 127 34 6
MboI	577 159 55 14	523 156 59,53 14	341 182 156 59, 53 14	523 155 59, 53 14
DdeI	475 263 67	475 330	475 263 67	475 263 67
HinfI	584 194 21 6	584 194 21 6	584 194 21 6	584 194 21 6
TaqI	171,171 140 134 125 57 6	171,171 140 135 125 57 6	311 171 135 125 57 6	171,171 140 134 125 57 6
TasI	239 177, 177 127 67 13 5	239 181,174 127 67 13 4	239 174 127 98 82 67 13 5	239 181,173 127 67 13 4

* TMV Isolate, die mit RFLP untersucht wurden, zur Herkunft siehe Anhang 1

** Referenzsequenz: X68110 (Kob *et al.*, 1992)

3.2.1.2 Restriktionsmuster von *Tomato mosaic virus (ToMV)*

Für die Spezies ToMV konnte mit Hilfe der RT-PCR-RFLP ein Muster bei 10 Isolaten nachgewiesen werden. Nur das Isolat L2 zeigte Abweichungen bei der RT-PCR-RFLP. Es fehlte offensichtlich eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease DdeI. Wie die Sequenzdaten zeigten, sind weitere Unterschiede vorhanden, diese wurden jedoch auf einem Gel nicht sichtbar. Weitere in der EMBL-Datenbank zugängliche Sequenzen von ToMV wiesen alle die DdeI-Erkennungsstelle auf. Zum Vergleich sind die aus der Computeranalyse erhaltenen Daten des Isolates X02144 (Belenovich *et al.*, 1997) in der Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Restriktionsmuster von ToMV-Isolaten

Restriktions-enzyme	X02144***	L1*	L2**
AluI	536 254	536 254	536 254
RsaI	307 191 127 111 24 10, 10 6, 4	305 191 133 111 25 10, 10 6, 4	324 305 111 26 10, 10 4
MboI	456 334	456 334	456 334
DdeI	395/395	395/395	790
HinfI	316 265 161 42 6	316 265 161 42 6	316 265 161 42 6
TaqI	451 284 55	430 282 57 21	430 282 57 21
TasI	187 152 123 93 84 72 59 20	184 152 123 97 84 72 39 20, 19	188 172 142 93 84 72 39

* Fragmentlängen eines typischen ToMV Isolates (L1)

**Fragmentlängen des einzigen abweichenden Isolates L2

*** Referenzsequenz : X02144 (Belenovich *et al.*, 1997)

3.2.1.3 Restriktionsmuster von Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV)

Es wurden sieben verschiedene Isolate untersucht, von denen vier sequenziert wurden. Bei der RT-PCR-RFLP ergaben sich bei den verschiedenen Isolaten keine Unterschiede. Zum Vergleich ist in der nachfolgenden Tab. 5 ein Restriktionsmuster einer TMGMV Sequenz (M34077, Bodaghi *et al.*, 2000) und beispielhaft das Muster von Isolat M1 dargestellt.

Tab. 5: Restriktionsmuster von TMGMV-Isolaten

Restriktions-enzym	M34077*	M1**
AluI	269 139 119 101 96 52	269 139 119 101 96 52
RsaI	492 160 98 26	492 160 98 26
MboI	337 257 160 14 8	337 257 160 14 8
DdeI	535 141 100	535 141 100
HinfI	367 243 166	367 243 166
TaqI	353 242 137 44	353 242 137 44
TasI	162 143 131 114 88 77 52 9	162 143 131 114 88 77 52 9

*Restriktionsmuster des Isolates M1

** Referenzsequenz: M34077 (Bodaghi *et al.*, 2000)

3.2.1.4 Restriktionsmuster von Pepper mild mottle virus (PMMV)

Bei den Isolaten der Spezies PMMV konnten drei verschiedene Restriktionsmuster nachgewiesen werden, wie dies in der nachfolgenden Tabelle 6 dargestellt ist. Das Muster der Isolate P1, P2, P5 und P8 verhielt sich wie der Pathotyp PMMV S (M81413, Alonso *et al.*, 1991), die Homologie von P2 und P5 betrug zu diesem Isolat (M81413) 99 % bzw. 98 %, die Isolate P3, P7 und P9 ergaben Restriktionsfragmente nach einem Verdau TaqI wie der Pathotyp PMMV I (AJ308228, Velasco *et al.*, 2002). Die Homologie des Isolates P7 zu PMMV-I (AJ308228) beträgt 98 %. Das Restriktionsmuster von HinfI unterscheidet sich bei den beiden Pathotypen nicht. Auffallend ist deswegen das abweichende Muster der Isolate P3, P7 und P9. Das Restriktionsmuster des italienischen Isolates P6 konnte keinem der beiden Pathotypen eindeutig zugeordnet werden. Die Restriktionsmuster von RsaI, DdeI und Tas I verhielten sich wie beim Pathotyp PMMV S, wogegen das Restriktionsmuster von Taq I sich wie bei dem Pathotypen PMMV I verhielt. Das Restriktionsmuster von AluI war keinem der beiden Pathotypen zuzuordnen. Die Sequenzuntersuchungen von Isolat P6 zeigten Abweichungen einzelner Nukleotide, die über die gesamte Sequenz gleichmäßig verteilt waren und in den meisten Fällen PMMV I und nur zu einem geringen Teil der Sequenz des PMMV-S homolog waren.

Insgesamt wurden 8 Isolate von PMMV untersucht, von diesen entsprachen vier dem Restriktionsmuster PMMV S und drei dem Restriktionsmuster PMMV I, das Muster des Isolates P6 konnte nicht eindeutig zugeordnet werden. Das Isolat P6 wies eine Homologie von 97 % zu PMMV-S und 93 % zu PMMV-I auf.

Tab. 6: Restriktionsmuster von PMMV-Isolaten

Restriktions-enzym	PMMV S M81413	P2/P5/P1/P8*	PMMV I AJ 308228	P7/P3/P9*	P6*
AluI	495 132, 131,	495 132, 131,	468 131 68 64 27	495 132 69 60	631 132
RsaI	334 284 105 35	334 284 105 35	439 281 36	439 281 36	334 284 105 35
MboI	501 257	501 257	501 257	501 257	501 257
DdeI	693 65	693 65	453 241 62	453 241 62	693 65
HinfI	251 217 147 109 19 15	251 217 147 109 19 15	251 217 147 109 19 15	326 251 148 16, 15	251 217 147 109 19 15
TaqI	617 124 17	617 124 17	411 124 113 76 32	411 124 113 108	411 221 124
TasI	530 100 79 49	530 100 79 49	235 144 104,100 79 49,47	339 101 79, 72, 71 47	530 100 79 49

*Restriktionsmuster der verwendeten PMMV Isolate P2 /P5/P1/P8/P7/P3/P9 und P6

** Referenzsequenzen: M81413 (Alonso *et al.*, 1991) und AJ308228 (Velasco *et al.*, 2002)

3.2.1.5 Differenzierung von *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV)

Bei ORSV-Isolaten liegt eine Sequenzwiederholung am nicht-kodierenden 3'-Ende vor, so dass das Oligonukleotid Bluni I zweimal binden kann. Daraus resultieren Doppelbanden mit Größen von etwa 790 bp und 890 bp, wenn das Oligonukleotidpaar Bluni I - Bluni II eingesetzt wurde. Dies ist ein hinreichendes Kriterium zum Nachweis dieser Spezies, so dass keine Restriktionsmusteranalyse notwendig ist. Bei Vorhandensein von Doppelbanden einer RT-PCR ist eine Restriktionsmusteranalyse durch Überlagerung der resultierenden Banden nicht möglich.

3.2.1.6 Überprüfung von Klonen mit nicht konformem Restriktionsmuster

Nicht konforme Restriktionsmuster können durch Mutationen innerhalb eines Isolates oder durch Mischinfektionen verschiedener Spezies entstehen. Geringfügige Mutationen haben - wenn überhaupt - nur eine geringfügige Abweichung des Restriktionsmusters zur Folge, so dass eine eindeutige Identifizierung möglich ist. Solche Abweichungen wurden bereits bei den jeweiligen Restriktionsmustern der Spezies dargestellt.

3.2.1.6.1 Nicht konforme Restriktionsmuster bei Mischinfektionen

Verhielten sich die getesteten Klone (2.2.9) eines Isolates bei der Restriktionsverdauung nicht konform, so wurden zusätzlich die PCR-Produkte, welche man direkt von der cDNA erhielt, mit der RFLP-Analyse untersucht. Das Restriktionsmuster der nicht konformen Klone konnte in den meisten Fällen einer anderen als der ursprünglich angenommenen Spezies zugeordnet werden. Dies war beispielsweise bei einem Isolat der Spezies PMMV der Fall war. Hier konnten vier der fünf Klone eindeutig dem Restriktionsmuster von TMGMV zugeordnet werden, nur das Restriktionsmuster des fünften Klones entsprach PMMV. Das PCR-Produkt, welches von der cDNA direkt gewonnen und verdaut wurde, konnte ebenso TMGMV zugeordnet werden. Offensichtlich war die Amplifizierung von PMMV nur so gering, dass ein Restriktionsmuster dieses Isolates auf dem Gel nicht sichtbar war.

3.2.1.6.2 Nicht konforme Restriktionsmuster bei Isolaten mit deutlich veränderter Sequenz

Eine Besonderheit bei den hier verwendeten TMV Isolaten stellten die Isolate Ohio V und Ohio III dar, die von Cirulli & Alexander (1969) als resistenzbrechende Isolate beschrieben wurden. Diese sind aufgrund ihres abweichenden Spaltmusters nicht als TMV Isolate zu identifizieren. Die Verdauung des PCR-Fragmentes von Ohio V mit dem Enzym Alu I erzeugt Fragmente von 352, 169, 138, 130 und 12 bp Größe, wohingegen das PCR-Produkt von dem Isolat T1 Fragmentgrößen von 353, 307, 130 und 12 bp Größe ergibt (Abb. 8). Wie anhand dieses Beispiels ersichtlich ist, sind die Restriktionsfragmente dieser beiden Isolate unterschiedlich und diese Unterschiede sind auch auf einem 2,5%igen Gel deutlich sichtbar. Ebenso deutliche Unterschiede sind für die Enzyme Rsa I, MboI, Dde I, Taq I und Tas I zu

erkennen (Tabelle 7). Nur das Restriktionsmuster von Hinf I ist für beide Isolate gleich. Das Muster der Isolate Ohio III und Ohio V war identisch, PCR-Fragmente von Ohio V wurden sequenziert.

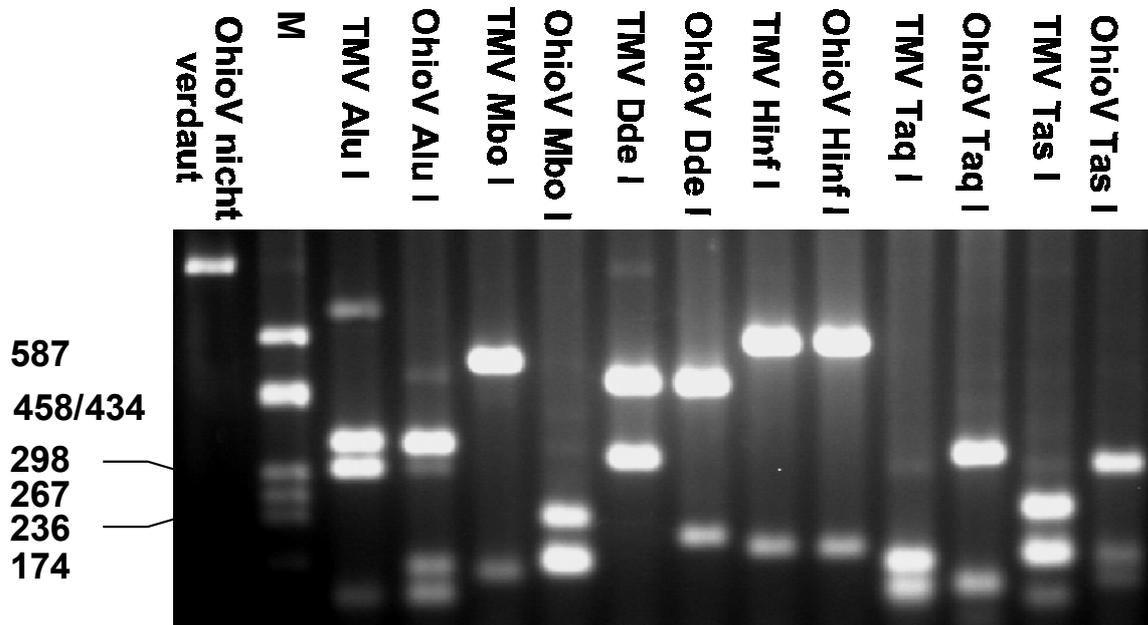


Abb. 8: PCR-Fragmente der Isolate T1 und OHIO V amplifiziert mit dem Oligonukleotidpaar Bluni I - Bluni II, verdaut mit den Restriktionsendonukleasen Alu I, Mbo I, Dde I, Hinf I, Taq I und Tas I. M= Längenstandard pUC9 verdaut mit Hae III (in bp)

Tabelle 7: Restriktionsmuster von den Isolaten T1 und Ohio V

Restriktionsenzyme	Ohio V	T1
AluI	352 169 138, 130 12	356 307 130 12
RsaI	309 288 127 34 27 10, 6	319/319 127 34 6
MboI	232 174, 170 167 58	523 156 59,53 14
DdeI	475 209 67 50	475 330

Restriktionsenzyme	OHIO V	T1
HinfI	581 193 9, 7	584 194 21 6
TaqI	329 144 135 104 62 27	171,171 140 135 125 57 6
TasI	306 174 150 67 56 27 13 4	239 181,174 127 67 13 4

Sequenzuntersuchungen des PCR-Fragmentes des Isolates Ohio V ergaben 95% Homologie auf Aminosäureebene zum Hüllprotein von TMV (T1). Auch serologisch verhalten sich diese Isolate (Ohio V, Ohio III) wie TMV (persönliche Mitteilung, Dr. Lesemann).

```

1      M S Y T I T T P S Q F V F L S S A W A D
OhioV ATGTCTTACACAATTACAACTCCATCTCAGTTCGTGTCTTGTTCATCAGCATGGGCCGAT
TMV   ATGTCTTACAGTATCACTACTCCATCTCAGTTCGTGTCTTGTTCATCAGCGTGGGCCGAC
1      M S Y S I T T P S Q F V F L S S A W A D

21     P T E L I N L C T N A L G N Q F Q T Q Q
OhioV CCAACAGAATTATTAATTTATGTACTAATGCCTTAGGGTAATCAGTTCCAAACGCAACAA
TMV   CCAATAGAGTTATTAATTTATGTACTAATGCCTTAGGGAAATCAGTTTCAAACACAACAA
21     P I E L I N L C T N A L G N Q F Q T Q Q

41     A R T V V Q R Q F S E V W K P S P Q V T
OhioV GCTCGGACTGTCTGTTCAACGACAGTTTCAGTGAGGTGTGGAAACCGTCACCCCAAGTCACT
TMV   GCTCGAACTGTCTGTTCAAAGACAATTTCAGTGAGGTGTGGAAACCTTCACCCACAGTAACT
41     A R T V V Q R Q F S E V W K P S P Q V T

61     V R F P A N D F K V Y R Y N A V L D P L
OhioV GTCAGGTTTCCTGCAAATGACTTTAAGGTGTACAGGTACAATGCAGTACTAGATCCTCTA
TMV   GTTAGGTTTCCTGACAGTACTTTAAGGTGTACAGGTACAATGCGGTATTAGACCCGCTA
61     V R F P D S D F K V Y R Y N A V L D P L

81     V T A L L G A F D T K N R I I E V E N Q
OhioV GTTACCGCTTTGTTAGGAGCTTTCGATACTAAAAATAGAATAATAGAAGTCGAAAATCAG
TMV   GTCACAGCACTGTTAGTGCATTCGACACTAGAAATAGAATAATAGAAGTTGAAAATCAG
81     V T A L L G A F D T R N R I I E V E N Q

101    A N P T T A E T L D A T R R V D D A T V
OhioV GCGAACCCGACAACCGCTGAAACGTTGGATGCTACTCGTAGAGTAGACGACGCAACAGTG
TMV   GCGAACCCCACGACTGCCGAAACGTTAGATGCTACTCGTAGAGTAGACGACGCAACGGTG
101    A N P T T A E T L D A T R R V D D A T V

121    A I R S A I N N L I V E L I R G T G S Y
OhioV GCAATAAGGAGCGCTTATAAATAATTTAATAGTAGAATTGATCAGAGGAACCGGTTCATAC
TMV   GCCATAAGGAGCGCGGATAAATAATTTAATAGTAGAATTGATCAGAGGAACCGGATCTTAT
121    A I R S A I N N L I V E L I R G T G S Y

141    N Q S S F E S S S G L V W S S G P A T
OhioV AATCAGAGCTCTTTCGAGAGCTCTTCTGGTTTGGTTTGGTCTTCTGGTCCGGCAACT
TMV   AATCGGAGCTCTTTCGAGAGCTCTTCTGGTTTGGTTTGGACCTCTGGTCCTGCAACT
141    N R S S F E S S S G L V W T S G P A T

```

Abb. 9 : Sequenzvergleich der Hüllproteine von TMV (T1) und OhioV. Es ist gezeigt: erste Reihe: die Aminosäuresequenz des Isolates Ohio V, zweite Reihe: die Nukleinsäuresequenz des Isolates Ohio V, dritte Reihe: die Nukleinsäuresequenz des Isolates T1 und vierte Reihe: die Aminosäuresequenz des Isolates T1. Die blauen Markierungen innerhalb der Nukleinsäuresequenz zeigen stille Mutationen an, d.h. hier bleibt die Aminosäure trotz mutierter Nukleinsäure unverändert. Die roten Markierungen der Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen zeigen Mutationen, die einen Aminosäureaustausch zur Folge haben.

In Abb. 9 wird deutlich, dass beim Vergleich der Sequenzen auf Nukleinsäureebene eine auffällig große Anzahl von Mutationen in der dritten Base eines Triplets liegt und sich damit auf das Genprodukt meist nicht auswirkt. Von den 47 veränderten Triplets hatten nur 7 Kodons eine Änderung der Aminosäure zur Folge.

Die Ergebnisse zeigen, dass die RT-PCR-RFLP grundsätzlich als Methode zur Differenzierung in die Spezies von Tobamoviren ebenso wie zur Detektion von Pathotypen geeignet ist. Die Auswertung der Restriktionsmuster kann bei Mischinfektionen jedoch problematisch sein.

3.2.2 Nachweis der Spezies mit spezies-spezifischen Oligonukleotiden

3.2.2.1 Entwicklung der spezies-spezifischen Oligonukleotide

Zur Differenzierung der Isolate wurden zusätzlich zur RT-PCR-RFLP (2.2.7) spezies-spezifische Oligonukleotide entwickelt. Dazu wurden neben Sequenzen der EMBL-Datenbank auch die eigenen Sequenzdaten (3.1.5) verwendet. Die spezifischen Oligonukleotide wurden so gewählt, dass diese an eine Region innerhalb des PCR-Fragmentes Bluni I - Bluni II binden. Dadurch ist eine im Anschluss an die generelle RT-PCR mit der Oligonukleotidkombination Bluni I- Bluni II (3.1.4.1) eine „*semi-nested*“ PCR mit Bluni I – spezies-spezifisches Oligonukleotid möglich.

Der spezies-spezifische Nachweis ist somit sowohl von der cDNA direkt oder als „*semi-nested*“ PCR im Anschluss an den genus-spezifischen Nachweis durchführbar. Bei der „*semi-nested*“ PCR wird als Ausgangsprodukt anstatt cDNA ein (verdünntes) PCR-Produkt eingesetzt. Die Lage der spezies-spezifischen Oligonukleotide ist in Abb. 10 dargestellt. Mit Hilfe dieser PCR erhielt man Fragmente mit einer Größe von ca. 650 – 700 bp.

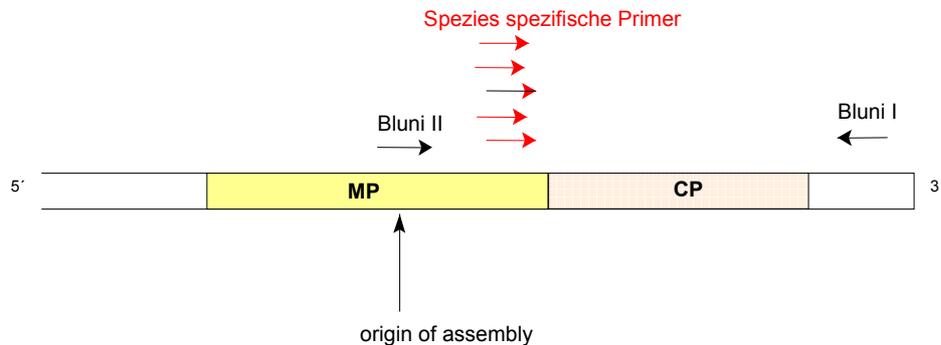


Abb. 10: Lage der generellen Oligonukleotide Bluni I und Bluni II sowie der spezies-spezifischen Oligonukleotide. Die Pfeile geben die Lage und Orientierung der Oligonukleotide wieder. MP = Transportprotein, CP = Hüllprotein.

Die Lage der Oligonukleotide wurde so gewählt, dass eine möglichst geringe Homologie innerhalb dieser Region zwischen den einzelnen Spezies besteht, wie dies in der nachfolgenden Abb. 11 gut zu erkennen ist. Außerdem wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass die Annealingtemperatur ähnlich ist wie bei der PCR mit den generellen Oligonukleotiden Bluni I und Bluni II.

```

ToMV (5577) TT-TAGGTAAGGGGCGTTCAGGCGGAAGGCCTAAACCAAAAAGTTTTGATGAAGTTGAAAAAGAG (5641)
TMV (5586) TGTTCCGGTCAGTGCCGAACAAGAACTATAGAAATGTCAAGGATTTTGGAGGAATGAGTTTTAAAA (5651)
PMMV (5571) TG--TAGGTAAGAG-AAATGATAATAAGGGTTTGAATAAGGA-----AGGGAAGCTGTTTGATAA (5628)
TMGMV (5558) TAATAAGAAAATAAATAACAGTGGTAAGAAGGGTTTTAAAATT----GAGGAAATTGAGGATAAT (5618)
ORSV (5608) TG--GTGATAGTGATGTTGGTACTAGTGTGTAGATGATATTGTGGTTGGTAATGGTGTAGTGA (5670)

```

Abb.11: Sequenzvergleich der Spezies TMV (Kob *et al.*, 1992, X68110), ToMV (Ohno *et al.*, 1984, X02144), PMMV (Alonso *et al.*, 1991, M81413), TMGMV (Aguilar *et al.*, 1996 U30944) und ORSV (Bodaghi *et al.*, 2000, M34077), der zur Entwicklung der spezies-spezifischen Oligonukleotide herangezogen wurde. Die Sequenzen sind in 5'-3' Richtung aufgetragen und die jeweils spezies-spezifischen Oligonukleotide sind unterstrichen.

Wie sich in den nachfolgenden Versuchen herausstellte, war die Amplifikation mit diesen spezies-spezifischen Oligonukleotiden mit dem gleichen PCR-Programm, welches für die generelle PCR mit den Oligonukleotiden Bluni I - Bluni II entwickelt wurde, möglich. Die Spezifität der einzelnen Oligonukleotide wurde getestet. Hierzu wurden jeweils fünf verschiedene Isolate der verschiedenen Spezies eingesetzt. Dieses Testverfahren soll an folgendem Beispiel erläutert werden: Das spezies-spezifische Oligonukleotid TMV_{spec} wurde zunächst mit den TMV Isolaten T1, T3, T4, T5 und T7 getestet. In allen Fällen gelang mit den Oligonukleotiden Bluni I - TMV_{spec} die Amplifikation eines PCR-Produktes mit einer Größe von etwa 670 bp. Diese Oligonukleotidkombination (Bluni I - TMV_{spec}) wurde nun auch mit Isolaten der anderen Spezies ToMV, PMMV, TMGMV, CGMMV und ORSV getestet. Es wurden jeweils fünf unterschiedliche Isolate jeder Spezies eingesetzt. Bei diesen Amplifikationen entstanden unter Standardbedingungen unspezifische Reaktionen. Durch die Verringerung der $MgCl_2$ Konzentration von 2,5 mM auf 2 mM im PCR-Ansatz konnte diese unspezifische Reaktion jedoch unterdrückt werden. Die Amplifikation erfolgte mit dem Programm, welches auch für die generellen Oligonukleotide (Bluni I-II, 3.1.4.1) verwendet wurde. Bei der Testung der Oligonukleotide zeigte sich, dass das Oligonukleotid $TMGMV_{spec}$ nicht bei allen TMGMV Isolaten zu der gewünschten Amplifikation führte. Daraufhin wurde ein neues Oligonukleotid entwickelt ($TMGMV_{neu}$). Dieses Oligonukleotid $TMGMV_{neu}$ konnte alle TMGMV Isolate detektieren und führte bei keiner anderen Spezies zu einer Amplifikation.

3.2.2.2 Nachweis der Spezies mit cDNA oder als „semi-nested“ PCR

Bei der „semi-nested“ PCR wurde 1 μ l eines 1:50 verdünnten PCR-Produktes, welches mit den generellen Oligonukleotiden (Bluni I - Bluni II) erhalten (3.1.4.1) wurde, anstatt cDNA eingesetzt. Bei der nachfolgenden Amplifikation entstanden teilweise mehrere unspezifische Banden, wobei die spezifische Bande jedoch besonders stark ausgeprägt war. Auch durch Verringerung der $MgCl_2$ -Konzentration konnten die unspezifischen Reaktionen nicht unterdrückt werden. Eine Interpretation dieser Ergebnisse ist schwierig und sie können zu falsch positiven Ergebnissen führen. Durch eine Verdünnungsreihe konnte jedoch ein eindeutiges Ergebnis bei der „semi-nested“ PCR erzielt werden. Meistens erwiesen sich Verdünnungen von 1:50 / 1:100 / 1:500 als geeignet zur anschließenden Amplifikation, je nach Stärke des zuvor amplifizierten PCR-Produktes.

3.3 Anwendung der RT-PCR-RFLP und der spezies-spezifischen Oligonukleotide zum Nachweis von Virusgemischen

Da Mischinfektionen in Pflanzen häufiger vorkommen, sollte die Möglichkeit der Detektion der einzelnen Spezies aus solchen Virusgemischen am Beispiel einer Mischung von TMV und PMMV sowie TMV und ToMV untersucht werden. Hierzu wurde die RNA (2.2.4.1), welche aus Virusreinigungen (2.2.3) gewonnen wurde, verwendet. Dabei war interessant, welche Spezies bei einer bestimmten Mischung mit der RT-PCR-RFLP nachzuweisen war. Die RNA wurde für diese Untersuchungen in folgenden Verhältnissen gemischt:

Virus 1	Virus 2
100%	0 %
90 %	10%
50 %	50%
10 %	90%
0%	100%

Von den Mischungen wurde mit der RT-PCR und den generellen Oligonukleotiden Bluni I - Bluni II (2.2.5.1 / 2.2.5.3) amplifiziert. Die so erhaltenen PCR-Fragmente wurden anschließend mit Restriktionsendonukleasen verdaut (2.2.7). Die reinen Isolate PMMV bzw. ToMV und TMV zeigten die für diese Spezies erwarteten Bandenmuster. Bei allen Mischungen konnten die Muster von TMV, ToMV und PMMV gleichzeitig nachgewiesen werden (Abb. 12). Auffällig war, dass die Bandenstärke mit der eingesetzten RNA-Menge korreliert war. Die Bandenstärke für das Restriktionsmuster von PMMV nimmt von links nach rechts zu, ebenso die eingesetzte RNA-Menge. Als Beispiel ist hier das Restriktionsmuster für das Enzym Dde I dargestellt. In der ersten Spur ist das Muster für TMV mit den Fragmentgrößen 475 und 330 bp und zu erkennen. In der fünften Spur ist das Muster für PMMV mit der Fragmentgröße 693 bp zu erkennen. Bei den Mischungen in den Spuren zwei bis vier sind die Fragmente in den Größen 693, 475 und 330, welche sich aus den beiden Mustern von TMV und PMMV zusammensetzen, erkennbar. Analoge Ergebnisse wurden bei der Mischung ToMV und TMV gewonnen. Auch bei dieser Mischung konnten beide Restriktionsmuster nachgewiesen werden. Ebenso hing auch in diesem Versuch die relative Bandenstärke von der eingesetzten RNA-Menge ab. Mit spezies-spezifischen Oligonukleotiden konnten bei allen Mischungen stets jeweils beide Isolate nachgewiesen werden, eine Zuordnung zu relativen Mengen war mit dieser Methode allerdings nicht möglich.

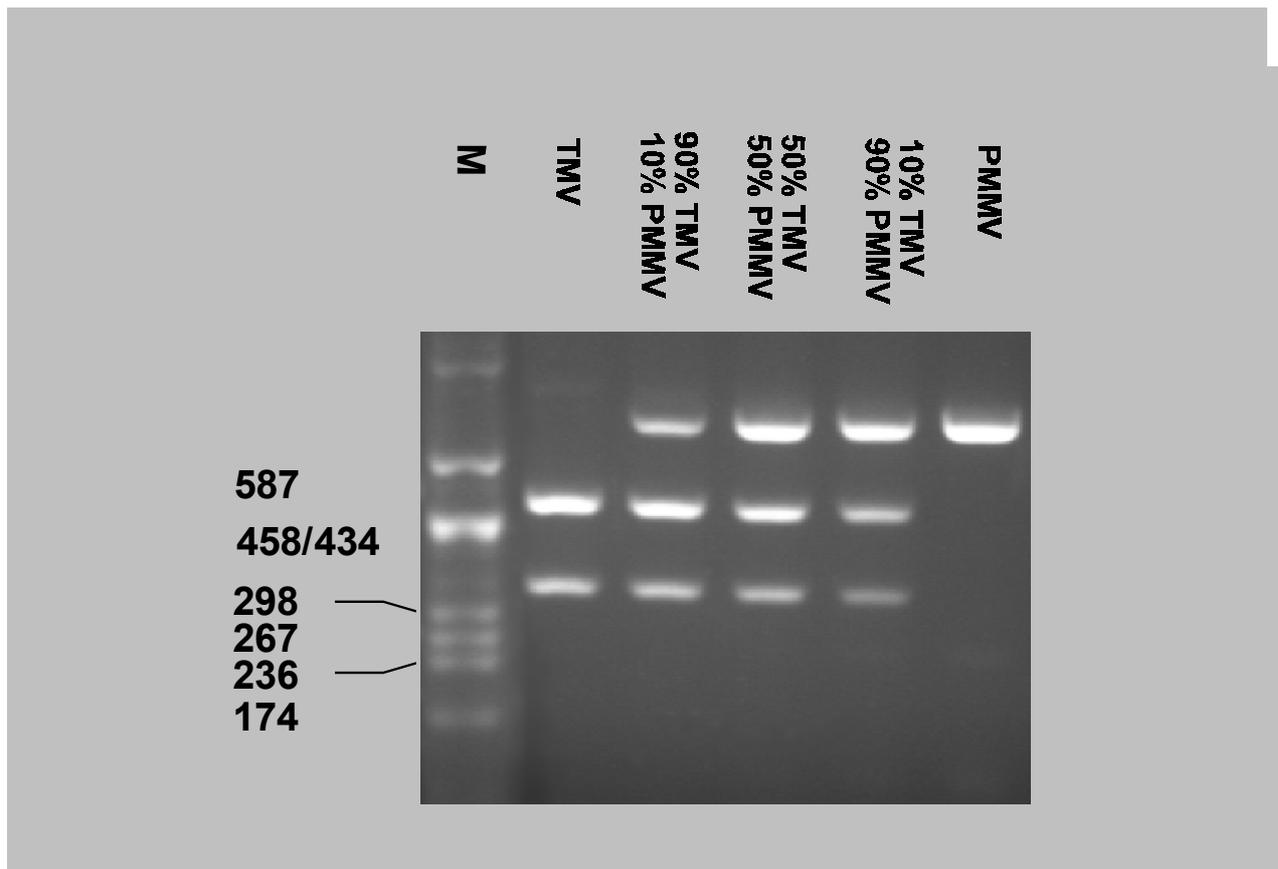


Abb. 12: Restriktionsmuster von RT-PCR Produkten, verdaut mit DdeI aus Virusmischungen, aufgetrennt in einem 2,5%iges Agarosegel in folgender Reihenfolge: TMV, 90 % TMV + 10% PMMV, 50 % TMV + 50% PMMV, 10 % TMV + 90% PMMV, PMMV. M=pUC9 verdaut mit HaeIII.

In einem weiteren Versuch wurden Pflanzen (*Nicotiana benthamiana*) infiziert, indem je ein Blatt mit TMV und eines mit ToMV inokuliert und die Pflanze im Gewächshaus inkubiert wurde. Nach 10 Tagen wurden die systemisch infizierten Blätter geerntet und die Gesamtnukleinsäure mit Hilfe von Silika (2.2.4.2) gewonnen. Anschließend wurde eine RT-PCR-RFLP und eine RT-PCR mit den spezies-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Sowohl bei der RT-PCR-RFLP (2.2.7) als auch bei der RT-PCR mit spezies-spezifischen Oligonukleotiden (3.2.2.1) konnten beide Spezies nachgewiesen werden. Bei der RT-PCR-RFLP waren beide Restriktionsmuster mit jeweils gleichen Bandenstärken zu erkennen. Der Nachweis mit den spezies-spezifischen Oligonukleotiden gelang sowohl als „*semi-nested*“ PCR (3.2.2.2, Verdünnung 1:50) als auch direkt von der cDNA. Die Ergebnisse zeigen, dass Mischinfektionen sowohl mit der RT-PCR-RFLP als auch mit spezies-spezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen werden können.

3.4 Nachweis von Tobamoviren mit vereinfachter Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung stellt einen nicht unerheblichen Zeit- und damit auch Kostenaufwand dar. Zudem birgt eine aufwendige Probenaufarbeitung auch eine große Kontaminationsgefahr. Zur Vereinfachung der Probenaufarbeitung wurden verschiedene Methoden evaluiert.

3.4.1 „*single tube*“ RT-PCR

Zur Vereinfachung und zur Vermeidung von Kontaminationen wurde eine „*single tube*“ PCR getestet (2.2.5.3). Die „*single tube*“ RT-PCR wurde zunächst mit viraler RNA etabliert. Es wurde für die „*single tube*“ RT-PCR zum Einen das cMasterTM RT plus PCR System (Eppendorf) laut Herstellerangaben eingesetzt (2.2.5.3.2) und zum Anderen ein Reaktionsgemisch mit 2 U Taq-Polymerase (Promega) und einem 1 U AMV-RT (Promega) verwendet (2.2.5.3.1). Die Amplifikation von RT-PCR Produkten erfolgte mit den Oligonukleotidkombinationen Bluni I-II und Bluni I- spezies-spezifisches Oligonukleotid. Die entsprechenden Banden konnten auf einem Agarosegel detektiert werden.

Die mit Silika gewonnene RNA (2.2.4.2) infizierter Pflanzen wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Banden der entsprechenden Größe konnten nur mit TMV aus Tabakpflanzen und den beiden Oligonukleotidkombinationen erreicht werden. Bei anderen Pflanzenarten (Petunie, Streptocarpus) kam es gelegentlich zu unspezifischen Reaktionen, so dass nicht immer ein eindeutiges Ergebnis zu erreichen war. Das System weist für eine Praxisanwendung noch nicht die nötige Testsicherheit auf und es muss zunächst eine Unabhängigkeit der Pflanzenart erreicht werden. Daher wurden die weiteren Versuche zur Vereinfachung der Probenaufarbeitung nur mit TMV-infizierten Tabakpflanzen durchgeführt.

3.4.2 Vereinfachung der Probenaufarbeitung durch „*spot*“-RT-PCR

Für die „*spot*“-RT-PCR wurde Pflanzenpresssaft auf eine mit Puffer angefeuchtete Membran aufgetragen (2.2.6.1). Nach Trocknung wurde die Membran mit Puffer und Hexanukleotiden erhitzt und der Überstand anschließend für eine „*single tube*“ PCR (2.2.5.3) eingesetzt. Für die „*single tube*“ PCR wurden die Oligonukleotidkombinationen Bluni I - Bluni II und Bluni I - spezies-spezifisches Oligonukleotid eingesetzt. Das Protokoll konnte erfolgreich für TMV-infizierte Tabakpflanzen eingesetzt werden.

3.4.3 „Immuno-Capture“ RT-PCR

Bei der „Immuno-Capture“ RT-PCR (2.2.6.2) wurde Virus aus dem Pflanzensaft zunächst durch Antiserum an die Wand eines Reaktionsgefäßes gebunden, bevor mit einer „single-tube“ PCR (2.2.5.3) das Virus detektiert wurde.

3.5 Nachweis von Spezies aus der Cucurbitaceae Subgruppe

Die Oligonukleotide Bluni II und Tobamo II sind nicht in der Lage auf der viralen RNA von CGMMV zu binden. Auch das Oligonukleotid Bluni I bindet unzuverlässig, da drei „mismatches“ vorliegen. Das Oligonukleotid Tobamo I bindet besser, vor allem am 3' Ende ist eine höhere Homologie vorhanden. Daher wurde ein spezies-spezifisches CGMMV Oligonukleotid entwickelt (3.1.4.1 / Abb. 7). Eine RT-PCR mit dem Oligonukleotidpaar Tobamo I/CGMMV_{spec} kann CGMMV spezifisch nachweisen. Das entstehende PCR-Produkt hat eine Größe von etwa 830 bp.

Das Restriktionsmuster des resultierenden PCR-Fragmentes stimmt bei vier Restriktionsendonukleasen (AluI, RsaI, DdeI, TasI) mit dem Muster, welches von der Sequenz D12505 (CGMMV, Ugaki *et al.*, 1991) abgeleitet wurde, überein (Tabelle 8). Bei drei weiteren Enzymen sind leichte Abweichungen (MboI, HinfI, TaqI) vorhanden, die in Tabelle 8 grau hinterlegt sind. Die Sequenzierung des Isolates C4 ergab eine 98 %-ige Übereinstimmung zu der Sequenz D12505 und kann damit eindeutig der Spezies CGMMV zugeordnet werden.

Tabelle 8 : Restriktionsmuster der Spezies CGMMV

Restriktions-enzyme	D12505	C4
AluI	444 224 162	444 224 162
RsaI	301 286 243	301 286 243
MboI	349 280 132 69	349 280 201

Restriktions-enzyme	D12505	C4
DdeI	440 160 84,81 64	440 161 84,81 64
HinfI	241 147 135,134 72 46 16,15 12,10 1	241 180 147 135 72 16,15 12,11 1
TaqI	662 81 60 14,13	480 182 81 60 14,13

3.6 Differenzierung der Isolate aus der Crucifereae Subgruppe

Dreizehn Isolate, die serologisch mit verschiedenen Antiseren der Crucifereae Subgruppe reagieren (Dr. Lesemann, persönliche Mitteilung), wurden untersucht. Es wurden verschiedene Oligonukleotide und ihre Kombinationen mit den unterschiedlichen Isolaten wurde für die Amplifikation eingesetzt. Einige Isolate ließen sich nicht mit den schon entwickelten Oligonukleotiden (Tobamo I-II; Bluni I-II) amplifizieren, so dass das Oligonukleotidpaar HRV_{coat hin} - HRV_{coat rück} entwickelt wurde (2.1.2).

3.6.1 RT-PCR von Isolaten der Crucifereae Subgruppe

3.6.1.1 *Turnip vein clearing virus (TVCV)*

Die Isolate R3, R4, R6, R22 und R25 ließen sich mit nur einem Oligonukleotid (Tobamo I, 2.2.1) amplifizieren, wohingegen keine Amplifikation mit dem Oligonukleotidpaar Bluni I – II erfolgte. Das Amplifikat, welches mit dem Oligonukleotidpaar Tobamo I erhalten wurde, konnte kloniert (2.2.9.5 / 2.2.9.6) und sequenziert (2.2.9.9) werden. Das Oligonukleotid Tobamo I bindet zweimal und amplifiziert ein PCR- Fragment mit einer Größe von etwa 870 bp und schließt das vollständige Hüllproteingen ein. Zum Nachweis dieses Isolates ist folglich eine RT-PCR mit dem Oligonukleotid Tobamo I alleine möglich. Dies wurde in Ansätzen mit nur dem Oligonukleotid Tobamo I bestätigt. Die Sequenzen der Isolate R3 und R4 konnten aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen, die zu 98% homolog zu der Sequenz U03387 (Lartey *et al.*, 1995) waren, eindeutig der Spezies *Turnip vein clearing virus* (TVCV) zugeordnet werden. Eine RFLP-Analyse, die in der Tabelle 9 dargestellt ist, ergab für die Isolate R3, R4 und R6 ein übereinstimmendes Restriktionsmuster für vier Restriktionsendonukleasen (AluI, MdoI, DdeI, HinfI). Bei drei Restriktionsendonukleasen (RsaI, TasI, TaqI) wurden jedoch Unterschiede zu dem berechneten Restriktionsmuster der Sequenz U03387 (Lartey *et al.*, 1995) sichtbar. Diese beruhten auf einem Fehlen einer Schnittstelle, was jeweils zu einem größeren Fragment führte.

Tabelle 9: Restriktionsmuster der Spezies TVCV nach RT-PCR mit dem Oligonukleotid Tobamo I

Restriktions-enzyme	U03387 ** Tobamo I	R4*	R3	R6 geschätzt
AluI	300,296 194 56 15 12	300, 296 207 56 15	300, 296 207 56 15	300
RsaI	453 210 135 69 6	294 210 159 75	294 210 159 75	290 210
MboI	457 339 77	457 317 77 22	457 339 77	400 330
DdeI	569 222 82	569 222 82	569 222 82	560 240
HinfI	382 274 114 47 39 28, 29	382 274 114 47 29 16 12	382 274 161 29 15 12	380 270
TaqI	574 86, 80 78 24 17, 15	288, 286 86,80 78 24 17, 15	288, 286 86,80 78 24 17, 15	290
TasI	232 158,157 142 93 36 30 25	193 158,157 128,122 74 32 9	193 158,157 131,124 74 36	190

*Virusisolate der TVCV-Gruppe (Anhang 1) R3/R4/R6

** Referenzisolat U03387 (Lartey *et al.*, 1995)

Die Isolate, die durch Sequenzanalysen eindeutig als TVCV zugeordnet wurden, konnten mit dem Oligonukleotidpaar RMV_{coat hin}–RMV_{coat rück} amplifiziert werden (Tabelle 10).

Tab. 10: Restriktionsmuster der Spezies TVCV nach RT-PCR mit dem Oligonukleotidpaar RMV coat hin - RMV coat rück, abweichende Fragmente sind grau hinterlegt

Restriktionsenzyme	U03387 **	R 22*	R25 geschätzt
AluI	233 195 100 56 15 12	307 237 56 15	300 240
RsaI	388 135 69 13 6	527 75 13	530
MboI	339 260 12	340 264 11	340 260
DdeI	370 159 82	169,160 142 82 62	160 140
HinfI	331 274 6	332 274 9	330 270
TaqI	416 86 78 31	328 90, 87 78 32	330
TasI	232 168 124 62 25	232 194 128 61	230 200 130

*Virusisolate der TVCV-Gruppe aus diesen Untersuchungen (Anhang 1)

** Referenzisolat: U03387 (Lartey *et al.*, 1995)

3.6.1.2 *Oilseed rape mosaic virus (ORMV)*

Bei einigen Isolaten, die serologisch als Isolate der Subgruppe der Crucifereae identifiziert worden waren, konnte mit keiner der bereits vorhandenen Oligonukleotidkombinationen ein PCR-Fragmente amplifiziert werden. So wurde anhand der bereits publizierten Sequenzen von TVCV (U03387, Lartey *et al.*, 1995) und ORMV (U30944, Aguilar *et al.*, 1996) und der mit den generellen Oligonukleotiden Bluni I - Bluni II bzw. Tobamo I - Tobamo I erhaltenen Sequenzen der Isolate R3 und R4 das Oligonukleotid HRV_{cluster} entwickelt. Die cDNA Synthese wurde mit Bluni I bzw. Tobamo I synthetisiert. Mit dieser Kombination konnten RT-PCR Fragmente der Isolate R10, R21 und R23 amplifiziert werden. Die so erhaltenen etwa 1100 bp großen PCR-Produkte wurden mit Hilfe der RFLP weiter analysiert. Das Restriktionsmuster der Isolate entsprach im Wesentlichen den berechneten Mustern für die Spezies *Oilseed rape mosaic virus* (ORMV, U30944, Aguilar *et al.*, 1996), wie dies in der Tab. 11 dargestellt ist. Das PCR-Produkt des Isolates R 23 wurde teilweise sequenziert, die Nukleinsäureanalyse ergab eine Homologie von 97% zu der Sequenz von ORMV.

Tab. 11: Restriktionsmuster der Spezies ORMV nach RT-PCR mit dem Oligonukleotidpaar Bluni I- HRV_{cluster}, abweichende Fragmente sind grau hinterlegt

Restriktions-enzyme	U30944 **	R23 * geschätzt	R10* geschätzt	R21* geschätzt
AluI	305, 305 157 88 70 56, 54 32, 15	300, 300 160	300, 300 160	300, 300 160
RsaI	442 279 135 79, 75 68 4	440 280 210	440 280	440 280
MboI	465 375 242	380	380 240	380 240
DdeI	719 363	720, 360	>600 360	>600, 360
HinfI	421 220 151 117 71 48 54	420	420 150	420 150
TaqI	412 386 165 86 24 9	410 380 170	410 380 170	580 410
TasI	524 158 146, 140 58, 56	520 160	520 160	560 160

*Virusisolate der ORMV-Gruppe aus diesen Untersuchungen (Anhang 1)

** Referenzisolat: U30944 (Aguilar *et al.*, 1996)

Das Isolat R19 zeigte mit der Oligonukleotidkombination Tobamo I - HRV_{cluster} eine schwache Bande. Das Restriktionsmuster konnte jedoch keiner bekannten Spezies zugeordnet werden. Bei der Sequenzanalyse stellte sich heraus, dass das Fragment zu 97 % homolog zu Chloroplasten DNA ist.

3.6.1.3 Entwicklung eines generellen Oligonukleotides zum Nachweis der Spezies innerhalb der Crucifereae Subgruppe

Mit den oben beschriebenen Sequenzinformationen wurde ein Oligonukleotidpaar entwickelt, welches möglichst viele Spezies der Crucifereae Subgruppe detektieren sollte. Das Oligonukleotid RMV_{coat-rück} liegt innerhalb des Hüllproteingens, der Oligonukleotid RMV_{coat-hin} in der tRNA ähnlichen Struktur. In diesen Bereichen waren die meisten Sequenzdaten verfügbar, was für die sichere Entwicklung eines möglichst breit reagierenden Oligonukleotidpaares eine Voraussetzung ist. Mit diesem neuen Oligonukleotidpaar gelang die Amplifikation eines etwa 615 bp großen Fragmentes bei den Spezies *Oilseed rape mosaic virus* (3.6.1.1) und *Turnip vein clearing virus* (3.6.1.2).

Ebenso gelang mit diesem neu entwickelten Oligonukleotidpaar die Amplifikation eines ca. 620 bp großen Fragmentes des Isolates R19 (3.6.1.2). Das Restriktionsmuster und die Sequenz konnten der Spezies *Oilseed rape mosaic virus* zugeordnet werden (Tabelle 12). Die Nukleinsäuresequenzanalyse ergab eine Homologie von 98 % zwischen dem Isolat R19 und einem aus der Literatur bekannten Isolat (U30944, Aguilar *et al.*, 1996) im entsprechenden Bereich. Das Restriktionsmuster von R19 entsprach dem von R9, so dass dieses Isolat ebenso zu der Spezies ORMV zu zählen ist.

Tab. 12: Restriktionsmuster der Spezies ORMV nach RT-PCR mit dem Oligonukleotidpaar RMV_{coat-hin} - RMV_{coat-rück}, abweichende Fragmente sind grau hinterlegt

Restriktions-enzyme	U30944 **	R23* geschätzt	R10* geschätzt	R21* geschätzt
AluI	305, 305 157 88 70 56, 54 32, 15	300, 300 160	300, 300 160	300, 300 160
RsaI	442 279 135 79, 75 68 4	440 280 210	440 280	440 280
MboI	465 375 242	380	380 240	380 240
DdeI	719 363	720, 360	>600 360	>600, 360
HinfI	421 220 151 117 71 48 54	420	420 150	420 150
TaqI	412 386 165 86 24 9	410 380 170	410 380 170	580 410
TasI	524 158 146, 140 58, 56	520 160	520 160	560 160

*Virusisolate der ORMV-Gruppe aus diesen Untersuchungen (Anhang 1)

** Referenzisolat: U30944 (Aguilar *et al.*, 1996)

3.6.1.4 Charakterisierung von weiteren Isolaten aus der Crucifereae Subgruppe

Die Analyse der Isolate R14, R17 und R18 mit der RT-PCR-RFLP und dem Oligonukleotidpaar Bluni I – RMV_{cluster} ergaben identische Restriktionsmuster. Das Restriktionsmuster wurde durch die Sequenzierung des Isolates R14 und nachfolgende Berechnung der Fragmentgrößen bestätigt. Ebenso ergab die RT-PCR-RFLP Analyse für die beiden Isolate R7 und R12 die gleichen Restriktionsmuster. Diese Restriktionsmuster konnten wiederum durch die Sequenzierung bestätigt werden und sind in der nachfolgenden Tabelle 13 aufge-

führt. Das Isolat R14 hat die höchste Homologie im Hüllprotein von 98% und das Isolat R17 von 100% zu *Ribgrass mosaic virus* (U 69271, Wang *et al.*, 1997).

Tabelle 13: Restriktionsmuster weiterer Isolate der Crucifereae Subgruppe nach RT-PCR mit dem Oligonukleotidpaar Bluni I- RMV_{cluster}

Restriktions-enzyme	R12	R7 geschätzt	R14	R17 geschätzt
AluI	486 148, 146 127, 125 43	500 150	390 361 146 124 45 15	400 360 150
RsaI	479 339 100 83 68 6	480 350	483 440 82 70 6	480 420
MboI	700 140 129 90 16	700 150 130	462 365 238 16	460 350 240
DdeI	743 133, 128 71	750 150	881 200	870 200
HinfI	421 227, 223 162 22, 20	420 230 170	426 274 219 162	420 280 210 160
TaqI	407 272 153 114 87 33 9	400 280 160	390 412 153 84 33 9	400 160
TasI	252 198 165 155 147 84 74	250 200 160	252 204 167 158 142 84 74	250 200 160

Die Isolate R12, R7, R14 und R17 lassen sich ebenso mit dem Oligonukleotidpaar RMV_{coat-hin} und RMV_{coat-rück} amplifizieren.

3.6.1.5 Überprüfung der generellen Oligonukleotide für die Crucifereae Subgruppe

Isolate der Spezies TVCV, ORMV und Isolate aus 3.6.2.1 konnten mit der Oligonukleotidkombination $RMV_{coat-hin}$ und $RMV_{coat-rück}$ amplifiziert (2.2.5) und mit nachfolgender RFLP (2.2.7) differenziert werden. Die *Streptocarpus flowerbreak virus* (SFBV) Isolate R15 und R16, welche möglicherweise in die Crucifereae Subgruppe eingeordnet werden können (persönliche Mitteilung, Dr. Lesemann), konnten mit dem Oligonukleotidpaar $RMV_{coat-hin}$ und $RMV_{coat-rück}$ nicht amplifiziert werden. Dies deutete daraufhin, dass dieses Isolat möglicherweise eine nur geringe Sequenzübereinstimmung mit anderen Isolaten der Crucifereae Subgruppe aufweist. Die Sequenz wurde bestimmt, was im folgenden Kapitel beschrieben wird.

3.7 Klonierung und Sequenzanalyse des *Streptocarpus flowerbreak virus* (SFBV)

Die Isolate R15 und R16 zeigten bei der Amplifikation mit dem Oligonukleotidpaar Bluni I - Bluni II eine Doppelbande. Diese Doppelbande deutete zunächst auf ein Isolat von ORSV hin. Die Doppelbande bei ORSV hat die Größen 790 bp und 890 bp, wohingegen bei SFBV die Größen von etwa 650 bp und 800 bp und somit eine kleinere Bande nachzuweisen ist. Die Amplifikation mit dem spezies-spezifischen ORSV-Oligonukleotid war nicht erfolgreich und somit handelte es sich hier offenbar um eine andere Spezies. Dies ergab auch die Sequenzierung des Amplikons. Die Aminosäuresequenz des Hüllproteins zeigte die höchste Homologie (58%) zu einer Sequenz von TVCV (Lartey *et al.*, 1995; Shimamoto *et al.*, 1998). Die Sequenzanalyse zeigte deutlich, daß es sich bei SFBV um eine neue Spezies innerhalb des Genus Tobamovirus handelt. Da es sich hier um eine Spezies handelte, von welcher bislang keine Sequenzdaten vorlagen, sollten weitere Bereiche des Genoms sequenziert werden. Ausgehend von der durch die generellen Oligonukleotide Bluni I – Bluni II erhaltenen Sequenz wurden weitere Oligonukleotide entwickelt.

3.7.1 Genom von SFBV und Vorhersage der offenen Leserahmen

Anhand der in Abb. 13 dargestellten Oligonukleotidkombinationen wurden überlappende Bereiche des Genoms im Bereich der offenen Leserahmen mit Hilfe der RT-PCR (2.2.5), kloniert und sequenziert (2.2.9). Die Länge der analysierten Sequenz entspricht der anderer Tobamoviren und kodiert wie diese für vier ORFs.

Die Lage der Oligonukleotide ist in Abb.13 schematisch dargestellt.

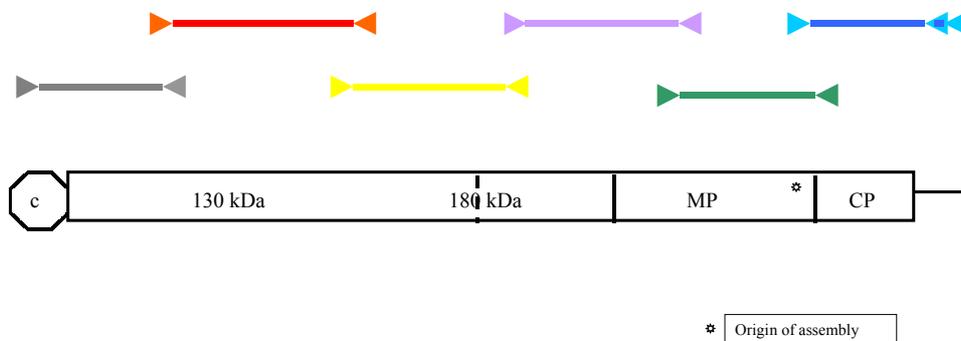


Abb.13: Schematische Darstellung der Oligonukleotidlage und den daraus resultierenden PCR Fragmenten der Klonierung von SFBV. Die Beschreibung der Symbole ist in Tab. 14 zusammengestellt

Tab. 14: Verwendete Oligonukleotide und resultierende Fragmentgrößen

3`Oligo-nukleotid	Symbol	5`Oligo-nukleotid	Symbol	Fragmentgröße in bp
Bluni I	▶	Bluni II	◀	686 / 841
Strep 1	▶	Strep 2	◀	900
Strep 2rc	▶	Strep 3	◀	1215
Strep 3rc	▶	Strep 4	◀	1262
Strep 4rc	▶	Strep 5	◀	1187
Strep 5rc	▶	Strep 5`End	◀	914

3.7.2 Genomorganisation

Die Sequenzen der einzelnen Klone konnten nach 2.2.10 zusammengefügt werden. Es konnte eine Sequenz mit einer Länge von etwa 6200 Nukleotiden sequenziert werden. Auf dieser Sequenz befinden sich vier offene Leserahmen. In Abb. 14 ist die Genomorganisation des SFBV schematisch dargestellt. Das als DNA-Sequenz dargestellte Genom von SFBV und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen der vier offenen Leserahmen sind in Anhang 2 gezeigt.

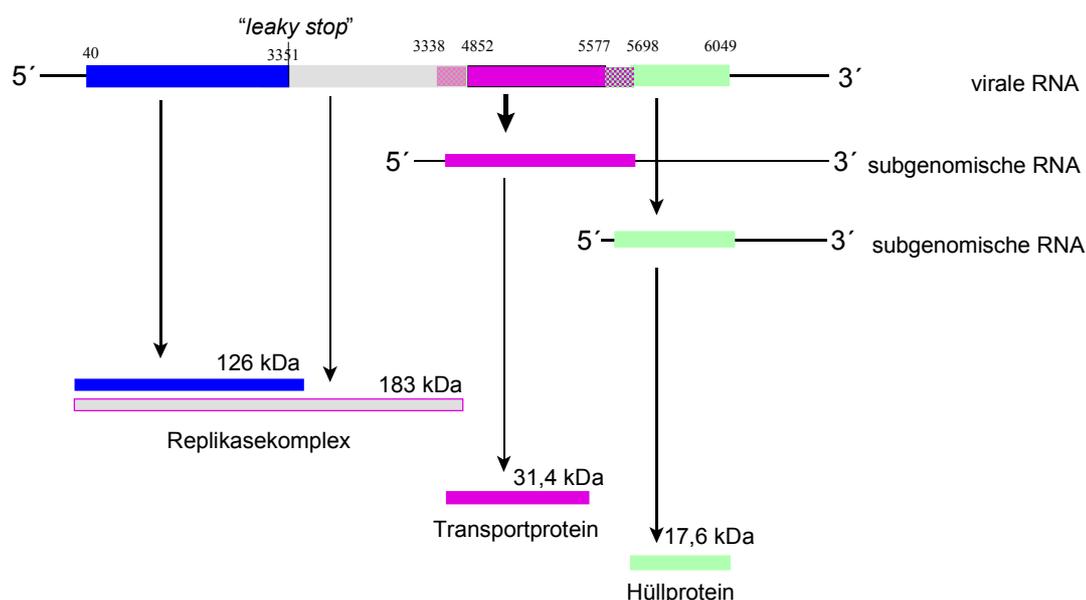


Abb. 14: Schematische Darstellung der vermuteten Organisation von genomischer und subgenomischer RNA und den daraus resultierenden Proteinen von SFBV. Die bunten Rechtecke in der obersten Zeile markieren die vier ORFs. Die darüber befindlichen Zahlen geben die Position im Genom an. Die beiden Translationsprodukte des ORFs 1 und 2 fungieren vermutlich als Replikasekomplex. Im ORF 1 (blau) sind eine Methyltransferase und eine Helikasedomäne enthalten, diesen wird durch Überlesen des ersten Stoppkodons („leaky stop“) noch die Polymerasedomäne ORF 2 (grau) zugefügt. In der zweiten und dritten Zeile sind die subgenomischen RNAs dargestellt, die für das Transportprotein ORF 3 (lila) und das Hüllprotein ORF 4 (grün) kodieren. In der letzten Zeile sind die viruskodierten Proteine dargestellt.

Eine Überlappung von Hüll- und Transportproteinen von 121 nt konnte festgestellt werden. Auch zwischen dem Transportproteinen und dem Polymerasegen kommt es zu einer Überlappung von 19 nt. Der vermutete ori befindet sich im Transportproteinen in der Position von 5220-5420 nt. In diesem Bereich besteht eine Homologie von 58% zu dem bekannten ori von TMV. Im Bereich des dritten „loops“ ist eine besonders hohe Homologie vorhanden.

3.7.2.1 ORF 1

ORF 1 ist 3312 nt lang und kodiert für ein Protein mit einer Größe von 124,5 kDa. Die Größe entspricht den Größen der ORFs anderer Tobamoviren. Genau wie diese werden im resultierenden Protein von ORF 1 eine Methyltransferase- (Position 1-376 aa) und eine Helikasedomäne (Position 800-1100 aa) gefunden. ORF 1 endet mit einem Stoppkodon (in Position 3352), das wahrscheinlich überlesen werden kann und zusammen mit ORF 2 ein Durchleseprotein bildet.

3.7.2.2 ORF 2

Für das Durchleseprotein (Position 3351) wurde eine Größe von etwa 180 kDa berechnet. Diese Größe entspricht den Größen der Proteine des ORF 2 anderer Tobamoviren. Eine Polymerasedomäne, welche durch Überlesen des Stoppkodons noch angehängt wird, befindet sich in dem Bereich von 3351-4852.

Die größte Homologie des Durchleseproteins von 67,3 % besteht zu ORSV. In einem Bereich von 60,5 - 65% liegen die Homologien der anderen Isolate der Cruciferae und Solanaceae Subgruppe. Nur die Spezies CGMMV der Curcubitaceae Subgruppe weist eine deutlich geringere Homologie von 43,5 % auf. In der Tab. 15 sind die Homologiewerte mit verschiedenen Isolaten der Tobamoviren zusammengetragen.

Tab. 15: Identische Aminosäuren (in %) der Polymerase verschiedener Tobamoviren

	TMV ¹	ToMV ²	PMMV ³	CGMMV ⁴	ORSV ⁵	TMGMV ⁶	ORMV ⁷	TVCV ⁸	Crucifer ⁹	SFBV
TMV	100	91,9	75,0	44,4	62,3	66,4	63,7	63,5	63,0	60,5
ToMV		100	76,6	44,9	63,1	67,1	63,7	63,0	62,9	60,8
PMMV			100	44,3	63,2	65,0	62,3	61,4	61,6	60,6
CGMMV				100	44,0	43,9	45,3	45,7	45,2	43,5
ORSV					100	64,1	69,7	70,0	69,3	67,3
TMGMV						100	63,4	63,3	63,5	61,3
ORMV							100	89,2	92,9	65,1
TVCV								100	90,0	64,8
Crucifer									100	64,8
SFBV										100

¹Kob *et al.*, 1992 (X68110), ²Ohno *et al.*, 1984 (X02144), ³Alonso *et al.*, 1991 (M81413), ⁴Ugaki *et al.*, 1991 (D12505), ⁵Ryu und Park, 1995 (X82130), ⁶Bodaghi *et al.*, 2000 (M34077), ⁷Aguilar *et al.*, 1996 (U30944), ⁸Lartey *et al.*, 1994 / Lartey *et al.*, 1995 (U03387), ⁹AB017503 (Lee *et al.*, 1998, unveröffentlicht).

3.7.2.3 ORF 3

Der ORF 3 kodiert für das Transportprotein und ist mit einer berechneten Größe von 31,4 kDa größer als die meisten Transportproteine anderer Tobamoviren. Nur ORSV hat mit einer Größe von 33,5 kDa ein noch größeres Transportprotein. Interessanterweise sind die Transportproteine von ORSV und SFBV jedoch nicht am ähnlichsten. Die größte Homologie von 49,3% besteht hier zu AB017503. Auch die anderen Homologien zu weiteren Isolaten der Cruciferae Subgruppe liegen in diesem Bereich von etwa 48% identischen Aminosäuren. Die Homologien zu den Isolaten der Solanaceae Subgruppe liegen dagegen darunter (zwischen 31,2 und 36,9 %), CGMMV weist eine noch geringere Homologie von 24,9 % identischen Aminosäuren auf. Die Homologiewerte sind in der Tab. 16 zusammengestellt. Sequenzanalysen ergaben innerhalb dieses ORFs eine besonders hohe Homologie zu Bereichen des „*origin of assembly*“ anderer Tobamoviren, so dass vermutlich auch bei SFBV diese funktionelle Region in diesem Bereich liegt.

Tab. 16: Identische Aminosäuren (in %) der Transportproteine verschiedener Tobamoviren

	TMV ¹	ToMV ²	PMMV ³	CGMMV ⁴	ORSV ⁵	TMGMV ⁶	ORMV ⁷	TVCV ⁸	Crucifer ⁹	SFBV
TMV	100	76,5	62,3	26,3	52,6	53,4	36,0	35,3	36,4	35,2
ToMV		100	61,7	27,7	50,5	56,4	35,8	35,4	37,2	34,5
PMMV			100	28,4	58,1	60,2	35,8	36,2	36,2	36,9
CGMMV				100	22,9	29,2	28,8	27,1	28,2	24,9
ORSV					100	50,2	31,2	31,2	29,3	31,2
TMGMV						100	34,3	35,1	34,3	36,9
ORMV							100	82,8	87,7	47,9
TVCV								100	83,1	48,3
Crucifer									100	49,3
SFBV										100

¹Kob *et al.*, 1992 (X68110), ²Ohno *et al.*, 1984 (X02144), ³Alonso *et al.*, 1991 (M81413), ⁴Ugaki *et al.*, 1991 (D12505), ⁵Ryu und Park, 1995 (X82130), ⁶Bodaghi *et al.*, 2000 (M34077), ⁷Aguilar *et al.*, 1996 (U30944), ⁸Lartey *et al.*, 1994 / Lartey *et al.*, 1995 (U03387), ⁹AB017503 (Lee *et al.*, 1998, unveröffentlicht).

3.7.2.4 ORF 4

Der ORF 4 kodiert für das Hüllprotein. Die anhand der Sequenzanalyse vorausgesagte Größe des Hüllproteins beträgt 17,6 kDa, diese entspricht der Größe der Hüllproteine anderer Tobamoviren. Durch Expressionsklonierung und anschließender Westernblot Analyse mit hüllproteinspezifischen Antisera von SFBV wurde die Größe des aus diesem ORF resultierenden Proteins bestätigt (3.7.3). Die höchsten Homologien von über 50 % werden von Isolaten der Cruciferae Subgruppe erreicht (TVCV 58%; Crucifer 58,6%). Die Isolate der

Solanaceae Subgruppe dagegen weisen eine Homologie zwischen 44 % und 47,8 % auf, CGMMV eine Homologie von 37,9 % auf (Tabelle 17).

Tab. 17 Identische Aminosäuren (in %) der Hüllproteine verschiedener Tobamoviren

	TMV ¹	ToMV ²	PMMV ³	CGMMV ⁴	ORSV ⁵	TMGMV ¹	ORMV ⁷	TVCV ⁸	Crucifer ⁹	SFBV
TMV	100	83,5	70,9	36,0	68,3	70,4	44,9	48,1	45,9	47,8
ToMV		100	72,8	34,2	70,2	69,8	48,1	48,7	49,1	45,9
PMMV			100	34,8	66,7	68,6	48,1	46,8	47,2	44,0
CGMMV				100	34,4	34,2	36,6	36,0	35,4	37,9
ORSV					100	68,3	42,9	44,1	42,2	45,3
TMGMV						100	45,9	46,5	44,0	45,3
ORMV							100	87,8	91,1	57,3
TVCV								100	89,8	58,0
Crucifer									100	58,6
SFBV										100

¹Kob *et al.*, 1992 (X68110), ²Ohno *et al.*, 1984 (X02144), ³Alonso *et al.*, 1991 (M81413), ⁴Ugaki *et al.*, 1991 (D12505), ⁵Ryu und Park, 1995 (X82130), ⁶Bodaghi *et al.*, 2000 (M34077), ⁷Aguilar *et al.*, 1996 (U30944), ⁹Lartey *et al.*, 1994 / Lartey *et al.*, 1995 (U03387), ⁹AB017503 (Lee *et al.*, 1998, unveröffentlicht)

3.7.3 Klonierung und Expression des Hüllproteingens von *Streptocarpus flowerbreak virus*

Um die Größe des Leserahmens und die Zuordnung dieses Leserahmens zur Funktion des Hüllproteins und die serologische Verwandtschaft mit anderen Tobamoviren zu bestätigen, wurde dieses in einen Expressionsvektor (PQE 30) kloniert und exprimiert.

3.7.3.1 Klonierung des Hüllproteingens

Von der bekannten Sequenz wurden Oligonukleotide entwickelt, mit denen der ORF des Hüllproteingens amplifiziert wurde. Zusätzlich enthielten die Oligonukleotide Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen Hind III und Sac I. Ausgehend von Gesamtnukleinsäure aus Blattmaterial (2.2.4.2) wurde eine RT-PCR mit den Oligonukleotiden Strep Hind III und Strep Sac I (2.1.2) durchgeführt (2.2.5.1 / 2.2.5.2). Dieses PCR-Produkt wurde gereinigt (2.2.9.4) und zunächst in einen T-Vektor kloniert (2.2.9.5 / 2.2.9.6). Von vier positiv selektierten Klonen wurde das Plasmid gereinigt (2.2.9.8) und mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Sac I verdaut. Das so erhaltenen ca. 500 bp große Fragment wurde aus einem präparativen Agarosegel isoliert (2.2.8.2) und in einen Hind III /SacI geöffneten pQE 30 (Qiagen) ligiert. Nach einer Transformation in den Bakterienstamm *E.coli* M15 (2.2.9.6) wurden die einzelnen Kolonien mittels Kolonie-PCR (2.2.9.7) auf Einbau des Fragmentes getestet. Vier positiv getestete Kolonien und eine Kolonie ohne Insert wurden für

die Expression ausgewählt und das Hüllprotein als Fusionsprotein exprimiert (2.2.12). Die Proteine wurden auf einem 15%igen Polyacrylamidgel (2.2.12.1) aufgetrennt und mit Comassie-Brillantblau (2.2.12.2) gefärbt. Zur Größenabschätzung wurde parallel ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Proben mit einkloniertem Hüllproteingen zeigten eine zusätzliche Proteinbande von etwa 18 kDa, was der aus der Sequenzanalyse vorhergesagten Größe des Hüllproteins von 17,6 kDa entsprach. Diese Proteinbande war bei einer Probe besonders deutlich ausgeprägt, so dass der Klon für die weiteren Untersuchungen ausgewählt wurde. Parallel aufgetrennte Proteine des Vektors pQE 30 (Qiagen) ohne Insert zeigten diese Bande nicht (nicht gezeigt).

3.7.3.2 Serologische Überprüfung desexprimierten Hüllproteinklones

Die Fusionsproteine (3.7.3.1) und Pflanzenextrakte von gesunden und mit SFBV infizierten Pflanzen wurden in einer SDS-PAGE (2.2.12.1) aufgetrennt und mittels Elektroblothing (2.2.13.1) anschließend auf eine Membran übertragen. Mit einem SFBV spezifischen polyklonalen Antiserum (Rohserum, 1:1000, Verhoeven *et al.*, 1995) und alkalischer Phosphatase konjugierten anti rabbit ImmunglobulinG ermöglichte die spezifische Detektion sowohl des viralen Hüllproteins aus SFBV infizierten Pflanzen als auch des Fusionsproteins (Abb. 15). Das Molekulargewicht ist, wie erwartet, durch die zusätzlichen Histidinreste etwas größer.

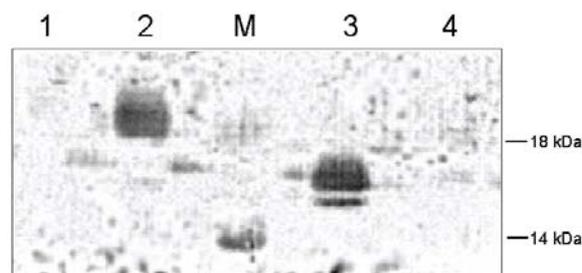


Abb.15: Elektrophoretische Trennung und Färbung von SFBV Hüllprotein nach Elektroblothing mit Antiserum, das gegen SFBV Hüllprotein gerichtet ist. 1 = Expression eines nicht rekombinanten Plasmides (negativ Kontrolle); 2 = Expression des rekombinanten Plasmides (Fusionsprotein); 3= Pflanzenpresssaft einer mit SFBV infizierten Pflanzen; 4= Pflanzenpresssaft einer gesunden Pflanze. M= Marker. Auf der rechten Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine angegeben.

Sowohl der Pflanzenpresssaft als auch das Fusionsprotein reagieren eindeutig mit dem SFBV Antiserum, wohingegen keine Reaktionen bei der gesunden Pflanze als auch bei dem Klon ohne eingebautes Hüllprotein zu erkennen sind.

3.8 Einordnung von Tobamoviren auf der Grundlage von Sequenzdaten

Die Aminosäurezusammensetzung des Hüllproteingens ist ein charakteristisches Merkmal der einzelnen Virusspezies. Das Hüllprotein ist auch für die serologische Differenzierung verantwortlich und somit von besonderem Interesse. Daher wurde eine Einordnung basierend auf der Hüllproteinsequenz erarbeitet.

3.8.1 Zuordnung der Isolate in der Crucifereae Subgruppe zu Spezies

Anhand von Sequenzen wurde ein Ähnlichkeitsdiagramm erstellt (Abb. 16). In diesem Ähnlichkeitsdiagramm können drei Bereiche für die Crucifereae Isolate unterschieden werden. Ein Bereich wird jeweils von der Spezies *Turnip vein clearing virus* (TVCV) und einer von der Spezies *Oilseed rape mosaic virus* (ORMV) gebildet. Der dritte Bereich ist klar abgegrenzt, allerdings differiert die Nomenklatur. Hier finden sich die Sequenzen U69271 (Wang *et al.*, 1997) und AB017503 (Lee *et al.*, 1998, unveröffentlicht), die als „Crucifer-Isolat“ bzw. als *Ribgras mosaic virus* (RMV) bezeichnet werden. Die Isolate R12 und R14 lassen sich hier einordnen. Im Ähnlichkeitsdiagramm wird dieser Bereich mit RMV bezeichnet. Da das *Streptocarpus flowerbreak virus* (SFBV) die größten Homologien zu Isolaten dieser Subgruppe aufweist wurde auch diese Spezies hier mit aufgeführt. Jedoch sieht man deutlich, dass SFBV keine enge Verwandtschaft zu den anderen hier aufgeführten Spezies aufweist.

Ein Isolat, welches das Originalisolat Holmes Ribgras Virus (R22) sein sollte, wurde zwar ebenfalls sequenziert, ist aber aufgrund der Sequenzdaten der Spezies TVCV zu zuordnen (Abb. 16).

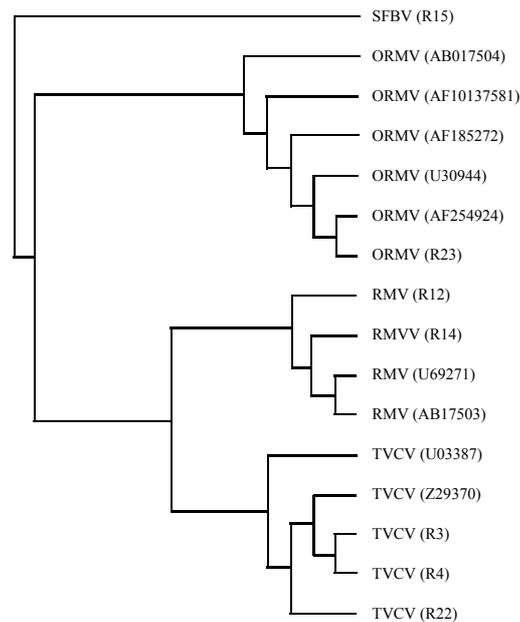


Abb.16: Ähnlichkeitsdiagramm von Isolaten der Crucifereae Subgruppe und SFBV anhand der eigenen (Anhang 1) und Sequenzdaten aus der Datenbank EMBL (Aminosäureebene). Dieses Diagramm wurde mit dem Programm Custal W erstellt.

3.8.2 Zuordnung aller untersuchten Isolate zu Spezies

In einem weiteren Ähnlichkeitsdiagramm (Abb. 17) das auf der Grundlage der Homologien der Hüllproteine erstellt wurde, sind alle von mir sequenzierten Isolate (rot, Beschreibung der Isolate, Anhang 1) und ihre Referenzen aus der EMBL Datenbank zusammengefasst (schwarz). Die Zuordnung der untersuchten Isolate zu den jeweiligen Spezies ist in dieser Grafik deutlich sichtbar. Ebenso sind die Speziesgrenzen klar zu erkennen. Auch die Einteilung der Spezies in Subgruppen kann dieser Grafik entnommen werden. Die Spezies TMV, ToMV, PMMV, ORSV und TMGMV bilden eine Subgruppe (Solanaceae) ebenso wie die Spezies TVCV, ORMV und RMV (Crucifereae). Sowohl CGMMV (Cucurbitaceae Subgruppe) als auch SFBV können in diese beiden Subgruppen nicht eingeordnet werden.

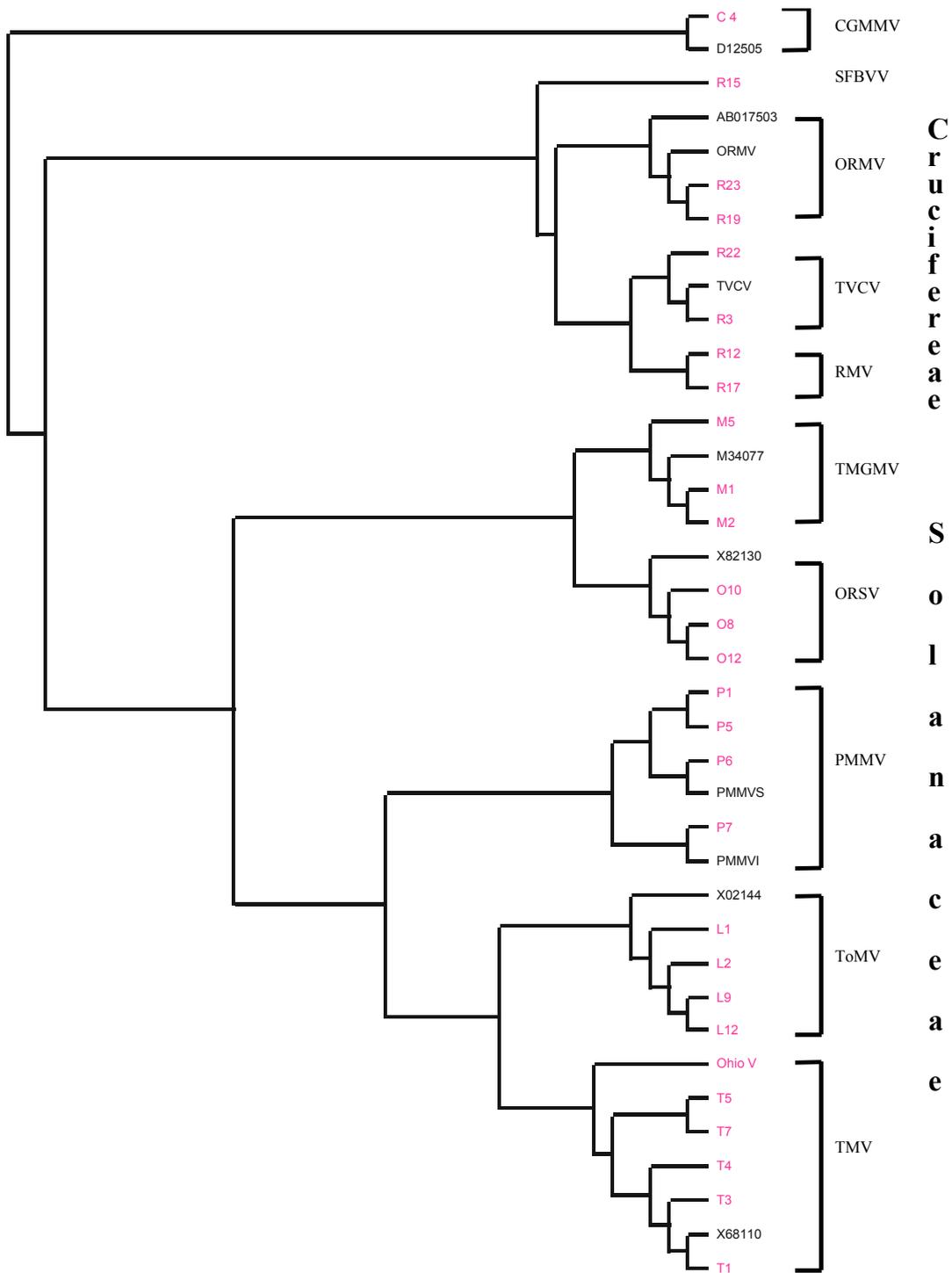


Abb.17: Ähnlichkeitsdiagramm von Tobamovirus Isolaten anhand der eigenen (rote Schrift, Anhang 1) und Sequenzdaten aus der Datenbank EMBL (Aminosäureebene).

3.8.3 Frequenz und Verteilung von Homologien der Hüllproteinsequenzen

In der nachfolgenden Grafik (Abb.18) ist die Anzahl der Homologien zwischen den Hüllproteinen der verschiedenen Tobamovirus Isolate dargestellt. Es wurden insgesamt die Hüllproteinsequenzen von 7 TMV, 5 ToMV, 6 PMMV, 4 TMGMV, 4 ORSV, 2 CGMMV, 1 CFMMV, 3 TVCV, 1 SFBV, 2 ORMV und 3 RMV verwendet. Die Tabelle zur Erstellung der Grafik ist im Anhang 3.

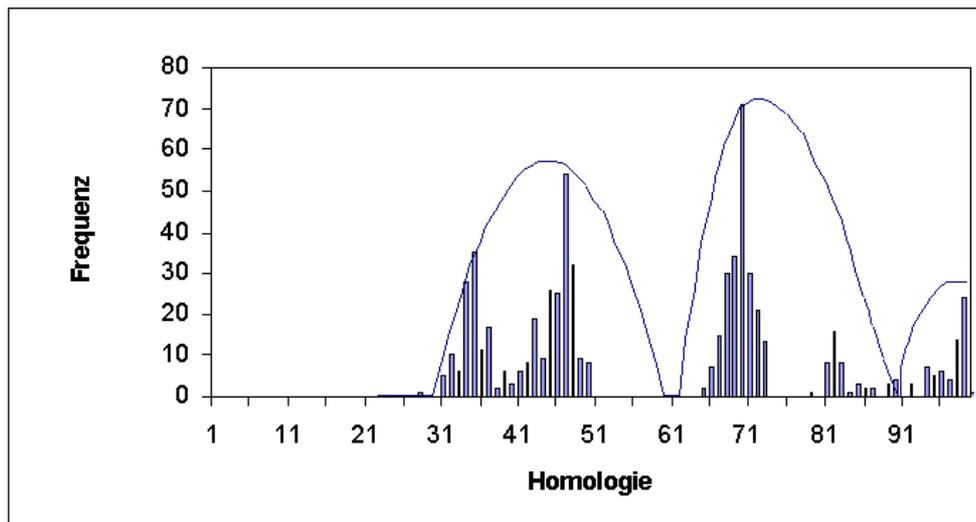


Abb. 18: In der Grafik ist die Anzahl (horizontal) der Homologien (vertikal) zwischen den Hüllproteinen der verschiedenen Tobamovirus Isolate dargestellt. Die Kurve verdeutlicht die drei Bereiche. Die Tabelle zur Erstellung der Grafik befindet sich in Anhang 3.

An dieser Grafik ist eine trimodale Verteilung sichtbar, die durch die darüberliegende Kurve verdeutlicht wird. In dem Bereich von etwa 92-100% ist die Variabilität innerhalb einer Spezies dargestellt, z.B. haben alle TMV Isolate 94% bis 100% Homologie zueinander. In dem Bereich von etwa 65-90% befinden sich die Unterschiede der Spezies zueinander, die innerhalb einer Subgruppe liegen. So hat das Isolat T1 (TMV) eine Homologie von 83% zu L1 (ToMV); beide Spezies gehören der Solanaceae Subgruppe an. Der Bereich von 30-50 % stellt die Homologie dar, die sich zwischen den Isolaten der Spezies der verschiedenen Subgruppen ergibt, z.B. das Isolat T1 (TMV) hat eine Homologie von 37% zu C4 (CGMMV). TMV ist eine Spezies der Subgruppe der Solanaceae, wohingegen CGMMV eine Spezies der Cucurbitaceae ist. Diese trimodale Grafik gibt die Beziehung der Isolate innerhalb der Spezies, zwischen Spezies der gleichen Subgruppe und Spezies unterschiedlicher Subgruppen wieder. Diese so erhaltene Gruppierung stimmt mit der Einteilung von Lartey *et al.* (1986) überein.

4 Diskussion

Biologische und serologische Testverfahren zur Identifizierung von Spezies innerhalb des Genus Tobamovirus sind zeitraubend und arbeitsaufwendig (Lesemann und Winter, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Diagnosesystem entwickelt, das sowohl den generellen Nachweis von Tobamoviren als auch die Differenzierung in die verschiedenen Spezies erlaubt. Dafür wurden zunächst generelle Oligonukleotide entwickelt, die in der Lage sind, die fünf wirtschaftlich relevanten Spezies der Solanaceae Subgruppe der Tobamoviren zu amplifizieren. Ausgehend von diesem generellen Nachweis konnte darüber hinaus in die Spezies und sogar in die Pathotypen differenziert werden. Ein spezifischer Nachweis für die Spezies CGMMV, welche sich in der Cucurbitaceae Subgruppe befindet, wurde erfolgreich entwickelt.

Desweiteren war bisher eine eindeutige Zuordnung von Spezies innerhalb der Crucifereae Subgruppe unklar. Um eine klare Abgrenzung der Spezies zwischen und innerhalb der Subgruppen zu ermöglichen, wurden für diese Spezies erfolgreich generelle Oligonukleotide entwickelt, und auch für diese Subgruppe gelang die Differenzierung in die Spezies.

Bei dem *Streptocarpus flowerbreak virus* (SFBV) handelt es sich um ein relativ neues Virus der Tobamoviren. Das SFBV wurde aufgrund seiner biologischen Eigenschaften von Verhoeven *et al.* (1995) beschrieben. Sequenzdaten lagen bislang jedoch nicht vor. In der vorliegenden Arbeit konnte das nahezu vollständige Genom dieses Virus sequenziert werden.

Für ein zuverlässiges Diagnosesystem zur Differenzierung verschiedener Tobamoviruspezies ist gut charakterisiertes Referenzmaterial unabdingbar. Um definierte Isolate bzw. Referenzmaterial zu erhalten, wurden die Isolate über fünf Passagen Lokalläsionentransfer vereinzelt und anschließend auf einem systemischen Wirt vermehrt. Im Laufe des Projektes stellte sich jedoch heraus, dass auch die Vereinzlung über Lokalläsionentransfer keine Garantie für reine Isolate darstellt. Bei einigen über Lokalläsionen vereinzelt Isolaten waren noch Mischungen aus zwei verschiedenen Spezies nachweisbar. Auch bei schon serologisch charakterisiertem Material aus anderen Quellen konnten teilweise Mischungen aus zwei Spezies nachgewiesen werden (3.3). Wenn solche Gemische zur Herstellung von Antiseren genutzt werden, sind Kreuzreaktionen die Folge. Dies ist sicher ein Grund für die unklare Einordnung vieler Tobamovirus Isolate.

Da jede Vermehrung im Gewächshaus die Gefahr einer Kontamination birgt, wurde Referenzmaterial in Form von rekombinanten Plasmiden bevorzugt. Hierzu wurde das jeweilige PCR-Produkt in rekombinanten Plasmiden vermehrt. Diese Klone haben den Vorteil, dass genetisch einheitliches und stabiles Material vorliegt. Für Positivkontrollen kann von dem isolierten Plasmid mit den entsprechenden Oligonukleotiden ein definiertes PCR-Produkt amplifiziert und das RFLP-Muster mit demjenigen der Probe verglichen werden. Außerdem kann von diesen Plasmiden ein RNA-Transkript hergestellt werden und so als Referenz für den RT-Schritt dienen. Eine weitere Möglichkeit der Kontrolle des RT-Schrittes, der zudem das Extraktionsverfahren kontrolliert, kann durch Koamplifikation von pflanzlicher mRNA erfolgen (Menzel *et al.*, 2002). So eine Kontrolle erlaubt wiederum nicht die Kontrolle der virusspezifischen Amplifikation. Deswegen sollten idealerweise beide Kontrollen parallel angewendet werden. Das beste Referenzmaterial wären rekombinante infektiöse Klone, deren Herstellung jedoch sehr aufwendig ist. Der Gebrauch dieser Klone als Referenzmaterial zur Infektion auf Pflanzen kann nach der gentechnischen Sicherheitsverordnung problematisch sein, da nur entsprechend ausgerüstete Labore berechtigt sind, Pflanzen mit solchen Viren zu infizieren.

Das Extraktionsverfahren in dem zu entwickelnden Diagnosesystem sollte möglichst zuverlässig, schnell, ohne giftige Substanzen und auf ein breites Pflanzenspektrum anwendbar sein. Daher wurde die Silika Methode (Boom *et al.*, 1990) ausgewählt. Diese kann erfolgreich für verschiedene Pflanzen wie z.B. Kirschen (Rott und Jelkmann 2001), Apfel (Menzel *et al.*, 2002) und krautige Pflanzen (Letschert *et al.*, 2002) eingesetzt werden. Diese Methode wird nicht nur zur Extraktion von Nukleinsäure aus pflanzlichen Geweben, sondern auch zur Extraktion aus menschlichem und tierischem Serum, Kot und Urin (Bastos *et al.*, 2001; van der Hoek *et al.*, 1995) eingesetzt und beweist damit sein enorm breites Anwendungsgebiet.

Damit dieses Diagnosesystem eine möglichst breite Anwendung findet, sollte der Erfolg jedoch nicht von der Wahl der Extraktionsmethode abhängig sein. Daher wurden verschiedene Extraktionsmethoden untersucht. Die hier untersuchten Methoden Silika (2.2.4.2), Verwoerd (2.2.4.3), E.Z.N.A Plant RNA Kit (2.2.4.4) und TriFast (2.2.4.5) eigneten sich alle gleichermaßen zur anschließenden Amplifizierung mittels RT-PCR. Ein ähnlicher Vergleich wurde für die Extraktion von DNA aus Fäkalien erstellt. Bei dieser Untersuchung wurden vier unterschiedliche kommerziell erhältliche Extraktionskits und die Silika Methode verglichen. Die Silika Methode überzeugte in dieser Untersuchung durch ihre Sensitivität (McOrist *et al.*, 2002). Die Vorteile der Silika Methode liegen bei einer relativ schnellen, einfachen und kostengünstigen Anwendung. Zudem werden keine phenolhaltigen Substanzen verwendet,

wie dies bei den Extraktionsmethoden nach Verwoerd und TriFast der Fall ist. Der E.Z.N.A Plant RNA Kit zeichnet sich besonders durch seine leichte Handhabung und Schnelligkeit aus. Hier spricht jedoch der relativ hohe Preis gegen einen Einsatz bei Massentestungen.

Um eine Vereinfachung des Diagnosesystems zu entwickeln, wurden verschiedene vereinfachte Probenaufarbeitungen getestet. Diese hätten den Vorteil der Zeitersparnis und durch die Verringerung der Pipettierungsschritte wäre auch die Gefahr von Kontaminationen reduziert. Es gibt in der Literatur beschriebene Methoden, bei denen keine Nukleinsäureextraktion aus dem Probenmaterial notwendig ist. Dazu gehört die „*spot*“ RT-PCR (2.2.6.1, La Notte *et al.*, 1997) und die „*Immuno-capture*“ PCR (2.2.6.2). Das Protokoll der „*spot-PCR*“ konnte erfolgreich für TMV-infizierte Tabakpflanzen eingesetzt werden, ebenso die „*Immuno-capture*“ RT-PCR. Da die „*single-tube*“ RT-PCR (2.2.5.3) jedoch bei anderen Pflanzenarten zu unspezifischen Reaktionen führten, müsste dieses System zunächst so adaptiert werden, das es unabhängig von der eingesetzten Pflanzen- und Gewebeart zuverlässige Ergebnisse liefert. Hingegen konnten keine Einschränkungen zu verwendeten Pflanzenarten bei der Silika Extraktionsmethode mit anschließender RT-PCR festgestellt werden. Dies spricht für eine besonders hohe Stabilität und Testsicherheit des hier vorgestellten Diagnosesystems.

Die bisherige taxonomische Einordnung der Tobamoviren und auch die Diagnostik beruhen auf Eigenschaften des Hüllproteins. Eine Differenzierung in die Spezies erfolgt mit Hilfe des „*serological differentiation index*“ (SDI). Der SDI-Wert ist ein Maßstab der serologischen Kreuzreaktivität von zwei Antigenen, der Wert gibt somit die serologische Verwandtschaft zwischen Viren wieder (Jaegel und van Regenmortel, 1985) und wird durch Präzipitationstest oder ELISA ermittelt. Zwei unterschiedliche Spezies haben mindestens einen SDI-Wert von 0,2 (Clark und Barbara, 1987). Auch die historische Differenzierung in die Spezies erfolgte anhand der Aminosäurezusammensetzung des Hüllproteins (Tsugita, 1962). Zur Entwicklung des Diagnosesystems auf Nukleinsäureebene mittels RT-PCR wurde daher die Lage der Oligonukleotide so gewählt, dass sie den Leserahmen für das Hüllproteing flankieren und das Hüllproteing somit im Amplifikat enthalten ist. Deswegen waren die von mir ermittelten Ergebnisse mit serologischen Daten korrelierbar.

Für die Entwicklung der generellen Oligonukleotide, die zur Detektion der Spezies der Solanaceae Subgruppe führen sollten, wurden Sequenzvergleiche erstellt und zwei konservierte Bereiche ausgewählt. Die Konservierung dieser Bereiche beruht wahrscheinlich auf ihren Strukturen, die wichtige Funktionen haben. Die Oligonukleotide, die für die cDNA-Synthese verwendet wurden, lagen am nicht-kodierenden 3'Ende in der tRNA-ähnlichen

Struktur (Pleij *et al.*, 1985; Rietveld *et al.*, 1984). Das zugehörige zweite Oligonukleotid lag im Bereich des „*origin of assembly*“, der wiederum Bestandteil des Leserahmens für das Transportprotein und für die Partikelbildung notwendig ist (Zimmern und Wilson, 1976; Lebeurier *et al.*, 1977). Zwischen diesen beiden Bereichen liegt das Hüllproteingens, das somit in dem Amplikon enthalten ist. Neben der Korrelation mit serologischen Daten gibt es einen weiteren Grund, die Region des Hüllproteingens auszuwählen. Für die Differenzierung in die Spezies ist es notwendig, einen variablen Bereich zu wählen. Genetische Analysen haben gezeigt, dass die größte Heterogenität der Tobamovirus Spezies zwischen den Hüllproteinen und den Transportproteinen besteht, wohingegen die Replikaseproteine konservierter sind. Dies liegt anscheinend an der direkten Interaktion der Hüll- und Transportproteine mit den Wirtsproteinen und somit unterliegen diese auch einem höheren selektiven Druck. Zur Differenzierung sind daher die Bereiche des Hüll- und Transportproteingens besonders geeignet (Berzal-Herranz *et al.*, 1995; de la Cruz *et al.*, 1997).

Für den generellen Nachweis wurden zwei Oligonukleotidpaare entwickelt. Wie anhand der Sequenzvergleiche (Abb. 5) zu ersehen ist, liegt das Oligonukleotidpaar Bluni I und Bluni II in einer Region mit stärker konservierter Sequenz als das Oligonukleotidpaar Tobamo I und Tobamo II. Die so entwickelten Oligonukleotide wurden mit den zur Verfügung stehenden Isolaten der Solanaceae Subgruppe getestet. Die Oligonukleotidkombination Bluni I - II ergab erwartungsgemäß zuverlässigere Ergebnisse als die Oligonukleotidkombination Tobamo I - II. Bei der Primerkombination Tobamo I - II kam es bei 5 Isolaten zu keiner und bei 7 Isolaten zu einer unspezifischen Amplifikation. Bei der Amplifikation mit dem Oligonukleotidpaar Bluni I-II konnte bei jedem Isolat der untersuchten Spezies eine Bande von nahezu gleicher Größe nachgewiesen werden. Dies belegt, dass dieses Oligonukleotidpaar gut zur Detektion der Spezies TMV, ToMV, PMMV, TMGMV und ORSV geeignet ist. Während bei den Spezies TMV, ToMV, TMGMV und PMMV jeweils eine Bande bei der RT-PCR erhalten wurde, ergab die Amplifizierung von ORSV Isolaten Doppelbanden. Diese Doppelbanden mit einer Größe von 790 und 890 bp entstanden dadurch, dass durch eine Sequenzwiederholung am 3' nicht kodierenden Ende von ORSV (Chng *et al.*, 1996) die Oligonukleotide Bluni I und Tobamo I zweimal binden konnten. Um die Bildung der Doppelbanden zu vermeiden, wurden andere Regionen auf Eignung für einen generellen Nachweis überprüft. Es konnte jedoch kein weiterer Bereich am 3' Ende des Genoms mit einer ausreichenden Homologie gefunden werden. Eine generelle RT-PCR für alle Isolate der Solanaceae Subgruppe konnte daher nur mit den oben genannten Oligonukleotiden erfolgen.

Eine Amplifikation von Isolaten der Cucurbitaceae und der Crucifereae Subgruppe gelang mit den Oligonukleotiden Tobamo I-II und Bluni I-II jedoch nicht. Die Subgruppe der Cucurbitaceae zeichnet sich durch eine abweichende Genomorganisation aus, denn hier befindet sich der „*origin of assembly*“ nicht wie bei den anderen Tobamoviren im Transportprotein-, sondern im Hüllproteingen (Fukuda *et al.*, 1981). Wegen dieser grundsätzlich anderen Genomorganisation verwundert es daher auch nicht, dass die Oligonukleotide Bluni II und Tobamo II nicht in der Lage sind zu binden. Für die Spezies CGMMV musste daher ein spezies-spezifisches Oligonukleotid (CGMMV_{spec}) entwickelt werden. Die Sequenzanalyse von CGMMV (Ugaki *et al.*, 1991) zeigte, dass das Oligonukleotid Tobamo I gut und das Oligonukleotid Bluni I unzuverlässig bindet, was durch entsprechende Experimente bestätigt wurde. Eine RT-PCR mit dem Oligonukleotidpaar Tobamo I/CGMMV_{spec} kann CGMMV spezifisch nachweisen und ergibt ein PCR-Fragment der Größe von ca. 830 bp.

Auch für die Subgruppe der Crucifereae konnten generelle Oligonukleotide entwickelt werden. Für die Entwicklung musste jedoch ein anderer Weg gewählt werden. Da es für diese Subgruppe nur relativ wenig Sequenzinformationen gibt und die meisten Sequenzen nur das Hüllproteingen umfassen, konnte nicht wie bei der Solanaceae Subgruppe das gesamte Hüllproteingen und die angrenzenden Bereiche bei der Entwicklung berücksichtigt werden. Das Oligonukleotid HRV_{coat-hin} liegt zwar in dem tRNA-ähnlichen Bereich und damit außerhalb des Hüllproteingens, das Oligonukleotid HRV_{coat-rück} hingegen liegt innerhalb des Hüllproteins und endet 14 Nukleotide vor dem Stoppkodon. Mit diesen Oligonukleotiden konnten Isolate der Spezies *Turnip vein clearing virus* (TVCV), *Oilseed rape mosaic virus* (ORMV) und weitere Spezies amplifiziert werden.

Die Spezies unterscheiden sich untereinander durch genetische Heterogenität, die schon früher für pflanzenpathogene Viren beschrieben wurde (Kunkel, 1947). Diese kann mit verschiedenen Methoden dargestellt und für die Diagnose ausgenutzt werden. Diese genetische Heterogenität kommt durch die relativ hohe Fehlerrate der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) zustande. Bei tierpathogenen Viren mit RNA Genom beträgt die Mutationsrate 10^{-4} (Domingo und Holland, 1994). Bei Pflanzenviren ist die Mutationsrate der RdRp nie bestimmt worden. Man vermutet aber, dass sie ähnlich hoch ist. Jedoch kann man nur solche Mutationen detektieren, die sich in einer Population etablieren. Die hohe Mutationsrate und die damit verbundene genetische Heterogenität findet ihren Ausdruck in der Theorie der Quasispezies. Die Quasispezies beschreibt einen Typ von Populationsstrukturen, mit einer Ansammlung eng verwandter Genomsequenzen, die sich um eine

Konsensussequenz verteilen (Eigen, 1993; Domingo *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997). Dies bedeutet, dass bei Tobamoviren - wie bei allen anderen Viren - auch innerhalb einer Population einzelne Nukleotidaustausche vorhanden sind.

Zur Differenzierung der Spezies auf Nukleisäureebene können verschiedene Methoden wie RT-PCR-RFLP, spezies-spezifische Oligonukleotide, „*single-strand conformational polymorphism*“ (SSCP), „*hetroduplex mobility assay*“ (HMA) herangezogen werden. Für eine Praxisanwendung sollte die Methode zur Differenzierung möglichst einfach, in jedem Labor durchführbar und gut portierbar sein. Daher schieden SSCP und HMA aus, da diese Methoden zum Einen zu sensitiv sind, da schon einzelne Nukleotidaustausche bei der SSCP sichtbar gemacht werden können (Spinardi *et al.*, 1991; Lachtermacher *et al.*, 2000), und zum Anderen schwierig in der Durchführung und somit nicht gut portierbar sind. Die RT-PCR-RFLP hingegen ist eine einfache und gut portierbare Methode. Die Restriktionsenzyme sind bei geeigneter Auswahl unter PCR-Puffer-Bedingungen aktiv und die Detektion des Restriktionsmusters erfolgt anschließend auf einem Agarosegel, wie dieses auch zur Detektion der PCR-Produkte verwendet wird. Trotzdem kann eine RT-PCR-RFLP auch so sensitiv sein, dass Pathotypen innerhalb einer Spezies unterschieden werden können. Dieses Verfahren haben Velasco *et al.* (2002) und Tenllado *et al.* (1994) zur Unterscheidung der Pathotypen PMMV I und PMMV S verwendet. Es wird auch bei anderen pflanzlichen Viren erfolgreich eingesetzt, wie z.B. zur Differenzierung zwischen *Potato virus Y^N* (PVY^N) und PVY^C (Akad und Czosnek, 2002), zur Differenzierung verschiedener *Plum pox virus* (PPV) Isolate (Poncarova und Kominek, 1998), zur Unterscheidung von *Raspberry bushy dwarf* (RBDV) und *Zucchini yellow mosaic* (ZYMV, Barbara *et al.*, 1995). Eine Differenzierung in verschiedene Spezies bei *Mastreviren* (Geminiviridae) wurde von Willment *et al.* (2001) ebenso mit der Hilfe einer PCR-RFLP erreicht. Dies zeigt, dass diese Methode nicht nur bei RNA-Viren, sondern auch bei DNA-Viren anwendbar ist. Ebenso wird die RT-PCR-RFLP zur Differenzierung von humanpathogenen und tierpathogenen Viren eingesetzt, z. B. zur Diagnose von DE072, eines Serotyps des *Infectious bronchitis virus* (IBV, Lee *et al.*, 2000) und zum Vergleich verschiedener Rotavirus Isolate (O'Halloran *et al.*, 2002).

Trotz vieler Beispiele für die erfolgreiche Anwendung der RT-PCR-RFLP in der virologischen Diagnostik, gab es aber auch Rückschläge. So hatte der Austausch eines einzelnen Nukleotides den Wegfall einer Restriktionserkennungsstelle zur Folge. Die Differenzierung des *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) des Serotypes PAV in zwei Gruppen wurde dadurch unmöglich (Mastari *et al.*, 1998). Solche Austausche mit Veränderung des Restriktionsmusters wurden auch beim N-Proteingen von Isolaten des *Tomato spotted wilt*

virus (TSWV) beobachtet. Während einige Austausche immer wieder auftraten und geografischen Herkünften zugeordnet werden konnten, traten andere Austausche wiederum nur einmalig auf (Letschert, 1999; Heinze *et al.*, 2001). Um zu vermeiden, dass durch einzelne Austausche das Restriktionsmuster und damit das Ergebnis verfälscht wird, ist es wichtig, zur eindeutigen Differenzierung die Restriktionsmuster mehrerer Restriktionsendonukleasen zu berücksichtigen. Für die Differenzierung der Spezies der Solanaceae Subgruppe wurden daher sieben Restriktionsendonukleasen ausgewählt. Anhand aller erhaltenen Restriktionsmuster konnte eine Zuordnung innerhalb der Solanaceae und der Crucifereae Subgruppe zu der jeweiligen Spezies erfolgen. Eine Zuordnung wurde als eindeutig eingestuft, wenn mindestens fünf der sieben Restriktionsendonukleasen das für die jeweilige Spezies zu erwartende Muster gezeigt haben.

Auch eine weitergehende Differenzierung innerhalb der Spezies in Pathotypen konnte bei PMMV Isolaten erreicht werden. Dabei entsprachen die Ergebnisse im Wesentlichen den Untersuchungen von Tenllado *et al.* (1994), die das PCR-Fragment im Bereich des Hüllproteingens mit TaqI verdauten und so PMMV I von PMMV S unterschieden.

Das Restriktionsmuster des italienischen Isolates P6 konnte jedoch keinem der beiden Pathotypen eindeutig zugeordnet werden. Das Restriktionsmuster von RsaI, DdeI und Tas I verhielten sich wie beim Pathotyp PMMV S, wogegen das Restriktionsmuster von Taq I sich wie bei dem Pathotypen PMMV I verhielt. Die Restriktionsmuster von AluI war keinem der beiden Pathotypen zuzuordnen. Die Sequenzuntersuchungen von Isolat P6 zeigten Abweichungen einzelner Nukleotide, die über die gesamte Sequenz gleichmäßig verteilt waren und in den meisten Fällen PMMV-I und nur zu einem geringen Teil der Sequenz des PMMV-S homolog waren. Aufgrund der höheren Homologie von 97 % zu dem Isolat PMMV S (Alonso *et al.*, 1986) müsste dieses Isolat anhand der Sequenz als PMMV-S eingestuft werden, jedoch müsste dies durch die entsprechenden biologischen Tests bestätigt werden. Ähnliche Probleme traten auch bei Tenllado *et al.* (1994) auf, hier kam es bei einigen Feldproben nicht zur Kongruenz der biologischen Daten mit den Restriktionsmustern. Da bislang jedoch die genetischen Positionen, die diese Resistenzbrechungen verursachen, noch nicht identifiziert sind, geben die Restriktionsmuster nur ein Hinweis auf die Pathotypen.

Bei zwei der sieben verwendeten Restriktionsendonukleasen meiner Untersuchungen (Hinfl und TasI) zeigten sich Unterschiede zu dem anhand der Sequenz EMBL AJ 308228 (Velasco *et al.*, 2002) berechneten Restriktionsmuster bei zwei Isolaten von PMMV-I (P2, P5) Dies beruht wahrscheinlich auf der genetischen Heterogenität, was zu veränderten Restriktionsmustern führte trotz einer Homologie (Nukleinsäure) von 99 % und 98 % in dem untersuchten

Bereich. Ob diese Abweichungen mehrere Isolate betreffen oder funktionelle Bedeutung haben, kann nur spekuliert werden. Um diese Fragestellung hinreichend zu beantworten, müssten wesentlich mehr Isolate untersucht werden.

Bei dem Isolat Ohio V (Anhang 1), welches serologisch zur Spezies TMV gehört, entspricht das erhaltene Restriktionsmuster nicht dem von TMV. Dieses Isolat wurde von Cirulli und Alexander (1969) als Resistenzbrecher beschrieben, es ist in der Lage die Resistenz Tm-1 und Tm-2 zu brechen. Die Aminosäuresequenzanalyse des Isolates Ohio V zeigte 95% identische Aminosäuren verglichen mit dem Hüllprotein von TMV (variant 2, Goelet *et al.*, 1982), die Nukleinsäuresequenz jedoch nur 87% Homologie. Die Nukleinsäuresequenzanalyse zeigte interessanterweise auch, dass von den 47 mutierten Kodons 40 (85%) stille Mutationen aufwiesen (Abb. 9), die sich somit nicht auf die Aminosäurezusammensetzung des Hüllproteins auswirken. Die biologische Relevanz der hohen Variabilität auf Nukleinsäureebene und deren mögliche Auswirkung auf die Resistenzbrechung ist jedoch noch unklar. Da ich mich auf das Hüllprotein beschränkt habe, ist nicht klar, ob die hohe Anzahl der Mutationen nur in diesem Bereich vorhanden ist, oder ob alle Leserahmen betroffen sind. Für die Differenzierung der Spezies ist in diesem Fall die RFLP nicht geeignet, jedoch zeigt sie gleichzeitig, dass sie in der Lage ist, die genetische Heterogenität biologisch interessanter Isolate darzustellen, die sich serologisch nicht manifestiert.

Bei dem später eindeutig der Spezies ORMV zugeordneten Isolat R19 ergab sich zunächst mit der Oligonukleotidkombination Tobamo I - HRV_{cluster} und der daraus resultierenden Restriktionsmusteranalyse keine Zuordnung zu den bisher bekannten Spezies. Bei der Sequenzanalyse stellte sich dann heraus, dass das Fragment zu 97 % homolog zu Chloroplasten DNA ist. Das Verpacken von Chloroplasten DNA in Tobamoviruspartikel ist ein Phänomen, das schon 1971 von Siegel beschrieben wurde. Aufgrund der unspezifischen Reaktion, die auch bei anderen ORMV Isolaten beobachtet werden konnte, ist also das Oligonukleotidpaar Tobamo I – HRV_{cluster} nur bedingt für den Nachweis von Tobamoviren geeignet. Anhand der Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass das Oligonukleotid HRV_{cluster} in der Lage ist, gut zu binden, das Oligonukleotid Tobamo I hingegen war nicht in der Lage zu binden und so konnte keine Amplifikation erfolgen.

Problematisch ist die RFLP bei der Spezies ORSV. Durch die Amplifizierung von Doppelbanden ist eine RFLP nicht möglich, da sich die entstehenden Banden gegenseitig überlagern. Die Größen der erhaltenen Doppelbande (790 bp und 890 bp) sind als Differenzierungskriterium jedoch ausreichend, da sie sich von den Doppelbanden von SFBV eindeutig in der Größe unterscheiden (650 bp und 800 bp). Solche Überlagerungen von Banden können auch

bei Mischinfektionen auftreten und die Interpretation der Restriktionsmuster aufgrund der Vielzahl der Banden erschweren. Werden die beiden Spezies einer Mischinfektion gleich stark amplifiziert, kann sogar das Mengenverhältnis der Spezies zueinander abgeschätzt werden. Je höher die eingesetzte RNA-Menge war, desto stärker war auch die im Agarosegel sichtbare Bande (Abb. 12). Diese Resultate stimmen mit den Beobachtungen von Willment *et al.* (2001) überein. Er berichtet, dass die relativen Mengen der Komponenten einer Mischinfektion durch die verschiedenen Stärken der Banden unterschieden werden können. Jedoch kann es auch vorkommen, dass zwei Spezies unterschiedlich stark in einer RT-PCR amplifiziert werden, so dass in diesem Fall keine Aussage über die relativen Virusmengen in der Probe getroffen werden kann. Die Amplifikationsstärke müsste für jede Virus Kombination in künstlichen Mischungen definierter Menge ermittelt werden.

Eine andere Möglichkeit zur Differenzierung in die Spezies besteht in der Entwicklung von spezies-spezifischen Oligonukleotiden. Zur Etablierung dieser Methode wurde das Oligonukleotid Bluni I zur cDNA-Synthese beibehalten. Die spezies-spezifischen Oligonukleotide wurden so gewählt, dass diese innerhalb des Amplifikates, welches mit der Oligonukleotidkombination Bluni I-II erhalten wurde, lagen. Somit konnten mit einer nachfolgenden semi-nested PCR oder einer direkten Amplifikation von der cDNA (3.2.2) mit der Oligonukleotidkombination Bluni I- spezies-spezifisches Oligonukleotid die Spezies TMV, ToMV, PMMV, ORSV und TMGMV identifiziert werden. Die Spezifität dieser Oligonukleotide konnte bestätigt werden (3.2.2.1). Dabei stellte sich heraus, dass das Oligonukleotid $TMGMV_{spec}$ nicht bei allen TMGMV Isolaten zu der gewünschten Amplifikation führte, so dass ein weiteres Oligonukleotid $TMGMV_{neu}$ entwickelt und erfolgreich getestet wurde. Das Oligonukleotid $TMGMV_{spec}$ weist bei einigen Isolaten ein „*mismatch*“ nahe des 3' Endes auf, wodurch eine Verlängerung des Oligonukleotides zum komplementären Strang bei den relativ hohen Annealing-Temperaturen verhindert wird.

Bei dem Einsatz des PCR-Produktes aus der generellen RT-PCR als Ausgangsprodukt für die spezies-spezifische PCR („semi-nested“ PCR) traten teilweise unspezifische Reaktionen auf, die teilweise zu falsch positiven Ergebnissen führten. Dieses Problem konnte durch die Verwendung einer Verdünnungsreihe des PCR-Produktes umgangen werden. Offensichtlich ist die Menge des PCR-Produktes, die für die „*semi-nested*“ PCR eingesetzt wird, entscheidend. Bei einer zu hohen Konzentration kommt es zu unspezifischen Reaktionen, bei einer zu geringen Konzentration ist die Bande schwach oder nicht zu detektieren. Da aus einer PCR mit generellen Oligonukleotiden (Bluni I –Bluni II) jedoch oftmals unterschiedliche Mengen von Amplifikat resultieren, ist eine einheitliche Verdünnung nicht möglich. Für die Routine-

testung müssten daher Verdünnungsreihen erstellt und geprüft werden. Dies rechtfertigt aber nicht den Aufwand, zumal die PCR mit dem Ausgangsprodukt cDNA eindeutige und zuverlässige Ergebnisse mit der Oligonukleotidkombination Bluni I spezies-spezifisches Oligonukleotid liefert. Die Amplifikation mit spezies-spezifischen Oligonukleotiden direkt von der cDNA ist in diesem Fall schneller und sicherer und führt immer zu eindeutigen Ergebnissen. Grundsätzlich ist jedoch eine weitergehende Differenzierung von Spezies auch von einem genus-spezifischen PCR-Produkt möglich.

Das erste Tobamovirus, das in der Lage war Crucifereae, zu infizieren, wurde 1941 von Holmes als „*Ribgrass*“ Stamm von TMV beschrieben, 1969 wurde die Aminosäuresequenz dieses Isolates bestimmt (Wittmann *et al.*, 1969; Jauregui-Adell *et al.*, 1969). Später wurden weitere Crucifereae infizierende Tobamoviren beschrieben, die in der „Holmes' Ribgrass“ Subgruppe (hier: Subgruppe der Crucifereae) zusammengefasst wurden (Oshima *et al.*, 1974). Die Einteilung erfolgte basierend auf ihrem Wirtskreis (Wetter 1986) und der Aminosäurezusammensetzung (Chessin *et al.*, 1980; Gibbs *et al.*, 1986). In der Literatur sind neben dem *Ribgrass mosaic virus* (RMV) die Spezies *Turnip vein clearing virus* (TVCV) und *Oilseed rape mosaic virus* (ORMV) eindeutig dieser Subgruppe zugeordnet (Lartey *et al.*, 1996; Shimamoto *et al.*, 1998). Die Hüllproteine von TVCV, ORMV und der dritten Spezies RMV weisen untereinander etwa 90 % identische Aminosäuren auf. Diese hohe Homologie führt zu starken serologischen Kreuzreaktionen, so dass eine eindeutige serologische Identifizierung dieser Spezies erhebliche Probleme bereitet. Auch eine Differenzierung dieser Spezies anhand der Aminosäurezusammensetzung ist unzureichend, da durch die große Sequenzhomologie nur geringe Unterschiede bestehen, die als Differenzierungskriterium nicht ausreichend sind. In der nachfolgenden Tabelle 18 ist die Anzahl der Aminosäuren pro Hüllprotein der Isolate der Crucifereae Subgruppe und zum Vergleich von TMV und SFBV aufgetragen. Auffällig ist, dass die Unterschiede in der Anzahl der verschiedenen Aminosäuren der Spezies der Crucifereae Subgruppe nur sehr gering und für Arg, Cys, His, Trp und Val sogar gleich sind. Im Gegensatz dazu sind die Unterschiede zu TMV und SFBV deutlich und können gut zur Differenzierung herangezogen werden.

Tab. 18: Anzahl der Aminosäuren pro Hüllprotein verschiedener Spezies der Subgruppe der Crucifereae, SFBV und TMV

	HRV	TVCV	Crucifer	ORMV	TMV	SFBV
Ala	18	18	19	19	14	16
Arg	10	10	10	10	11	11
Asp	17	15	14	15	18	17
Cys	1	1	1	1	1	1
Glu	22	22	23	22	16	22
Gly	4	3	3	3	6	5
His	1	1	1	1	0	0
Ile	8	7	9	7	9	6
Leu	11	12	13	14	12	16
Lys	2	2	3	2	2	4
Met	3	5	4	5	1	3
Phe	6	5	6	5	8	8
Pro	8	9	7	7	8	5
Ser	13	16	16	15	16	12
Thr	13	12	10	11	16	16
Trp	2	2	2	2	3	3
Tyr	7	7	6	7	4	3
Val	10	10	10	10	14	10

Die Anzahl der einzelnen Aminosäuren wurde anhand der folgenden Sequenzen bestimmt: ORMV (U30944; Aguilar *et al.*, 1996); TVCV (U03387; Lartey *et al.*, 1994 / Lartey *et al.*, 1995); HRV (Jauregui-Adell *et al.*, 1969); SFBV (Isolat R15); Crucifer (AB017503; Lee *et al.*, 2002 unveröffentlicht); TMV (X68110; Kob *et al.*, 1992)

Bei einer solch großen Homologie und der Aminosäurezusammensetzung als ein Differenzierungskriterium wundert es nicht, dass alle zur Verfügung gestellten Proben als RMV-Spezies bezeichnet wurden und eine Differenzierung in die Spezies erst auf Nukleinsäureebene erfolgen konnte. Diese drei Spezies wurden auch von Lartey *et al.* (1996) anhand der Sequenzdaten differenziert. Wie unklar die Speziesgrenzen sind, zeigt sich auch bei Gibbs (1999), der RMV und TVCV in eine Spezies zusammengefasst hat. Hierbei stellt sich die Frage der Speziesgrenzen, zumal auf die biologischen Unterschiede in den Veröffentlichungen zur Unterscheidung zwischen den Spezies nicht eingegangen wird. Eine Unterscheidung findet hier nur aufgrund der Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz statt (Lartey *et al.*, 1995; Lartey *et al.*, 1996), so dass weitere Untersuchungen für eine eindeutige Zuordnung notwendig sind.

Ein abweichendes Restriktionsmuster kann ein Hinweis auf eine neue Spezies sein, aber allein die Betrachtung der Nukleinsäuresequenz ist zur Etablierung einer Spezies – wie oben erläutert - nicht ausreichend. Auch die biologische Charakterisierung muss mit einbezogen werden (van Regenmortel, 1990).

In dieser Arbeit konnten die drei unterschiedlichen Spezies der Crucifereae Subgruppe anhand der sequenzierten Isolate in einem Ähnlichkeitsdiagramm (Abb. 17) dargestellt werden. Mit Hilfe der RT-PCR-RFLP wurde ein Werkzeug entwickelt, das es erlaubt, mit einfachen Mitteln die etablierten Spezies dieser Subgruppe zu unterscheiden, so dass damit die Grund-

lage geschaffen ist, die Untersuchungen weiterer Eigenschaften wie Biologie und geographische Verbreitung durchzuführen. Auch ist es mit der RFLP möglich, neue Varianten oder sogar Spezies aufzufinden.

Die Parameter zur Einteilung der Spezies in Subgruppen, anhand der Homologien zwischen den Hüllproteinen, konnte sowohl mit einem Ähnlichkeitsdiagramm als auch mit einer Grafik nach Shukla und Ward (1989) dargestellt werden. Diese beiden Darstellungen stimmen in ihrer Aussagen überein, die Spezies und Subgruppen entsprachen sich (Abb. 17; Abb. 18).

Das *Streptocarpus flowerbreak virus* (SFBV) wurde erstmalig von Verhoeven *et al.* (1995) beschrieben. SFBV verursacht Blütenbrechungen bei *Streptocarpus* sp., wohingegen nur selten Blattsymptome zu beobachten sind. Sowohl der Wirtspflanzenkreis als auch die Symptomausprägung bei verschiedenen Testpflanzen unterscheidet sich deutlich von allen anderen Tobamoviren (Verhoeven *et al.*, 1995). Im Immundiffusionstest zeigte sich keine Verwandtschaft zu Isolaten der Cruciferae Subgruppe. Zudem hat SFBV einen anderen Wirtspflanzenkreis und eine andere Symptomausprägung als RMV (Oshima und Harrison, 1975; Wetter, 1986). Eindeutig als SFBV charakterisierte Isolate (Dr. Lesemann, pers. Mitteilung), zeigten serologische Reaktionen, die am ehesten eine Zugehörigkeit zur Crucifereae Subgruppe vermuten lassen.

Aufgrund der unklaren Zuordnung dieser Spezies innerhalb der Tobamoviren, sollte versucht werden, durch die Sequenzierung des gesamten Genoms, eine taxonomische Zuordnung zu erreichen.

Insgesamt konnte der vollständige kodierende Bereich mit über 6000 nt sequenziert werden. Die Genomorganisation zeigt einige Besonderheiten. Es konnte eine Überlappung des Hüllproteingens mit dem Transportproteingens von 121 nt nachgewiesen werden. Bei den Isolaten der Solanaceae Subgruppe kommt es zu keiner und bei den Isolaten der Crucifereae Subgruppe zu einer geringeren Überlappung von 77 nt (Aguilar *et al.*, 1996) dieser beiden Gene. Eine Überlappung des Transportproteingens mit dem Polymerasegen von 19 nt konnte ebenso festgestellt werden. Eine solche Überlappung hingegen ist bei der Genomorganisation von einigen Spezies der Subgruppen der Solanaceae und Cucurbitaceae bekannt, nicht jedoch von Spezies der Crucifereae Subgruppe. Die Region 5220-5420 von SFBV ist nur zu 50% identisch zu der bekannten Sequenz des „*origin of assembly*“ von TMV (Jonard *et al.*, 1977; Zimmern, 1977). Die einleitende Sequenz des „*loop 3*“ weist eine besonders hohe Homologie auf. Der von Lartey *et al.* (1996) als „*origin of assembly*“ der Crucifereae Subgruppe ange-

gebene (GXX)_n reiche Bereich (bei TVCV von 5400-5506) liegt jedoch stromaufwärts von dem von mir vermuteten „*origin of assembly*“ des SFBV (Position 5100-5200).

Im Bereich des ORF 1 und 2 besteht eine Übereinstimmung von 67,3 % identischen Aminosäuren zu ORSV, die Spezies der Crucifereae weisen hier eine etwas geringere Homologie von etwa 65 % auf. In den ORFs 3 und 4 besteht die größte Homologie von 49,3 % und 58,6 % zu RMV, wohingegen nur eine geringe Homologie von 31,2 % und 45,3 % zu ORSV besteht. Es ist nicht verwunderlich, dass die Homologie von SFBV und ORSV in den einzelnen Bereichen so unterschiedlich ist, da es sich bei ORSV um ein rekombinantes Virus aus Spezies der Subgruppe der Solanaceae und Crucifereae handelt (Gibbs *et al.*, 2000). Das 5' Ende von ORSV stammt aus der Subgruppe der Crucifereae und das 3' Ende, beginnend vom Transportproteingen, von der Subgruppe der Solanaceae (Lartey *et al.*, 1996). Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass Bereiche von ORSV, welche aus der Crucifereae Subgruppe stammen, eine hohe Homologie zeigen und der 3' Bereich ab dem Transportproteingen, der aus der Subgruppe der Solanaceae stammt, nur eine geringe Homologie aufweist.

Durch Sequenzvergleiche des ORF 1 von SFBV mit der bekannten Methyltransferase- und Helikasedomäne von TMV (Sameer *et al.*, 2001) konnten entsprechende Bereiche bei SFBV identifiziert werden. Die vermutete Methyltransferasedomäne befindet sich im N-Terminus dieses Proteins (1-376 aa) und hat eine etwas höhere Homologie von 69 % zu dem entsprechenden Protein des ORSV (Ryu und Park, 1995) Isolates als das gesamte Protein (67 %). Die daran anschließende Region (376-814) hat eine auffallend geringe Homologie von nur 57 %. Die Helikasedomäne befindet sich am C-Terminus dieses ORFs von Position 800-1100aa und hat eine Homologie von 71 % zu dem entsprechenden Protein von ORSV. Wie zu erwarten ist, sind die für die Proteinaktivität verantwortlichen Bereiche stärker konserviert. Der sich daran anschließende Bereich der Polymerase, der durch Überlesen des Stoppkodons in Position 3351 noch angehängt wird, hat eine Homologie von 75% zu ORSV und eine ähnlich hohe Homologie zu den Spezies der Crucifereae Subgruppe. Die Anordnung der funktionellen Bereiche und ihre Homologien zeigen eine deutliche Übereinstimmung zu anderen Tobamoviren, insbesondere zu Spezies der Solanaceae und Crucifereae Subgruppen.

Der ORF 3 kodiert für das Transportprotein und ist mit einer berechneten Größe von 31,4 kDa größer als die meisten Transportproteine anderer Tobamoviren. Nur ORSV hat mit einer Größe von 33,5 kDa ein größeres Transportprotein. Wie zu erwarten war, sind die Transportproteine von ORSV und SFBV nicht am ähnlichsten. Die größte Homologie von 65,3 % besteht hier zu dem entsprechenden Protein von ORMV. Auch die anderen Homologien zu

weiteren Isolaten der Crucifereae Subgruppe weisen ähnliche Werte auf. Das Hüllprotein weist eine Größe von 17,6 kDa auf und entspricht damit den Größen der anderen Tobamoviren. Die Funktion und Größe des aus diesem ORF resultierenden Proteins wurde durch Expression und Nachweis im Western-Blot bestätigt. Auch in diesem Bereich ist die Homologie mit 58,6 % zu den Isolaten der Crucifereae Subgruppe am höchsten.

Die Sequenzanalyse zeigte, ebenso wie dies bei ORSV der Fall ist, eine Sequenzwiederholung am 3' Ende des Genoms. Dadurch kommt es zur zweimaligen Bindung des Oligonukleotides Bluni I und den daraus resultierenden Doppelbanden.

Das 5' Ende konnte nicht vollständig sequenziert werden, jedoch lag das Oligonukleotid End 5 (2.1.2) nur 12 Nukleotide vor dem vermuteten 5' Ende des Genoms, da die zur Entwicklung dieses Oligonukleotides herangezogenen Sequenzen von TMV, ToMV, PMMV, ORMV, TVCV und TMGMV auch nur noch maximal 12 weitere Nukleotide aufweisen. Das 3' Ende wurde nicht bestimmt.

Eine eindeutige Zuordnung von SFBV zu einer Subgruppe ist fraglich. Die Überlappung zwischen Hüllproteingen und Transportproteingen spricht für eine Einordnung in die Crucifereae Subgruppe. Hingegen kommt bei den Spezies der Crucifereae Subgruppe keine Überlappung zwischen Transport- und Replikasegen vor, wie dies bei SFBV der Fall ist. Dies spricht wiederum gegen eine Zugehörigkeit zur Crucifereae Subgruppe. Auch die Homologie des Hüllproteins zu den Isolaten der Crucifereae Subgruppe beträgt nur knapp 60% und liegt damit in dem Bereich der Grafik nach Shukla und Ward (1989), welcher von Isolaten eingenommen wird, die zu verschiedenen Subgruppen gehören (Abb. 18). Jedoch wäre es interessant, ob SFBV auch in der Lage ist, Crucifereae Pflanzen zu infizieren, was möglicherweise ein entscheidendes Kriterium sein könnte. Anscheinend gehört SFBV zu keiner der bislang bekannten Subgruppen und wäre somit bislang die einzige Spezies in einer neuen Subgruppe.

5 Zusammenfassung

Tobamoviren verursachen wirtschaftlich bedeutende Schäden im Gemüse und Zierpflanzenanbau. Es sind 14 Spezies bekannt, die in die Subgruppen der Solanaceae, Cucurbitaceae und Crucifereae eingeteilt werden und sich in ihrem Wirtsspektrum unterscheiden. Durch ihre Stabilität sind sie schwer zu kontrollieren, so dass das Erkennen und Ausmerzen infizierter Bestände eine große Bedeutung hat. Zur Diagnose dieser Viren gibt es unterschiedliche Verfahren, die jedoch nicht alle gleichermaßen für die Routineanwendung und weitere Fragestellungen wie der Nachweis bestimmter Spezies oder Pathotypen geeignet sind.

Zum Nachweis von Tobamoviren eignen sich serologische Verfahren sehr gut, jedoch ist eine Differenzierung zwischen den Spezies so nur schwer möglich. Aufgrund der hohen Homologien des Hüllproteins der einzelnen Spezies kommt es zu starken Kreuzreaktionen. Vor allem die Differenzierung von Pathotypen kann mit serologischen Verfahren bei Tobamoviren nicht erfolgen, so dass auf nukleinsäure-basierende Methoden zurückgegriffen werden muss.

Im Laufe des Projektes ist es gelungen, die Methode zum Nachweis von serologisch eng verwandten Virusspezies des Genus *Tobamovirus*, die zur Subgruppe der Solanaceae gehören, mit Hilfe eines universellen Primerpaares (Bluni I-II) durch eine RT-PCR nachzuweisen und anschließend entweder mit einer RFLP-Analyse oder mittels spezies-spezifischen Oligonukleotiden in die Spezies zu differenzieren. Die universellen Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie das Hüllproteingen umfassen und somit diese Art der Differenzierung mit serologischen Methoden korreliert werden kann. Diese spezies-spezifischen Oligonukleotide können daher sowohl direkt von der cDNA, als auch im Anschluss an die universelle RT-PCR in einer „*semi-nested*“ PCR angewendet werden.

Für die Nukleinsäureisolierung konnte unabhängig von der Wirtsspezies eine Silika Methode optimiert werden, so dass die Verwendung organischer Lösungsmittel entfällt. Das etablierte Verfahren kann für die Virusspezies TMV, ToMV, TMGMV, PMMV, ORSV angewandt werden und die RT-PCR-RFLP eignet sich auch zur Differenzierung in Pathotypen und hochgradig mutierte Isolate. Für den Nachweis von CGMMV, eines Vertreters der Cucurbitaceae Subgruppe, konnte ein spezifischer Nachweis entwickelt werden.

Eine generelle RT-PCR für die Isolate der Crucifereae Subgruppe wurde ebenso entwickelt. Mit Hilfe der RT-PCR-RFLP gelang es auch in dieser Subgruppe, die Spezies TVCV, ORMV und RMV zu differenzieren, was aufgrund der hohen Homologie zwischen diesen Spezies und den daraus resultierenden Kreuzreaktionen bisher nur unzureichend gelang.

Das *Streptocarpus flowerbreak virus* (SFBV), welches serologisch am ehesten mit Isolaten der Crucifereae Subgruppe verwandt ist, konnte molekularbiologisch charakterisiert werden. Auffällig in der Genomorganisation von SFBV ist die Überlappung sowohl des Transportproteingens mit dem Hüllproteingen als auch die des Transportproteingens mit dem Replikaseproteingen. Eine weitere Besonderheit stellt die repetitive Sequenz am 3`Ende des Genoms dar, die bisher nur von ORSV bekannt war. Aufgrund der Genomorganisation und den relativ geringen Homologien zu anderen Tobamoviren kann SFBV in keine der bisher bekannten Subgruppen eingeordnet werden.

6 Referenzen

- Aguilar, I., Sanchez, F., Martin, A., Martinez-Herrera, D., Ponz, F. (1996) Nucleotide sequence of Chinese rape mosaic virus (oilseed rape mosaic virus), a crucifer tobamovirus infectious on *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **30**: 191-197.
- Alonso, E., Garcia-Luque, I., Avila-Rincon, M., Wicke, B., Serra, M. T., Diaz-Ruiz, J. R. (1989) A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain. *J. Phytopathol.* **125**: 67-76.
- Alonso E., Garcia-Luque I., la Cruz A., Wicke B., Avila-Rincon M.J., Serra M.T., Castresana C., Diaz-Ruiz J.R.; (1991) Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. *J. Gen. Virol.* **72**, 875-2884.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Barbara, D. J., Morton, A., Spence, N. J., Miller, A. (1995) Differentiation of closely related isolates of two plant viruses by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Virol. Methods* **55**: 121-131.
- Bastos, A. D. S., Haydon, D. T., Forsberg, R., Knowles, N. J., Anderson E. C., Bengis, R. G., Nel, L.H., Thomson G. R. (2001) Genetic heterogeneity of SAT-1 type foot-and-mouth disease viruses in southern Africa. *Arch. Virol.* **146**: 1537-1551.
- Bateson, M. F., Dale, J. L. (1995) Banana bract mosaic virus: characterization using potyvirus specific degenerate PCR primers. *Arch. Virol.* **140**: 515-527.
- Beier, H., Barciszewska M., Krupp G., Mitnacht, R., Gross, H. J. (1984) UAG readthrough during TMV RNA translation: isolation and sequence of two tRNAs^{tyr} with suppressor activity from tobacco plants. *EMBO J.* **3**: 351-356.
- Belenovich E., Generozov E., Novikov V., Zavriev S. (1997) Properties and the genome structure of the K2 strain of tobacco mosaic virus. *Mol. Biol.* **31**: 826-30.
- Bernal J. D., Fankuchen I. (1941) Tomato bushy stunt virus (TBSV) and tobacco mosaic virus (TMV) shown to give clear X-ray diffraction patterns. *J. Gen. Physiol.* **25**: 111-146.
- Berzal-Herranz, A., de la Cruz, A., Tenllado, F., Diaz-Ruiz, J. R., Lopez, L., Sanz, A. I., Vaquero, C., Serra, M. T., Garcia-Luque, I. (1995) The Capsicum L3 gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. *Virology* **20**: 498-505.

- Birnboim, H. C., Beier, H., Gross, H. J. (1987) Improved extraction procedure for screening recombinant plasmid. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Bodaghi, S., Ngon, M., Yassi, A., Dodds, J. A. (2000) Heterogeneity in the 3'-terminal untranslated region of tobacco mild green mosaic tobamoviruses from *Nicotiana glauca* resulting in variants with three or six pseudoknots. *J. Gen. Virol.* **81**: 577-586.
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim van Dillen, P. M. E., van der Noordaa, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 495-503.
- Boonham, N., Walsh, K., Preston, S., North, J., Smith, P., Barker, I. (2002) The detection of tuber necrotic isolates of Potato virus Y, and the accurate discrimination of PVY^O, PVY^N and PVY^C strains using RT-PCR. *J. Virol. Methods* **102**: 103-12.
- Bos, L. (1999) Beijerinck's work on tobacco mosaic virus: historical context and legacy *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **354**: 675-685.
- Carr J. P., Marsh L. E., Lomonosoff G. P., Sekiya M. E., Zaitlin M. (1992) Resistance to tobacco mosaic virus induced by the 54-kDa gene sequence requires expression of the 54-kDa protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* **5**: 397-404.
- Carrington, J. C., Morris, T. J. (1984) Complementary DNA cloning and analysis of carnation mottle virus RNA. *Virology* **139**: 22-31.
- Caspar, D.L.D. (1963) Assembly and stability of the tobacco mosaic virus particle. *Adv. Protein Chem.* **18**: 37-121.
- Chessin, M., Juretic, N., Milicic, D., Perryman, J., Giri, L. (1980) A distinct strain of ribgrass mosaic virus from Montana, USA. *Phytopathol. Z.* **97**: 295-301.
- Chng, C. G., Wong, S. M., Mahtani, P. H., Loh, C. S., Goh, C. J., Kao, M. C., Chung, M. C., Watanabe, Y. (1996) The complete sequence of a singapore isolate of odontoglossum ringspot virus and comparison with other tobamoviruses. *Gene* **171**: 155-161.
- Choi, C. W., Park, S. H., Choi, J. K., Ryu, K. H., Park, W. M. (2000) Chemical degradation of tobacco mosaic virus followed by infectivity assay, reverse transcription-polymerase chain reaction and gel electrophoresis. *Acta Virol.* **44**: 145-149.
- Cirulli, M., Alexander, L. J. (1969) Influence of temperature and strain of tobacco mosaic virus on resistance in a tomato breeding line derived from *Lycopersicon peruvianum*. *Phytopathology* **59**: 1287-1297.
- Clark, M. F., Barbara, D. J. (1987) A method for the quantitative analysis of ELISA data. *J. Virol. Methods* **15**: 213-222.

- Culver J. N., Lehto K., Close S. M., Hilf M. E., Dawson W. O. (1993) Genomic position affects the expression of tobacco mosaic virus movement and coat protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2055-2059.
- De Blas, C., Borja, M. J., Saiz, M., Romero, J. (1994) Broad spectrum detection of cucumber mosaic virus (CMV) using the polymerase chain reaction. *J. Phytopathol.* **141**: 323-329.
- de la Cruz A, Lopez L, Tenllado F, Diaz-Ruiz JR, Sanz AI, Vaquero C, Serra MT, Garcia-Luque I (1997) The coat protein is required for the elicitation of the Capsicum L2 gene-mediated resistance against the tobamoviruses. *Mol Plant Microbe Interact.* **10**, 107-13.
- Devereux, J., Haeberli, P., Smithies, G. (1984). A comprehensive set of wequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395
- Domingo, E., Holland, J. J. (1994) Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: Morse SS (ed) *The Evolutionary Biology of Viruses*. Raven, New York: 161-184.
- Domingo, E., Holland, J., Biebrich, C., Eigen, M. (1995) Quasispecies: the concept and the word. In: A. J. Gibbs, C. H. Calisher, F. Garcia-Arenal (eds) *Molecular Basis for Virus Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge: 181-191.
- Eigen, M. (1993) Viral quasispecies. *Sci. Am.* **269**: 42-49.
- Eun, A. J. C., Seoh, M. L., Wong, S. M. (2000) Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the TaqMan real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* **87**: 151-160.
- Fraenkel-Conrat, H. (1956) The role of the nucleic acid in the reconstitution of active tobacco mosaic virus. *J. Am. Chem. Soc.* **78**: 882-883.
- Fraile, A., Aranda, M. A., Garcia-Arenal, F. (1995) Evolution of tobamoviruses. In: A.J. Gibbs, C. H. Calisher, F. Garcia-Arenal (eds). *Molecular Basis of Virus Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge: 338-350.
- Fukuda, M., Meshi, T., Okada, Y., Takebe, I. (1981) Correlation between particle multiplicity and location on virion RNA of the assembly initiation site for viruses of the tobacco mosaic virus group. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 4231-4235.
- Gallie D. R., Sleat D. E., Watts J. W., Turner P.C., Wilson, T. M. A. (1987) The 5' leader Gsequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res.* **15**:3257-3273.
- Garcia-Arenal, F. (1988) Sequence and structure at the genome 3' end of the U2-strain of tobacco mosaic virus, a histidine accepting tobamovirus. *Virology* **167**: 201-206.

- Garcia-Luque, I., Ferrero, M. L., Rodriguez, J. M., Alonso, E., de la Cruz, A., Sanz, A., Vaquero, C., Serra, M. T., Diaz-Ruiz, J. R. (1993) The nucleotide sequence of the coat protein genes and 3' non-coding regions of two resistance breaking tobamoviruses in pepper shows that they are different viruses. *Arch. Virol.* **131**: 75-88.
- Gibbs M. J., Armstrong, J. S., Gibbs A. J. (2000) Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* **16**: 573-582.
- Gibbs, A. (1986) The Viruses. Tobamovirus Classification. In: M.H.V. van Regenmortel, H. Fraenkel-Conrat (eds). *The Plant Viruses*, Vol. 2. Plenum Press, New York and London: 168-180.
- Gibbs, A. (1999) Evolution and origins of tobamoviruses. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B.* **354**: 593-602.
- Gierer, A., Schramm, G. (1956) Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. *Nature* **177**: 702-703
- Glais, L., Kerlan, C., Tribodet, M., Marie-Jeanne Tordo, V., Robaglia, C., Astier-Manificier, S. (1996) Molecular characterization of potato virus Y^N isolates by PCR- RFLP. *Eur. J. Plant. Pathol.* **102**: 655-662.
- Goelet, P., Lomonossoff, G. P., Butler, P. J. G., Akam, M. E., Gait, M. J., Karn, J. (1982) Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 5818-5822.
- Gooding, J.V., Herbert, T.T. (1967) A simple technique of purification of tobacco mosaic virus in large quantities. *Phytopathology* **57**: 1285.
- Gorbalenya, A. E., Koonin E. V. (1989) Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Res.* **17**: 8413-8440.
- Heinze C, Letschert B, Hristova D, Yankulova M, Kauadjouor O, Willingmann P, Atanassov A, Adam G. (2001) Variability of the N-protein and the intergenic region of the S RNA of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV). *New Microbiol.* **24**, 175-87
- Henson, J. M., French, R. (1993) The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**: 81-109.
- Hilf, M. E., Dawson, W. O. (1993) The tobamovirus capsid protein functions as a host-specific determinant of long-distance movement. *Virology* **193**: 106-114.
- Hodgman, T. C. (1988) A new superfamily of replicative proteins. *Nature* **333**: 22-23.

- Ikegami, M., Isomura, Y., Matsumoto, Y., Chatani, M., Inouye, N. (1995) The complete nucleotide sequence of odontoglossum ringspot virus (Cy- 1 strain) genomic RNA. *Microbiol. Immunol.* **39**: 995-1001.
- Jaegle, M., van Regenmortel, M. H. V. (1985) Use of ELISA for measuring the extent of serological cross-reactivity between plant viruses. *J. Virol. Methods* **11**: 189-198.
- Jauregui-Adell, J., Hindennach, I., Witmann, H. G. (1969) Die primäre Proteinstruktur von Stämmen des Tabakmosaikvirus V. Aminosäuresequenz (1-61) des Proteins des Tabakmosaikvirus-Stammes Holmes Ribgrass. *Z. Naturforsch. B.* **24**: 870-877.
- Jonard, G., Richards, K. E., Guilley, H., Hirth, L. (1977) Sequence from the assembly nucleation region of tobacco mosaic virus RNA. *Cell* **11**: 483-493.
- Kausche, G. A., Pfankuch, E., Ruska, H. (1939) Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop. *Naturwissenschaften* **27**: 292-299.
- Klug, A., Caspar, D. L. D. (1960) The structure of small viruses. *Adv. Vir. Res.* **7**: 225-325.
- Kob, K. H., Song, E. K., Lee, S. Y., Park, Y. I., Park, W. M. (1992) Nucleotide sequence of cDNA of the Tobacco mosaic virus RNA isolated in Korea. *Nucleic Acids Res.* **20**: 5474-5474
- Koonin E. V. (1991) The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **72**: 2197-2206.
- Kunkel, L.O. (1947) Variation in phytopathogenic viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* **1**: 85-100.
- La Notte, P., Minafra, A., Saldarelli, P. (1997) A spot-PCR technique for the detection of phloem-limited grapevine viruses. *J. Virol. Methods* **66**: 103-108.
- Lachtermacher, M. B. R., Seuanez, H. N., Moser, H. W., Smith, K. D. (2000) One-step multiplex PCR strategy for identification of mutations by SSCP and DNA sequencing. *BioTechniques* **29** : 234-236.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T 4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lartey, R. T., Lane, L. C., Melcher, U. (1994) Electron microscopic and molecular characterization of turnip vein-clearing virus. *Arch. Virol.* **138**: 287-298.
- Lartey R. T., Voss T. C., Melcher U. K. (1995) Completion of a cDNA sequence from a tobamovirus pathogenic to crucifers. *Gene* **166**: 321-322.
- Lartey, R. T., Voss, T. C. Melcher, U. (1996) Tobamovirus evolution: Gene overlaps, recombination, and taxonomic implications. *Mol.Biol.Evol.* **13**: 1327-1338.

- Lebeurier G., Nicolaieff, A., Richards, K. E. (1977) Inside-out model for self-assembly of tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 149-153.
- Lee, C. W., Hilt, D. A., Jackwood, M. W. (2000) Redesign of primer and application of the reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism test to the DE072 strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, **44**: 650-654.
- Lesemann, D.-E., Winter, S. (1998) Detection and specific identification of tobamoviruses in horticultural crops by immunoelectron microscopical methods (IEM) and ELISA. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* **357**: 32
- Letschert, B. (1999) Differenzierung von Tospovirusisolationen auf Nukleinsäureebene, Diplomarbeit, Abteilung Pflanzenschutz, Universität Hamburg
- Letschert, B., Adam, G., Lesemann, D.-E., Willingmann, P., Heinze, C. (2002) Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *J. Virol. Methods* **106**:1-10.
- Lewandowski, D. J., Dawson, W. O. (2000) Functions of the 126-and 183-kDa proteins of Tobacco mosaic virus. *Virology* **271**: 90-98.
- Ma, J-F., Straub, T. M., Pepper, I. L., Gerba, C. P. (1994) Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4203-4206.
- Marck, C. (1988). DNA Strider: a "C" program for the fast analysis of DNA and Protein sequences on the Apple Macintosh family computers. *Nucleic Acids Res* **16**, 1829-1836
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., Collins, F. S. (1991) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1154.
- Mastari, J., Lapierre, H., Dessens, J. T. (1998) Asymmetrical distribution of Barley yellow dwarf virus PAV variants between host plant species. *Phytopathology* **88**: 818-821.
- McOrist, A. L., Jackson, M., Bird, A. R. (2002) Comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *J. Microbiol. Methods* **50**: 131-139.
- Menzel, W., Jelkman, W., Maiss, E. (2002) Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J. Virol. Methods* **9**: 81-92.
- Milne, R. G., Luisoni, E. (1975) Rapid high-resolution immune electron microscopy of plant viruses. *Virology* **68**: 270-274.

- Moore, N. J., Margolin, A. B. (1994) Efficacy of nucleic acid probes for detection of poliovirus in water disinfected by chlorine, chlorine dioxide, ozone, and UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **33** : 860-864.
- Nagy, P. D., Simon, A. E. (1997) New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* **235**: 1-9.
- Oberg, B., Philipson, L. (1972) Binding of histidine to tobacco mosaic virus RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**: 927-932.
- O'Halloran, F., Lynch, M., Cryan, B., Fanning, S. (2002) Application of restriction fragment length polymorphism analysis of VP7-encoding genes: fine comparison of Irish and global rotavirus isolates. *J Clin Microbiol.* **40**: 524-31.
- Ohno, T., Takamatsu, N., Meshi, T., Okada, Y., Nishiguchi, M., Kiho, Y. (1983) Single amino acid substitution in 30 K protein of TMV defective in virus transport function. *Virology* **131**: 255-258.
- Ohno, T., Aoyagi, M., Yamanashi, Y., Saito, H., Ikawa, S., Meshi, T., Okada, Y. (1984) Nucleotide sequence of the tobacco mosaic virus (tomato strain) genome and comparison with the common strain genome. *J. Biochem.* **96**: 1915-1923.
- Okada, Y. (1986) Molecular assembly of tobacco mosaic virus in vitro. *Adv. Biophys.* **22**: 95-149.
- Oshima, N., Ohashi, Y., Umekawa, M. (1974) Studies on some strains of tobacco mosaic virus pathogenic to crucifer plants. 2. Host range. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **40**: 243-251.
- Oshima, N., Harrison, S. D. (1975) Ribgrass mosaic virus. *CMI/AAB Description of Plant Viruses*, No. 152, Kew, England.
- Osman, T. A. M., Buck, K. W. (1997) The tobacco mosaic virus RNA polymerase complex contains a plant protein related to the RNA-binding subunit of yeast eIF-3. *J. Virol.* **71**: 6075-6082.
- Palukaitis, P., Zaitlin, M. (1986) Tobacco mosaic virus, infectivity and replication. In: M. H. V. van Regenmortel (ed) *The Plant Viruses*. Vol. 2, Plenum Press, New York and London: 105-131.
- Pappu, S. S., Brand, R., Pappu, H. R., Rybicki, E. P., Gough, K. H., Frenkel, M. J., Niblett, C. L. (1993) A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. *J. Virol. Methods* **41**: 9-20.

- Park, W. M., Kim, W. G., Ryu, K. H., Yoon, K. E., Kwak, B. H., So, I. S. (1990) Detection of odontoglossum ringspot virus and cymbidium mosaic virus from cultivated orchids by immunosorbent electron microscopy. *J. Korean Soc.Horticul. Sci.* **31**: 417-422.
- Paul, H. L.(1975) Odontoglossum ringspot virus. *CMI/AAB Description of Plant Viruses*, No. 155, Kew, England.
- Pearson, W. R. (1990). Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* **83**, 63-98
- Pleij, C. W. A., Rietveld, K., Bosch, L. (1985) A new principle of RNA folding based on pseudoknotting. *Nucleic Acids Res.***13**: 1717-1731.
- Poncarova Z., Kominek P. (1998) Restriction fragment length polymorphism differentiation of plum pox virus isolates. *Acta Virol.* **42**: 268-169.
- Powell Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., Beachy, R. N. (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232** : 738-743.
- Rast, A. T. B. (1982) Resistance of *Capsicum* species to tobacco, tomato and pepper strains of tobacco mosaic virus. *Neth. J. Plant Pathol.* **97**: 1-13.
- Rietveld, K., Linschooten, K., Pleij, C. W. A., Bosch, L. (1984) The three-dimensional folding of the tRNA-like structure of tobacco mosaic viurs RNA. *EMBO J.* **3**: 82-89.
- Rott, M. E., Jelkmann, W. (2001) Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaption of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**: 411-420.
- Rozanow M. N., Koonin E. V., Gorbalenya A. E. (1992) Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the "Sindbis-like" supergroup of positive-strand RNA viruses. *J.Gen. Virol.* **73**: 2129-2134.
- Ryu, K. H., Park. W. M. (1995) Rapid detection and identification of odontoglossum ringspot virus by polymerase chain reaction amplification. *FEMS Microbiol Lett.* **15**;133(3):265-9
- Saito, T., Watanabae, Y., Meshi, T., Okada, Y. (1986) Preparation of antibodies that react with the large non-structural proteins of tobacco mosaic virus by using *Escherichia coli* expressed fragments. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 82-89.
- Saito, T., Yamanaka, K., Okada, Y. (1990) Long-distance movement and viral assembly of tobacco mosaic virus mutants. *Virology* **176**: 11-20.
- Sambrook, J., Fritsch. E. F., Maniatis, F. (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

- Sameer, P. G., Lewandowski, D. J., Culver, J. N. (2001) Identification and Functional Analysis of an Interaction between Domains of the 126/183-kDa Replicase-Associated Proteins of Tobacco Mosaic Virus. *Virology* **282**: 320-328.
- Seoh, M. L., Wong, S. M., Zhang, L. (1998) Simultaneous TD/RT-PCR detection of cymbidium mosaic potexvirus and odontoglossum ringspot tobamovirus with a single pair of primers. *J. Virol. Methods* **72**: 197-204.
- Shimamoto I., Sonoda S., Vazuquez P., Minaka N., Nishiguchi M. (1998) Nucleotide sequence analysis of the 3' terminal region of a wasabi strain of crucifer tobamovirus genomic RNA: subgrouping of crucifer tobamoviruses. *Arch. Virol.* **143**: 1801-1813.
- Shukla, D.D., Ward C.W. (1989) Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Adv. Vir. Res.* **36**: 273-314.
- Silber, G., Burk, L. G. (1965) Infectivity of tobacco mosaic virus stored for fifty years in extracted unpreserved plant juice. *Nature* **206**: 740-741.
- Sleat D. E., Hull R., Turner P. C. , Wilson T. M. A. (1988) Studies on the mechanism of translational enhancement by the 5' leader sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Eur. J. Biochem.* **175**: 75-86.
- Smith, D. B., McAllister, J., Casino, C., Simmonds, P. (1997) Virus „quasispecies“: making a mountain out of a molehill? *J. Gen. Virol.* **78**: 1511-1519.
- Solis, I., Garcia-Arenal, F. (1990) The complete nucleotide sequence of the genomic RNA of the tobamovirus tobacco mild green mosaic virus. *Virology* **177**: 553-558.
- Spinardi, L., Mazars, R., Theillet, C. (1991) Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res.* **19**: 4009.
- Stanley, W. M. (1935) Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco mosaic virus. *Science* **81**: 644-645.
- Sulzinski, M. A., Gabard, K. A., Palukaitis, P., Zaitlin, M. (1985) Replication of tobacco mosaic virus. VIII. Characterization of a third subgenomic TMV RNA. *Virology* **145**, 132-140
- Talianski, M. E., Malysenko, S. I., Pshennikova, E. S., Kaplan, I. B., Ulanova, E. F., Atabekov, J. G., (1982) Plant virus-specific transport function. I. Virus genomic control required for systemic spread. *Virology* **122**, 318-326
- Tan, S.-H., Nishiguchi, M., Murata, M., Motoyoshi, F. (2000) The genome structure of kyuri green mottle mosaic tobamovirus and its comparison with that of cucumber green mottle mosaic tobamovirus. *Arch. Virol.* **145**: 1067-1079.

- Tenllado, F., Garcia-Luque, I., Serra, M. T., Diaz-Ruiz, J. R. (1994) Rapid detection and differentiation of tobamoviruses infecting L-resistant genotypes of pepper by RT-PCR and restriction analysis. *J. Virol. Methods* **47**: 165-174.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Towbin, H., Theophil, S., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4350-4354.
- Tsuda, S., Kirita, M., Watanabe, Y. (1998) Characterization of a pepper mild mottle tobamovirus strain capable of overcoming the L3 gene-mediated resistance, distinct from the resistance breaking Italian isolate. *Mol. Plant Microb. Interact.* **11**: 327-331.
- Tsugita, A., Gish, D. T., Young, J., Fraenkel-Conrat, H., Knight, C. A., Stanley W. M., (1960) The complete amino acid sequence of the protein of tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**: 1463-69.
- Tsugita, A. (1962) The proteins of mutants of TMV. Composition and structure of chemically evoked sequences. *J. Mol. Biol.* **5**: 284.
- Ugaki M., Tomiyama M., Kakutani T., Hidaka S., Kiguchi T., Nagata R., Sato T., Motoyoshi F., Nishiguchi M. (1991) The complete nucleotide sequence of cucumber green mottle mosaic virus (SH strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.* **72**: 1487-1495.
- van Belkum, A., Abrahams, J. P., Pleij, C. W. A., Bosch, L. (1985) Five pseudoknots are present at the 204 nucleotides long noncoding region of tobacco mosaic virus RNA. *Nucleic Acids Res.* **13**: 7673-7686.
- van der Hoek, L., Boom, R., Goudsmit, J., Snijders, F., Sol, C. J. (1995) Isolation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA from feces by a simple method and difference between HIV-1 subpopulations in feces and serum. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 581-588.
- van Regenmortel, M. H. V. (1975) Antigenic relationship between strains of tobacco mosaic virus. *Virology* **67**: 415-420.
- van Regenmortel, M.H.V. (1981) Tobamoviruses. In: E. Kurstak (ed) *Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis*. Elsevier/North-Holland: 541-564.
- van Regenmortel, M. H. V.(1986) Tobacco mosaic virus: antigenic structure. In: M. H. V. van Regenmortel, H. Fraenkel-Conrat (eds) *The plant viruses. 2. The rod-shaped plant viruses*. New York, Plenum Press: 79-104.

- van Regenmortel, M. H. V. (1990) Virus Species, a much overlooked but essential concept in virus classification. *Intervirology* **31**: 241-254.
- van Regenmortel, M. H. V. (1999) The antigenicity of tobacco mosaic virus. *Phil. Trans R. Soc. Lond. B.* **354**: 559-568.
- van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L. (Eds), (2000) Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press.
- Velasco, L., Janssen, D., Ruiz-Garcia, L., Segundo, E., Cuadrado, I. M. (2002) The complete nucleotide sequence and development of a differential assay for a pepper mild mottle virus (PMMoV) isolate that overcomes L3 resistance on pepper. *J. Virol. Methods* **106**: 135-140.
- Verhoeven, J. Th. J., Bouwen, I., Roenhorst, J. W. (1995) A new flower breaking tobamovirus of *Streptocarpus*. *Eur. J. Plant Pathol.* **101**: 311-318.
- Verwoerd, T. C., Dekker, B. M. M., Hockema, A. (1991) A small.scaled procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* **17**: 2362.
- Wang, H., Culver, J. N., Stubbs, G. R. T. (1997) Structure of ribgrass mosaic virus at 2.9 Å resolution: evolution and taxonomy of tobamoviruses. *J. Mol. Biol.* **269**: 769-779.
- Weber, K., Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.
- Weidemann, H. L., Maiss, E. (1996) Detection of the potato virus Y (PVY^{NTN}) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. *J. Plant Dis. Protec.* **103**: 337-345.
- Wetter, C. (1986) . Ribgrass mosaic virus. In: M. H. V. van Regenmortel, H. Fraenkel-Conrat (eds) The plant viruses. 2. The rod-shaped plant viruses. Plenum Press, New York: 221-232.
- Willment, J. A., Martin, D. P., Rybicki, E. P. (2001) Analysis of the diversity of African streak mastreviruses using PCR-generated RFLPs and partial sequence data. *J. Virol. Methods* **93**: 75-87.
- Wittmann, H. G., Hinnenbach, I., Wittmann-Liebold, B. (1969) Die primäre Proteinstruktur von Stämmen des Tabakmosaikvirus VI. Aminosäuresequenz (positionen 62-156) des Proteins des Takamosaikvirus Stammes Holmes ribgrass. *Z. Naturforsch. B.* **24**: 877-885.
- Wong, S. M., Chng, C. G., Lee, Y. H., Tan K., Zettler, F. W. (1994) Incidence of cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses and their significance in orchid cultivation in Singapore. *Crop Portect.* **13**: 235-239.

- Zaitlin, M. (1975): Tobacco Mosaic Virus (Type strain). *CMI/AAB Description of Plant Viruses*, No. 151, Kew, England.
- Zaitlin, M.. (1998) The Discovery of the Causal Agent of the Tobacco Mosaic Disease. In S. D. Kung und S. F. Yang (eds) *Plant Biology*. The World Publishing Co., Ltd. Hong Kong : 105 - 110
- Zaitlin, M. (1999) Elucidation of the genome organization of tobacco mosaic virus. *Phil. Trans R. Soc. Lond. B*. 354: 587-591.
- Zettler, F. W., Ko, N. J., Wisler, G. C., Elliot, M. S., Wong, S. M. (1990) Viruses of orchids and their control. *Plant Dis.* **74**: 621-626.
- Zhu, H., Hong, J., Ye, R., Chen, J., Yu, S., Adams, M. J., (2001) Sequence analysis shows that Ribgrass mosaic virus Shanghai isolate (RMV-Sh) is closely related to Youcai mosaic virus. *Arch. Virol.* **146**: 1231-1238.
- Zimmern, D. (1975) The 5'-end group of tobacco mosaic virus RNA is m⁷GpppGp. *Nucleic Acids Res.* **2**: 1189-1201.
- Zimmern, D., Wilson, T. M. A. (1976) Location of the origin for viral reassembly on tobacco mosaic virus RNA and its relation to stable fragments. *FEBS Lett.* **71**: 294-298.
- Zimmern, D. (1977) The nucleotide sequence at the origin for assembly on tobacco mosaic virus RNA. *Cell* **11**: 463-482.
- Zimmern, D. (1983). An extended secondary structure model for the TMV assembly origin, and its correlation with protection studies and an assembly defective mutant. *EMBO J.* **2**: 1901-1907.

7 Anhang 1

7.1.1 Tabelle der verwendeten Tobamovirusisolaten

Isolatbezeichnung und Beschreibung	Isolat Untersuchungen
	TMV
T 1 TMV-vulgare, eigene Sammlung Virusreinigung	RNA mit Silika, PCR mit den Primern bluni 1-2 fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP: gleiches Restriktionsmuster Sequenziert Vergleich mit EMBL: TMV
T 3 1960 – von DSMZ PV 107 TMV vulgare (von Lesemann schon gereinigtes Material) Vermehrung auf Samsun	RNA mit Silika, PCR mit den Primern bluni 1-2 fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP Sequenziert Vergleich mit EMBL: TMV
T 4 1870 – Le 97 –1076 TMV guter Reaktion Kreuzaler (von Lesemann schon gereinigtes Material) Vermehrung auf Samsun	RNA mit Silika, PCR mit den Primern bluni 1-2 fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP: 4 Klone TMV ein Klon noch nicht identifiziert jedoch kein TMV Sequenziert Vergleich mit EMBL: TMV
T 5 1373 – Le 95 –208 Surf. Ampel Leopold, TMV- M AB (von Lesemann schon gereinigtes Material) Vermehrung auf Samsun	RNA mit Silika, PCR mit den Primern bluni 1-2 fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP Restriktionsmuster entspricht TMV Sequenziert Vergleich mit EMBL: TMV
T6 TMV aus Bulgarien von Yankulowa	RNA mit Silika PCR mit den Primern bluni 1-2 Nicht kloniert RFLP von cDNA Restriktionsmuster entspricht T4
T7⇒ L5 1853– ToMV – (von Lesemann schon gereinigtes Material) Vermehrung auf Samsun	RNA mit Silika, PCR mit den Primern bluni 1-2 fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP Restriktionsmuster entspricht TMV Sequenziert Vergleich mit EMBL: TMV
T8 No. 2 aus Griechenland, aus der Gegend von Drama	RNA mit Silika PCR mit den Primern bluni 1-2 Nicht kloniert RFLP von cDNA Restriktionsmuster: TMV
T9 No. 3 aus Griechenland, Aus der Gegend von Serres	RNA mit Silika PCR mit den Primern bluni 1-2 Nicht kloniert RFLP von cDNA Restriktionsmuster: TMV
T10 No. 4 aus Griechenland, aus der Gegend von Drama	RNA mit Silika PCR mit den Primern bluni 1-2 Nicht kloniert RFLP von cDNA Restriktionsmuster: TMV
T11 No. 5 aus Griechenland, aus der Gegend von Drama	RNA mit Silika PCR mit den Primern bluni 1-2 Nicht kloniert RFLP von cDNA Restriktionsmuster: TMV
T12 No. 6 aus Griechenland, aus der Gegend von Karditsa	RNA mit Silika PCR mit den Primern bluni 1-2 RFLP von cDNA Restriktionsmuster: TMV
T13 No. 7 aus Griechenland, aus der Gegend von Drama	RNA mit Silika PCR mit den Primern bluni 1-2 RFLP von cDNA Restriktionsmuster: TMV
T14 No. 8 aus Griechenland, aus der Gegend von Drama	RNA mit Silika PCR mit den Primern bluni 1-2 RFLP von cDNA Restriktionsmuster: TMV
T15 No. 9 aus Griechenland, aus der Gegend von Xanthi	RNA mit Silika PCR mit den Primern bluni 1-2 RFLP von cDNA Restriktionsmuster: TMV
	OHIO
Ohio III von DSMZ PV- 0171 TMV-O-III	RNA mit Silika PCR mit den Primern bluni 1-2 RFLP von cDNA Restriktionsmuster: Ohio II = Ohio V
Ohio V von DSMZ PV- 0171 TMV-O-V Virusreinigung	RNA mit Silika, PCR mit den Primern bluni 1-2 fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP: gleiches Restriktionsmuster Sequenziert Vergleich mit EMBL: TMV

Isolatbezeichnung und Beschreibung	Isolat Untersuchungen
	ToMV
L1 437-ToMV-1 v. Vetten statt 438 (von Lesemann schon gereinigtes Material)	RNA mit Silika, PCR mit den Primern Bluni I-II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP: Restriktionsmuster gleich Sequenziert Vergleich mit EMBL: ToMV
L2 2181 – DSMZ PV 0135 ToMV statt 1700 (von Lesemann schon gereinigtes Material)	RNA mit Silika, PCR mit den Primern Bluni I-II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP: Restriktionsmuster gleich Sequenziert Vergleich mit EMBL: ToMV
L3 440– ToMV – (von Lesemann schon gereinigtes Material)	RNA mit Silika, PCR mit den Primern Bluni I-II kloniert, vier Klone getestet: RFLP ToMV
L7 ToMV aus Italien (IFA 9)	Virusreinigung PCR mit den Primern Bluni I-II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP: Restriktionsmuster gleich ToMV
L 8 als ToMV I (Virusreinigung) von Dimitrova aus Bulgarien erhalten	RNA mit Silika, PCR mit den Primern Bluni I-II mit spezies-spezifischen Primern von cDNA getestet: ToMV
L9 ⇒ O 1 als ORSV (PV-127) von der DSMZ erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern Bluni I-II und Tobamo I Bluni II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP: Restriktionsmuster gleich ToMV sequenziert, 98% Homologie zu L1
L10 ⇒ O 5 als ORSV von P. Roggero (IFA 89) aus Italien erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern Bluni I-II und Tobamo I Bluni II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP: Restriktionsmuster gleich ToMV
L11 ⇒ O 6 als ORSV (93/1590) von Gerhard Pietersen aus Süd-Afrika erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern Bluni I-II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP: Restriktionsmuster gleich ToMV
L12 ⇒ O 4 als ORSV (PV-472) von DSMZ erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern Bluni I-II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP: Restriktionsmuster gleich ToMV von einer Seite ansequenziert ToMV
L13 als ToMV II (Virusreinigung) von Dimitrova aus Bulgarien erhalten	PCR mit den Primern Bluni I-II mit spezies-spezifischen Primern von cDNA getestet ToMV
L14 als ToMV III (Virusreinigung) von Dimitrova aus Bulgarien erhalten	PCR mit den Primern Bluni I-II RFLP direkt von cDNA: ToMV
	TMGMV
M1 als TMGMV von der DSMZ (PV-110) erhalten	RNA mit Silika, PCR mit den Primern Bluni I-II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP: Restriktionsmuster gleich von einer Seite ansequenziert TMGMV
M2 als TMGMV von der DSMZ (PV-112) erhalten	RNA mit Silika, PCR mit den Primern Bluni I-II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP alle verhielten sich gleich TMGMV von einer Seite ansequenziert TMGMV , 100% Homologie zu M1
M4 als TMGMV von der DSMZ (PV-118) erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern Bluni I-II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP alle verhielten sich gleich TMGMV von einer Seite ansequenziert TMGMV , 96% Homologie zu M1
M5 als TMGMV von der DSMZ (PV-120) erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern Tobamo I-II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP alle verhielten sich gleich TMGMV
M8⇒ O 3 als ORSV (PV-131) von DSMZ erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern Bluni I-II, Tobamo I-Bluni II, Tobamo I-II Ein Klon TMGMV
M9 ⇒ P1 als PMMV von der DSMZ (PV-163) erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern Bluni I-II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP vier Klone TMGMV ein Klon PMMV wahrscheinlich Gemisch; PCR von c-DNA spaltete wie TMGMV
M 10 ⇒ R11 von Lesemann als RMV erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern Bluni I-II RFLP direkt von cDNA: TMGMV

Isolatbezeichnung und Beschreibung	Isolat Untersuchungen
	TMGMV
P 1 als PMMV von der DSMZ (PV-163) erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern Bluni I-II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP: 4 Klone TMGMV 1 Klon PMMV PCR von der C-DNA Restriktionsmuster: TMGMV
P 2 als PMMV von der DSMZ (PV-164) erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern Tobamo I-II und TobamoI- Bluni II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP alle verhielten sich gleich PMMV von einer Seite ansequenziert PMMV
P3 als PMMV von der DSMZ (PV-163) erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern: Bluni I-II fünf Klone getestet mit Hilfe der RFLP: PMMV
P 4 als PMMV (PV-166) von der DSMZ erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern: Bluni I-II ein Klon getestet: das Restriktionsmuster entspricht PMMV
P5 als PMMV von der DSMZ (PV-164) erhalten	Virusreinigung nested PCR von TobamoI-II mit den Primern Bluni I-II PCR von c-DNA Restriktionsmuster: PMMV zwei Klone getestet mit Hilfe der RFLP: PMMV
P6 als PMMV von P. Roggero aus Italien erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern: Tobamo I- Bluni II drei Klone getestet: das Restriktionsmuster entspricht PMMV
P7 als PMMV von P. Roggero (P 91) aus Italien erhalten (should be a PMMV1.2 isolate from pepper, collected in Liguria in 1996)	Virusreinigung PCR mit den Primern: Tobamo I- Bluni II das Restriktionsmuster von cDNA entspricht PMMV sequenziert
P8 als PMMV (P 169) aus Italien von P. Roggero erhalten (PMMV1.2.3, from pepper, Lombardia, identified by pepper differentials as above	Virusreinigung PCR mit den Primern: Tobamo I-II und Bluni I-II Nicht kloniert RFLP von nested PCR: Restriktionsmuster PMMV
	ORSV
O 2 von der DSMZ (PV-130) als ORSV erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern: Bluni I-II (Doppelbande) Kloniert sequenziert: ORSV
O4 von der DSMZ (PV-472) als ORSV erhalten	Silika PCR mit den Primern: TobamoI-II und davon nested PCR mit den Primern Bluni I-II RFLP von nested PCR: ORSV
O7 als ORSV von Lesemann erhalten (Kons. 1422 Le 95-10 auf <i>Cymbidium</i> von Kuntze)	Virusreinigung PCR mit den Primern: Bluni I-II (Doppelbande) mit speziesspezifischen Primern getestet direkt von cDNA: ORSV
O8 als ORSV von Lesemann erhalten (Kons. 2243a ORSV aus <i>Phalenopsis</i> 108 aus Kons. 281c auf <i>N. bentha</i>)	Virusreinigung PCR mit den Primern: Bluni I-II (Doppelbande) Kloniert sequenziert ORSV
O9 als ORSV von Lesemann erhalten (Kons. 1974 Le 98-462 von <i>Phalenopsis</i> auf <i>N. bentha</i>)	Virusreinigung PCR mit den Primern: Bluni I-II (Doppelbande) mit speziesspezifischen Primern getestet direkt von cDNA: ORSV kloniert
O10 als ORSV von Lesemann erhalten (Kons. 2162 auf <i>Chenopodium</i> <i>quinoa</i> Le 98-745 Orchidee <i>Barkeria</i>)	Virusreinigung PCR mit den Primern: Bluni I-II (Doppelbande) mit speziesspezifischen Primern getestet direkt von cDNA: ORSV kloniert und sequenziert
O12 als ORSV von Lesemann erhalten (Kons. 853 von Prof. König auf <i>N.</i> <i>benth</i>)	Virusreinigung PCR mit den Primern: Bluni I-II (Doppelbande) mit speziesspezifischen Primern getestet direkt von cDNA: ORSV kloniert und sequenziert
O13 als ORSV von Lesemann erhalten (Kons. 855 auf <i>N. benth</i> von <i>Masdevalia vierana</i> 3 von R. König)	Virusreinigung PCR mit den Primern: Bluni I-II (Doppelbande) ORSV

Isolatbezeichnung und Beschreibung	Isolat Untersuchungen
	TVCV
R 3 Als RMV von der DSMZ (PV-147) erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern: Tobamo I-II Sequenziert Aminosäuresequenz 98% homolog zu U03387 Der Primer Tobamo I war in der Lage zweimal zu binden
R 4 Als RMV von der DSMZ (PV-148) erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern: Tobamo I-II Sequenziert: Aminosäuresequenz 98% homolog zu U03387 Der Primer Tobamo I war in der Lage zweimal zu binden
R22 Als Original Holmes Ribgrass von Hamacher aus Bonn (HRV) erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern: Bluni I –RMV cluster PCR mit nur einem Primer Tobamo I Kloniert ein Klon getestet: das Restriktionsmuster entspricht TVCV
R25 Als RMV von Lesemann (LE 01-908 Abreib. v. Original-Tabak auf chen. Quin. v. Katis /Griechenland) erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern: Bluni I –RMV cluster PCR mit nur einem Primer Tobamo I Kloniert vier Klone getestet: das Restriktionsmuster entspricht TVCV
R 5 Als RMV von der DSMZ (PV-151) erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern: Bluni I –RMV cluster / HRV coat hin- HRV coat rück PCR mit nur einem Primer Tobamo I kloniert sequenziert 95 % Homologie zu U03387: TVCV ein Klon getestet: das Restriktionsmuster entspricht TVCV
	ORMV
R 21 als RMV von Lesemann erhalten (Kons.1640 Le 96-764 auf N. bentha Tobamo von Krczal)	Virusreinigung PCR mit den Primern: blunil-RMV cluster das Restriktionsmuster von cDNA entspricht ORMV
R23 als RMV (NGI) von Hamacher aus Bonn erhalten (Isolat stammt aus Neuguinea)	Virusreinigung PCR mit den Primern: TobamoI -RMV cluster/ Bluni I – TVCV OSR mit speziesspezifischen Primern getestet direkt von cDNA: RMV kloniert und sequenziert 98 % Homologie zu NC 2792 zwei Klone getestet: das Restriktionsmuster entspricht ORMV
R9 als RMV von Lesemann erhalten (Kons.1646 Le 96-696 RiMV auf N. benthaminan von Impatiens, Hamacher)	Virusreinigung PCR mit den Primern: blunil-RMV cluster / HRV coat hin- HRV coat rück das Restriktionsmuster von cDNA entspricht ORMV
R19 als RMV von Lesemann erhalten (Kons.1565 Le 96-91 Tobamo von Impatiens auf N. bentha)	Virusreinigung PCR mit den Primern: TobamoI -RMV cluster schwache Bande sequenziert: 98 % Homologie zu Chloroplasten DNA PCR mit den Primern: HRV coat hin – HRV coat rück fünf Klone getestet: das Restriktionsmuster entspricht ORMV sequenziert: ORMV
	RMV
R7: Als RMV von Lesemann (Kons.1494 Le 96-217 von Plantago/ Dalchow) erhalten	Virusreinigung PCR mit den Primern: Blunil-RMV cluster / HRV coat hin – HRV coat rück RFLP entspricht R12
R12: Als RMV von Lesemann erhalten (Kons.1493 Le 96-216 von Plantago/ Dalchow RiMV)	Virusreinigung PCR mit den Primern: TobamoI-RMV cluster / HRV coat hin – HRV coat rück mit speziesspezifischen Primern getestet direkt von c-DNA: RMV kloniert und sequenziert
R14: Als RMV von Lesemann erhalten (Kons.1105 Wegerich/ Königin auf <i>Chen. quinoa</i>)	Virusreinigung mit speziesspezifischen Primern getestet direkt von c-DNA: RMV PCR mit den Primern: blunil-RMV cluster ein Klon getestet: das Restriktionsmuster entspricht R17 und R18
R17: Als RMV von Lesemann erhalten (Kons.1978 v. Streptocarpus auf N. bentha. Aus Konserve 1106 v. Krebs)	Virusreinigung PCR mit den Primern: TobamoI-RMV cluster / Bluni I – RMV-cluster / HRV-coat-hin – HRV-coat-rück kloniert und sequenziert RFLP von PCR mit dem Primerpaar Bluni I – RMV-cluster gleiches Muster wie R14 und R18
R18: Als RMV von Lesemann erhalten (Kons.165 Lilie Beutnagel auf Samsun 2/42)	Virusreinigung PCR mit den Primern: TobamoI -RMV cluster / Bluni I – RMV cluster ein Klon getestet: das Restriktionsmuster entspricht R14

T =TMV, P=PMMV, L=ToMV, O=ORSV, M=TMGMV, C=CGMV, R=Isoate der cruciferen Untergruppe. Silika bedeutet, daß cDNA aus einer Gesamt-Nukleinsäurepräparation mit dem Glasmilchverfahren hergestellt wurde. Virusreinigung bedeutet, daß cDNA/PCR aus einer Virusreinigung mit anschließender RNA-Extraktion gewonnen wurde.

Anhang 2

Als DNA-Sequenz dargestellte Nukleinsäuresequenz von SFBV und die Aminosäuresequenz der vier offenen Leserahmen. Die Startkodons und Stoppkodons sind grau hinterlegt

CACCAACAACAACAACATAACACAACAAACAACAACAAATGTCACACACACAATCAACAATCAATACCAAGTTTGTGAGGCCGGTATGGGC
M S H T Q S T I N T K F V E A G M G

AGAAACGCCCTCGTCAACGATCTTGCAACACGAGCCGTTTATGACAAGATGGCTAGTGAAATGCAACTACGTGCTAGACGCCCAAAAATCAAC
R N A L V N D L A T R A V Y D K M A S E M Q L R A R R P K I N

TTCTCGAAAGCAGTGAATCAGGAACAAACACTGCTGGCAATGAATGCATATCCCGAGTTTGAGATCACCTTCGTAGGGAACCAAAACGCGGTC
F S K A V N Q E Q T L L A M N A Y P E F E I T F V G N Q N A V

CACTCGCTTGCGGGTGGGCTTCGTGCTTTGGAACCTCGAATATATGATGACACTTGTTCCTTACGGGCACGTCACTACGACATGGTGAAAT
H S L A G G L R A L E L E Y M M T L V P Y G H V T Y D I G G N

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

GACTCAATCATGAACTATTCTGCAAAGCTCGAAAGCCAACAACGAGTGATTCCAAAGTTTCAGCTGGAAGCTTTCATAAGTATGCAAATAAT
D S I M N Y S A K L E S Q Q R V I P K F Q L E A F N K Y A N N

CCTCGTTCCGTCGTCTGTAACAACACTTTCCAAACATGTGAATTCGAGCCTTCTGCTGAGCGTGTATACGCAGTTGCACTCCACAGTATATAC
P R S V V C N N T F Q T C E F E P S A E R V Y A V A L H S I Y

GATATTCCTGTCGATGAGTTCGGTGCAGCCTTACTCAGAAAGAATGTGCATAAATGCTTCGCAGCCTTCCACTGTTCCGAGAAATCTTCTCCTG
D I P V D E F G A A L L R K N V H K C F A A F H C S E N L L L

GAAGTCGATAGTTGCAATCTAGAGGAAATCGGCGCTTCTTTTGTCCGCAACAACGATAATTTGTCTTTTCTTTCATGGTGAGAGTACTCTT
E V D S C N L E E I G A S F V R N N D N L S F F F H G E S T L

AATTATTCGCATTCGTATAGAAATGTTATTAAGTACGTGTGTAACCTTTTTTCCCGCATCTAATAGATATGTTTATCATAAGGAGTTTATG
N c Y S H S Y R N V I K Y V C K T F F P A S N R Y V Y H K E F M

GTTACTCGTGTAAATACGTGGTCTGTAGTTTTACTAAGGTTGATACTTATGTGCTTTTCCGCGGTGTTTATAGAACAGATGTTGATTCGGAA
V T R V N T W F C S F T K V D T Y V L F R G V Y R T D V D S E

CAATTTTATCAATCGATGGACGAAGCCTGGGAGTACAAGAAGAGTTTAGCAATGCTAAATAGTGAGCGAACCATTTCTGAAAGACAGCTCAGCT
Q F Y Q S M D E A W E Y K K S L A M L N S E R T I L K D S S A

GTCAATTATTGGTTTCCAAAGGTGAAGGATATGGTCATCATACTCTTTTCCATGGTCTTTTAGCATCTGGAAGACGAAACGAACAGAGGTC
V N Y W F P K V K D M V I I P L F H G S L A S G K T K R T E V

ATGGTAGACAGGGACTTTGTTTATACTGTTCTTAATCACATAAGGACATATCAAGCGAAGGCTCTGACTTACCAAAATGTTTTATCCTTTGTG
M V D R D F V Y T V L N H I R T Y Q A K A L T Y Q N V L S F V

GAGTCTATTCCGGCTCGTGTGATTCTCAATGGAACAACCTGCCAGGTGGAACCTGGGACGTTGATAAAGGAAACCTCCAAGCACTTGCTATGACT
E S I R A R V I L N G T T A R S N W D V D K G N L Q A L A M T

TTTTTCTTGCAAACATAAATGGCAGCTGCTCAAGATGAACTGGTTACGGCGAAGTTTLAGAACATTTGATCAATCGGTGAAAGAATTACTGTGG
F F L Q T K L A A A Q D E L V T A K F R T F D Q S V K E L L W

CAGCGTGTTCAGATTTTTTCGGGGATGTTTTCCCTCTGTGAAGGACAACTTACGGCACATGGGTTGATTAAGATCTCAGAAAAGGAACTT
Q R V S D F F G D V F P S V K D K L T A H G L I K I S E K E L

GAAATCAAAGTTCAGATTTGTACGTCAGCTTTGTGGACAGATTAGTTTCTGAGTACAAAGCTTCTGAAGAATTAGCGGATTTGGATCTGACA
E I K V P D L Y V S F V D R L V S E Y K A S E E L A D L D L T

AAACCGCTCGAAAAGCTGAAAAATTTACAAGGCACTATCTGAGTTGTCCATTCTTAAGGACTCTAGCGAATTTGATGTTGAAGAGTTCAAA
K P L E K A E K F Y K A L S E L S I L K D S S E F D V E E F K

ACTTTTTGCAACGAGAAAGACGTTGACCCGGAAGTGGTAGCGAAGTTTTGGTGGCTGTGGCGGAAGGTCAACTGACTCTTCCGTATGAGAAA
T F C N E K D V D P E V V A K V L V A V A E G Q L T L P Y E K

CCAACACCTGCAAGTGTGTCTGATGCACTTGCTCCGGAAGATACATGAAGATGAAGAAGAAATCTCCTCGTAGGGAACACGGATGAGTTCCCC
P T P A S V S D A L A P K I H E D E E E I L L V G N T D E F P

AGGCTCAAAGAGATCGATTCGGTTACTCTCCCGCTTGCCGGGATATCTGGAACATAACGGGGTTTTTCACCGCGTCATCCTTTCATTTGTTA
R L K E I D S V T L P L A G I S G T K R G F S P A S S F H L L

CCCGTGAAGATTTTAGGAAGAATATGTTATCAGTCGTGTACACTGGTTCGCTGAAAGTTCAACAAATGAAGAACTATGTTGATTACTTATCA
P V E D F R K N M L S V V Y T G S L K V Q Q M K N Y V D Y L S

GCCTCCGTGTGGCCACTGTTTCTAATCTCTCTAGGTTGTTAAACGACACAATTGGTATGGACAACGATGTCAGGGAAAAGGCTGGTGTTTTT
A S V S A T V S N L S R L L N D T I G M D N D V R E K A G V F

GATGTCCGTTCCGGTAAATGGTTGATTACTCCGACAGGGAAATTACATGCTTGGGGTGTGGTTGAGTTTTTTGGATAGAAAAGAAGAATTGTT
D V R S G K W L I T P T G K L H A W G V V E F L D R K K R I V

CTACTTGATTGGACTTGTGATTCTGTTCCTACATGTCAACCTGATTGGGTCCGACTCGCTGTTTCAACGGACACGTTGATATACTCGGACTTA
L L D W T C D S V P T C Q P D W V R L A V S T D T L I Y S D L

GCAAACTTCAAATTTGCGAGGGAGCTTACGTGATGGAGAACCGACTGAACCGAAAAGCAAAAATAATTCTGGTTGATGGTGTGCCTGGTTGT
A K L Q N L R G S L R D G E P T E P K A K I I L V D G V P G G

GGGAAAACAAAGGAGATCTTAGAGAGGTGCGACTTCACAAAGGACTTGATTCTCGTCCCTGGTAAGGAAGCTTCAAAGATGATAATCAAACGT
C K T K E I L E R C D F T K D L I L V P G K E A S K M I I K R

GCAATGCTGGGGGAAAAATCGTGCAATCAAGATAATGTAAGGACGGTCGATTCCCTTCTTATACATATGAAGGGACGCAAGTTAAGAGG
A N A G G K N R A N Q D N V R T V D S F L I H M K G T Q V K R

CTTTTCATCGATGAAGGTCTGATGCTTCACACTGGTGCCTGAATTTCTTAGCACTTTTTTTCACATTGTGAAGAGTTTTTAGTGTACGGTGAC
L F I D E G L M L H T G C V N F L A L F S H C E E V L V Y G D

ACACATCAAATCCCGTTCATTAACAGAGTTGCGAATTTTCCGTATCCATCACATTTTCGCGCAACTACAGTACGATTCCGGTAGAAAAGAGAAGA
T H Q I P F I N R V A N F P Y P S H F A Q L Q Y D S V E K R R

GTGACGTTGAGGTGTCCAGCAGATGTAACGCATCATTTGAACAGTCAATACGACGGGAAAGTAATGTGTACTAGTTCAATTCTTAGGTCTGTA
V T L R C P A D V T H H L N S Q Y D G K V M C T S S I L R S V

GAATGTGAAGTAGTTAGAGGTAAGCTGTGTTAAATCCAAAACCAAACCCCTTTCAGGGAAGATAATTACTTTTACGCAGTCCGATAAGTTA
E C E V V R G K A V L N P K T K P L S G K I I T F T Q S D K L

GAGTTACAAAATAAGGGTTACGGTGAGGTAGATGTTTTTAGACGTAAATACTGTTTCATGAAATTCAGGAGAGACATATGAGCATGTTTCTTGG

Anhang

E L Q N K G Y G E V D V L D V N T V H E I Q G E T Y E H V S L
GTTAGGCTTACGCCTACACCGTTGGAGATTGTCTCACATGGATCTCCTCACGTTCTTGTGCTTTAACTAGACATACGCAGAGTTTAAAGTAC
V R L T P T P L E I V S H G S P H V L V A L T R H T Q S L K Y
TATACTGTTGTTGGGATCCTGTCGTTAAGGTCATTTAGGTTAAATTATCAAACCTTATTTTAGATATGTATAAAGTCGAAAAAGGG
Y T V V W D P V V K V I S D L G K L S N F I L D M Y K V E K G
ACTCAATAGCAATTACAGATAGAGAGTGTCTTCAAGGGTTCGAATTTATTCGTTCCAGCAGCAAAGAGTGGAGATCCTATGGATCTTCAATTT
T Q * Q L Q I E S V F K G S N L F V P A A K S G D P M D L Q F
TACTATGATACTCTCTTACCTGGTAATAGTACTATTTTGAATAATTTTGATGCTGTTTCTATGGTTCTTAGTGATAATAGTTTGAATGTTAGA
Y Y D T L L P G N S T I L N N F D A V S M V L S D N S L N V R
GATTGTGTTATAGATTTTCTAAGTCGGTCCGGTGCCTCGAACTGTTGCTTCAAGGAATCTTAGTTCCTGTTTGGAGACAGCTGCAGAA
D C V I D F S K S V P V P R T V A S K E F L V P V L R T A A E
AGACCCAGAACACCGGTCTTCTTGAGAACTTGGTCGCGATGATTAAGGAACCTCAATGCCCCGGATCTGACGGGTGTCATTGACATTGAA
R P R T P G L L E N L V A M I K R N F N A P D L T G V I D I E
CAAACAGCGGGTTACGCCGAGAAAAGTTTTGGGAAGCATTATACTTCCGGAGTTTTTCAGGTGGGACTTCAGGAATGTTGACAACGGACATG
Q T A G Y A A E K F W E A F I L P E F S G G T S G M L T T D M
GTACACAGGTGGTTGGCAAAGCAAGACGAGGCGACAATAGGACAATTGGCCAACTTTGACTATGTAGATTTGCCAGAAAATTAGTGCTTACAAG
V H R W L A K Q D E A T I G Q L A N F D Y V D L P E I S A Y K
CACATGATTAAGACTCAACCCAAACAAAAGTTGGATTTAAGTATCCAAGATGAGTATCCTGCGCTGCAAACGATTGTTTATCATTCTAAGCAA
H M I K T Q P K Q K L D L S I Q D E Y P A L Q T I V Y H S K Q
ATCAACGCAATTTTCGGTCCGATGTTTTTCAGAGTTAACTAGACAGTTGCTTGAGAGAATTGATGGGAGTAGATTTTGTTTTATACAAGAAAA
I N A I F G P M F S E L T R Q L L E R I D G S R F L F Y T R K
ACTCCGTCTCAAATTAAGATTTCTTTTCTGATCTCAATGCGAATGAAGCCATGGACATTTTAGAGCTCGATATATCCAAATATGACAAATCACAA
T P S Q I E D F F S D L N A N E A M D I L E L D I S K Y D K S Q
GGTGAATTTTCAATGCGCGGTTCGAGTACAAAAATTTGGGAGCTCTTGGGAATCGACGCTACTTGGGAAGAAGTGTGGAAGCGAGGACACATGAGA
G E F H C A V E Y K I W E L L G I D A Y L E E V W K R G H M R
ACATCGCTCAAAGATTACACTGCAGGAATCAAGACCGTTTTTGTGGTATCAGAGGAAGAGCGGTGATGTAACGACATTCATTGGAAACACGATA
T S L K D Y T A G I K T V L W Y Q R K S G D V T T F I G N T I
ATCATAGCAGCTTGTTTAGCAACTTTGGTACCAATGGATAGAGTGAATAAGCTGCATTTTGTGGAGACGACAGTATCATATATTTGCCCAA
I I A A C L A T L V P M D R V I K A A F C G D D S I I Y L P K
GGATTGGACTTACCTGATATACAGATTGGGGCAAATTTGATGTGGAATTTTGGGCCAAATTTGTTAGAAAAACTATGGTTATTTCTGTGGT
G L D L P D I Q I G A N L M W N F E A K L F R K N Y G Y F C G
AGGTATATTATACATCATGATAGGGGTGCTATTGTATATTATGATCCTTTAAAGTTAATATCTAAATTAGGTTGTAACATATTAAGGATTTTC
R Y I I H H D R G A I V Y Y D P L K L I S K L G C K H I K D F
GAGCATTTAGAGGAGTTTCGTATTTCTTTGAGTGATGTTTGTCTGCTTTGAGTAACTGTGCTTATTTTGGTCAGTTGAATGATGCAATTGCT
E H L E E F R I S L S D V C S S L S N C A Y F G Q L N D A I A

Anhang

GAGGTATATCCTACCGCAGTAAATGGGTCGTTTGTCTTTTGTGTATTTCTAAGTTTTTGTCTGATAAGACTTTGTTTCGTCGTTTGTTTTAA
E V Y P T A V N G S F A F C C I S K F L S D K T L F R R L F L

GATGGCAATAGTTCTTTCTAAAGCCAAAGGTGAGTGAGTTCCTTAACCTTACAAAGGCCGAGGAAATCTTCCGAAGTTTTTAACTAGATTGAA
D G N S S F *
M A I V L S K P K V S E F L N L T K A E E I L P K F L T R L K

GACTGTTGCCATTTCTACGAGAGACGTAGTTTCCGTTAAGGGAACAACGGATCTAGTGGATATAGATCTCTTACGTGATGTTCCCGTAAATAA
T V A I S T R D V V S V K G T T D L V D I D L L R D V P V N N

TTGGCGTTACGTTGGTATTGTGGGTATTGTTGCGTCCGAGAGTGGTTGTTACCGGACAATGTTTCTGGTGGTGTAGCTATTAGTTTTGTGGA
W R Y V G I V G I V A S G E W L L P D N V S G G V A I S F V D

TAAGCGTCTTGTGATTCTCGTGAGGCTATACTAGGTACGTATAGAGCGGCGCGTGCAGAAACGGTTCCAATTTAAATTAATTCCTAATTA
K R L V D S R E A I L G T Y R A A A V E K R F Q F K L I P N Y

CTTTGTGTCCCAAGAGGATGCTCTTAGGAGACCCTGGCAAGTCCAGGTTTCGTTAAAGGGATTAAAATTCGAAGAAGGGTTCTCACCGCTTAC
F V S Q E D A L R R P W Q V Q V S L K G L K F E E G F S P L T

GCTTGAGTTTTGTTTCTGTTGTCGTTTGTGCTAATAGTGTGGTTACTAAGGGTTTGCCTGAAAGGCTTAATAATGTGGGAGATCCAAATGTTGA
L E F V S V V V C A N S V V T K G L R E R L N N V G D P N V E

AGTTTCAGAAGTTGCTGTTAATGAGTTCATCGACTCGATTTCCGCTTACAGTCGTTAAGCCGTGCTCGTAATAAATACGTTTCGTGGTAAATGG
V S E V A V N E F I D S I S A S Q S L S R A R N K Y V R G N G

TAAGGTTGGGAATAATAGTGGTGGTTTTAGTAAGTATAATCGTCATCAGCCGAGAGGTTCCGCGCAAGGCTATGTATAATTCATAAAATGT
K V G N N S G G F S K Y N R H Q P E R F A G K A M Y N S K N V

CGTACGTGGTGGTACTTCCGAACCAACTGCAATTCCTCACAAACGCATGGGCGGATCCAATTCAAATTCGAATCTTTGTTTCAGCGTCGCTGA
V R G G T S E P T A I L H K R M G G S N S I D E S L F S V A E
M N L C S A S L

GTCAGATCTTTCAGACTCAGGCTGCGCGTCATGTCAGTGCCTGAGCAGTTTGGCAACACTCTCAGGAGTGGTTGTCACACAGACAACGAGGTTCC
S D L S D S G C A *
S Q I F Q T Q A A R D A V R E Q F G N T L R S V V T Q T T R F

CAGAAGCAGGTTCCAAAGTGTACATAAATGACGCGGCACTGAAGCCGCTTTGGGAAAATTTACTTAAGTCCCTTGACACCAAGAATAGAATTG
P E A G F Q V Y I N D A A L K P L W E N L L K S F D T K N R I

TTGAGACAGAGGAAGAGACTCGCCCTTCAACAGCAGAAGTGTAAACGCAACGCAGCGTGTGATGATTCAACAACACTGCAATTCGTGGAGCAC
V E T E E E T R P S T A E V L N A T Q R V D D S T T A I R G A

TACAGAGGCTTTCTGATGAGCTTAATAGAGGTTCTGGCTATATGAACAGAACTTCTTTTGGAGACTATATTGCTGTGGTCTGCTGCCACTGCAA
L Q R L S D E L N R G S G Y M N R T S F E T I L L W S A A T A

AATAGTGGTGCATACTATAATGCATAGTGTATTTATCCTCCACTTAAATCGAAGGATAGTGTCTTCTCTACTTGAAGGAAGTTCTGTGGGTGAA
K *

CTGGCTACACAACCGGAAGGATGTGTAGTTCTACAGAGTATAAACAGGGGTTTAAAGTCCCTTTAGTGGTGCATACTATAATG

Anhang 3

	T1	T3	T4	T5	T7	X68110	Ohio V	L1	L2	L9	L12
T1	----										
T3	99	----									
T4	99	99	----								
T5	99	98	98	----							
T7	99	98	98	99	----						
X68110	99	99	99	98	98	----					
Ohio	95	94	95	94	94	94	----				
L1	83	82	82	82	83	82	81	----			
L2	82	81	81	81	82	81	79	98			
L9	83	82	82	82	83	82	81	99	99	----	
L12	83	82	82	82	83	82	81	99	99	100	0 ---
X02144	83	82	82	82	83	84	81	99	98	99	99
M1	70	69	70	69	70	69	69	70	68	69	70
M2	70	70	70	70	70	70	70	70	68	70	70
M5	70	70	70	70	71	70	70	70	68	70	70
M34077	70	70	70	70	70	71	70	70	68	70	70
P1	69	69	69	69	69	69	70	70	70	70	70
P5	69	69	69	69	69	68	69	70	70	70	70
P6	71	71	71	71	71	70	72	72	72	72	72
P7	72	72	72	71	72	71	73	73	73	73	73
PMMVI	71	71	71	71	71	72	72	72	72	72	72
PMMVS	70	70	70	70	70	71	71	72	72	72	72
O8	70	70	70	70	71	70	70	72	71	72	73
O10	70	70	70	70	71	70	70	72	71	73	73
O12	71	70	71	71	71	70	71	73	72	73	73
X82130	69	68	69	69	70	68	69	71	70	71	71
C4	37	36	37	37	37	36	35	35	35	35	35
D12505	36	35	37	36	36	36	35	35	34	34	34
CFMMV	35	35	34	34	35	34	33	31	32	31	31
R3	48	48	48	47	48	47	45	50	50	49	49
R22	47	47	47	47	47	47	44	49	49	48	48
U03387	48	48	48	47	48	48	44	49	49	48	48
R19	43	43	43	42	43	43	42	47	47	46	46
R12	47	47	47	46	47	46	45	47	47	47	47
R17	45	45	46	45	45	45	44	47	47	47	47
AB017503	47	47	47	46	47	46	44	50	50	50	50
R15	41	41	41	40	41	40	41	40	39	39	39

Anhang

	X02144	M1	M2	M5	M34077	P1	P5	P6	P7	PMMVI	PMMVS
T1											
T3											
T4											
T5											
T7											
X68110											
Ohio											
L1											
L2											
L9											
L12											
X02144	----										
M1	69	----									
M2	69	99	----								
M5	69	97	98	----							
M34077	70	98	99	98	----						
P1	70	66	67	66	67	----					
P5	70	65	66	65	66	99	----				
P6	72	68	69	68	69	97	96	----			
P7	73	67	67	67	67	96	95	98	----		
PMMVI	73	66	67	66	68	95	94	97	99	----	
PMMVS	73	67	68	67	69	97	96	99	98	98	----
O8	71	68	68	70	68	68	68	68	69	68	68
O10	71	68	68	70	68	67	68	68	69	68	68
O12	72	68	69	71	69	68	68	69	69	69	69
X82130	70	67	68	70	68	66	67	67	67	67	67
C4	34	34	34	35	34	35	35	35	35	34	35
D12505	34	33	34	35	34	34	34	34	34	34	35
CFMMV	31	32	33	33	32	35	35	35	35	34	35
R3	48	46	47	47	47	47	47	47	48	47	47
R22	48	45	46	46	46	46	46	47	47	47	46
U03387	49	45	46	46	47	47	46	47	47	48	47
R19	46	43	44	44	45	48	48	48	48	48	48
R12	46	44	45	45	45	48	47	48	48	48	47
R17	46	45	45	45	45	47	46	47	47	47	46
AB017503	49	43	43	43	43	48	47	48	48	48	47
R15	38	37	37	37	37	36	36	37	37	37	37

	O8	O10	O12	X82130	C4	D12505	CFMMV	R3	R22	U03387	R19
T1											
T3											
T4											
T5											
T7											
X68110											
Ohio											
L1											
L2											
L9											
L12											
X02144											
M1											
M2											
M5											
M34077											
P1											
P5											
P6											
P7											
PMMVI											
PMMVS											
O8	----										
O10	99	----									
O12	99	99	----								
X82130	96	96	96	----							
C4	35	35	35	34,4	----						
D12505	34	34	34	34	99	----					
CFMMV	32	32	32	32	45	44	----				
R3	45	45	45	45	36	35	34	----			
R22	46	46	46	45	35	35	34	95	----		
U03387	45	45	45	44	36	36	33	98	94	----	
R19	42	42	42	41	35	35	32	85	85	86	----
R12	43	43	43	42	37	37	33	92	90	92	87
R17	43	43	43	42	37	37	34	89	87	90	85
AB017503	43	43	43	42	35	35	32	92	89	90	89
R15	39	39	39	38	32	31	28	50	50	48	47

	R12	R17	AB017503	R15
T1				
T3				
T4				
T5				
T7				
X68110				
Ohio				
L1				
L2				
L9				
L12				
X02144				
M1				
M2				
M5				
M34077				
P1				
P5				
P6				
P7				
PMMVI				
PMMVS				
O8				
O10				
O12				
X82130				
C4				
D12505				
CFMMV				
R3				
R22				
U03387				
R19				
R12	-----			
R17	94	-----		
AB017503	90	86	-----	
R15	47	48	49	-----

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir durch ihre Unterstützung geholfen haben, diese Arbeit anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. G. Adam danke ich für die Überlassung des Themas und die fachliche Unterstützung.

Frau Prof. Dr. C. Büttner danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und ihr großes Interesse an dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich Frau Dr. Heinze für die gute Betreuung, die stetige Motivation und Aufmunterung auch bei Schwierigkeiten. Für die hilfreiche Unterstützung bei der Interpretation der Sequenzierungsergebnisse sowie den vielen Denkanstößen und der großartigen Hilfsbereitschaft möchte ich mich herzlichst bei Dr. Willingmann bedanken.

Für die Bereitstellung der vielen Isolate und der elektronenmikroskopischen Untersuchungen sowie den vielfältigen Denkanstößen möchte ich mich herzlich bei Dr. D. E. Lesmann bedanken.

Mein ganz besondere Dank gilt der aktuellen und ehemaligen Arbeitsgruppe: Dr. Malgorzata Sadowska-Rybak, Ilse-Dore Schmidt, Dr. Frank Schwach, Maïke Both, Ute Neumann und Ines Raake für die stete Hilfsbereitschaft, Diskussionen und der guten Arbeitsatmosphäre. Insbesondere bedanke ich mich für die technische Unterstützung bei Judith Mehrmann und Sigrid George.

Diese Aufzählung wäre nicht vollständig, wenn ich mich nicht herzlichst bei meinem Mann für seine unendliche Geduld und Unterstützung bedanken würde.

Dieses Projekt wurde von dem Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft gefördert (BLE 98HS017), auch hierfür bedanke ich mich.