

**„Transformation von *Osteospermum ecklonis* mit Konstrukten zur
Induktion von Virusresistenz und Blühverfrühung“**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades

„D o k t o r

d e r N a t u r w i s s e n s c h a f t e n“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Joachim Mörbel

geb. in Ingelheim

Mainz, 2000

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2001

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	3
1.1. <i>Lettuce mosaic potyvirus</i>	3
1.2. <i>Osteospermum ecklonis</i>	10
1.3. Pathogen-abgeleitete Resistenz	13
1.4. Blühverfrühung	16
1.5. Zielsetzung der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.1.1. Bakterienstämme	19
2.1.2. Plasmide	20
2.1.3. Primer	22
2.1.4. Chemikalien und Enzyme	24
2.1.5. Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen	24
2.1.6. Virusmaterial	25
2.2. Pflanzenkulturtechniken	26
2.2.1. Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i>	26
2.2.2. Transformation und Regeneration von <i>Osteospermum ecklonis</i>	28
2.3. Herstellung der Transformationsvektoren	31
2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
2.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
2.3.3. Transformation von <i>E. coli</i>	33
2.3.4. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
2.3.5. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentrationen	35
2.3.6. Phosphorylierung von Oligonukleotiden	35
2.3.7. Amplifikation viraler cDNA-Fragmente	36
2.3.8. Agarose-Gelelektrophorese für DNA	37
2.3.9. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	38
2.3.10. Generieren von glatten Enden (blunt-ends)	38
2.3.11. Dephosphorylierung	39
2.3.12. Ligation	40
2.4. Analyse transgener Pflanzen	41
2.4.1. Extraktion pflanzlicher Gesamt-DNA	41
2.4.2. Nachweis des nptII-Gens	42
2.4.3. Nachweis des LMV-Prot-Konstrukts	43
2.4.4. Multiplex-PCR	44
2.4.5. Nachweis der CORE-Konstrukte	45

2.4.6. Nachweis von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> in regenerierten Pflanzen	45
2.4.7. Nachweis des SPL3-Konstrukts	46
2.4.8. NptII-ELISA	47
2.4.9. GUS-Färbung	47
2.5. Medien und Puffer	48
3. Ergebnisse	50
3.1. Vermehrung von <i>lettuce mosaic potyvirus</i> auf <i>Lactuca sativa</i>	50
3.2. Klonierung der Transformationsvektoren	51
3.2.1. Klonierung von pGJ-LMV-Prot	51
3.2.2. Klonierung der CORE-Konstrukte	55
3.2.3. Klonierung von pNPTII-SPL3	57
3.3. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
3.4. Regeneration von <i>Osteospermum ecklonis</i>	59
3.5. Selektionsmarker für <i>Osteospermum ecklonis</i>	60
3.6. Antibiotika zum Eliminieren von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	63
3.7. Transformation von <i>Osteospermum ecklonis</i>	65
3.8. Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i>	66
3.9. Analyse transgener <i>Osteospermum ecklonis</i>	67
3.9.1. GUS-Färbung	67
3.9.2. Extraktion von pflanzlicher Gesamt-DNA	69
3.9.3. Nachweis des SPL3-Konstrukts	70
3.9.4. Nachweis von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	71
3.9.5. Nachweis des LMV-Prot-Konstrukts	72
3.9.6. Nachweis der CORE-Konstrukte	74
3.10. Analyse transgener <i>Nicotiana benthamiana</i>	75
3.10.1. Nachweis des LMV-Prot-Konstrukts	75
3.10.2. Multiplex-PCR	77
3.10.3. NptII-ELISA	79
4. Diskussion	80
5. Zusammenfassung	92
6. Literaturverzeichnis	94
7. Anhang	102
7.1. Sequenz der cDNA von <i>lettuce mosaic potyvirus</i>	102
Curriculum vitae	108

Pflanzenviren

CaMV	<i>cauliflower mosaic caulimovirus</i>
CMV	<i>cucumber mosaic cucumovirus</i>
LMV	<i>lettuce mosaic potyvirus</i>
PAMV	<i>potato aucuba mosaic potexvirus</i>
PPMoV	<i>pepper mild mottle tobamovirus</i>
PPV	<i>plum pox potyvirus</i>
PSbMV	<i>pea seed-borne mosaic potyvirus</i>
PVC	<i>potato C potyvirus</i>
PVX	<i>potato X potexvirus</i>
PVY	<i>potato Y potyvirus</i>
TEV	<i>tobacco etch potyvirus</i>
TGMV	<i>tomato golden mosaic geminivirus</i>
TMV	<i>tobacco mosaic tobamovirus</i>
TSWV	<i>tomato spotted wilt tospovirus</i>
TuMV	<i>turnip mosaic potyvirus</i>
TVMV	<i>tobacco vein mottling potyvirus</i>
TYDV	<i>tobacco yellow dwarf geminivirus</i>
ZYMV	<i>zucchini yellow mosaic potyvirus</i>

Sonstige Abkürzungen

BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaar/Basenpaare
Carb	Carbenicillin
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure
Cef	Cefotaxim
CI	<i>cylindrical inclusion protein</i> (Potyviren)
CP	<i>coat protein</i> (Hüllprotein)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	<i>double-stranded</i> (doppelsträngig)
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (Enzym-Immuno-Test)
EPPO	<i>European Plant Protection Organization</i>
EtBr	Ethidiumbromid
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gm	Gentamycin
GUS	β -D-Glucuronidase
HC	<i>helper-component protein</i> (Potyviren)
IAA	Indol-3-Essigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
LB	<i>left border region</i> (linke Begrenzungsregion der T-DNA)
LB-Medium	Luria-Bertrani Medium
MP	<i>movement protein</i> (Bewegungsprotein)
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
MS	Murashige & Skoog Medium
n	Stichprobenumfang
NAA	1-Naphtyllessigsäure
NIa	<i>nuclear inclusion protein a</i> (Potyviren)

NiB	<i>nuclear inclusion protein b</i> (Potyviren)
nos	Nopalinsynthase
nptII	Neomycinphosphotransferase II
nt	Nukleotide
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PPT	Phosphinotricin
PTGS	<i>post-transcriptional gene silencing</i>
RB	<i>right border region</i> (rechte Begrenzungsregion der T-DNA)
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	<i>single-stranded</i> (einzelsträngig)
T-DNA	von <i>Agrobacterium</i> in die Pflanzelle transferiertes DNA-Fragment
Tim	Timentin
Vanc	Vancomycin
<i>vir</i>	Virulenzgene (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktosid
X-GlcA	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronsäure

Abkürzungen der 20 natürlichen Aminosäuren im Einbuchstabencode

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Asparaginsäure	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutaminsäure	E	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

1. EINLEITUNG

1.1. *Lettuce mosaic potyvirus*

Das Salat Mosaik Virus (LMV, *lettuce mosaic potyvirus*) ist ein weltweit vorkommendes Pathogen und verursacht an seinem namensgebenden Wirt schwere Schäden, die mit einer typischen, mosaikartigen Scheckung der Blätter einhergehen. LMV gehört zu der Gattung *Potyvirus*, die in die Familie der *Potyviridae* eingeordnet wird.

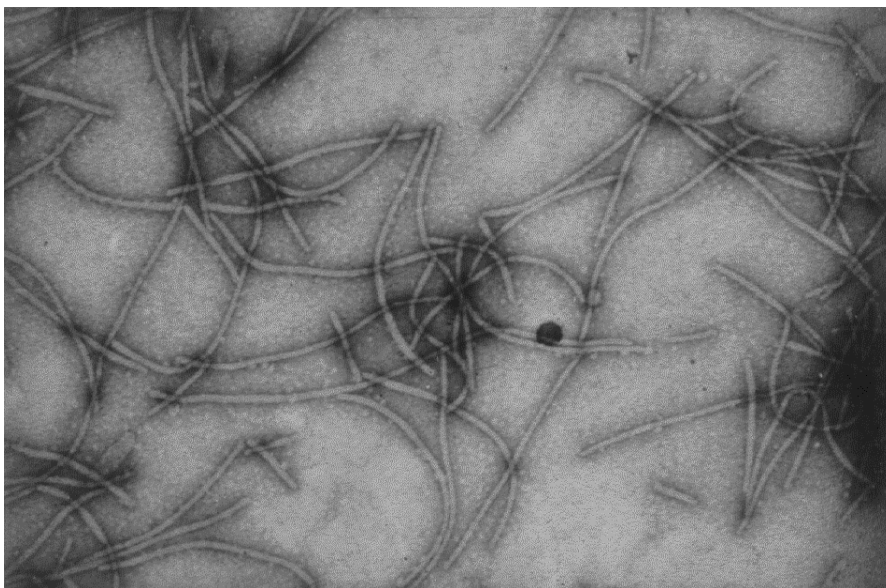


Abb. 1 : Elektronenoptische Aufnahme eines *Potyvirus* im Negativ-Kontrast-Verfahren, hier PPV mit flexiblen stäbchenförmigen Partikeln von ca. 750 nm Länge (Aufnahme INRA Bordeaux).

Die Gattung *Potyvirus* ist mit ca. 180 Arten die größte innerhalb der Pflanzenviren (Shukla *et al.*, 1994) und verursacht signifikante Schäden in einem breiten Spektrum von Wirtspflanzen. Bis 1974 wurden Potyviren in 1112 Pflanzenarten, in 369 Gattungen und 53 Familien nachgewiesen (Edwardson, 1974). Die Viren werden von Blattläusen nicht-persistent, d.h. nur für wenige Minuten nach Einstich in eine infizierte Pflanze, durch die Mundwerkzeuge der Insekten übertragen und einige Arten sind auch samenübertragbar (Johansen *et al.*, 1994; Shukla *et al.*, 1994). Potyviren erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild als charakteristische, flexibel stäbchenförmige Partikel von 680 bis 900 nm Länge und 12 bis 14 nm Breite (Edwardson, 1974).

Das Genom eines *Potyvirus* besteht aus einem einzelsträngigen (+) RNA Molekül von ca. 10.000 Nukleotiden (nt) zuzüglich einem poly(A)-Schwanz (Revers *et al.*, 1999). Diese genomische RNA kodiert für einen einzigen offenen Leserahmen (ORF), ein Polyprotein, das von drei Virus-kodierten

Proteinasen in funktionelle Proteine prozessiert wird (Riechmann *et al.*, 1992). Der offene Leserahmen wird von zwei nicht-kodierenden Regionen flankiert, an das 5'-Ende des viralen Genoms ist ein Virus-kodiertes Protein (VPg) gebunden. Diese Struktur unterscheidet potyvirale RNA von durch RNA-Polymerase II transkribierter mRNA, an deren 5'-Ende 7-Methylguanylsäure (5'-cap) gebunden ist. Da eine effiziente Translation von mRNA eine Interaktion zwischen 5'-cap und 3'-poly(A) erfordert (Gallie, 1998), muß es für Potyviren einen alternativen Mechanismus geben.

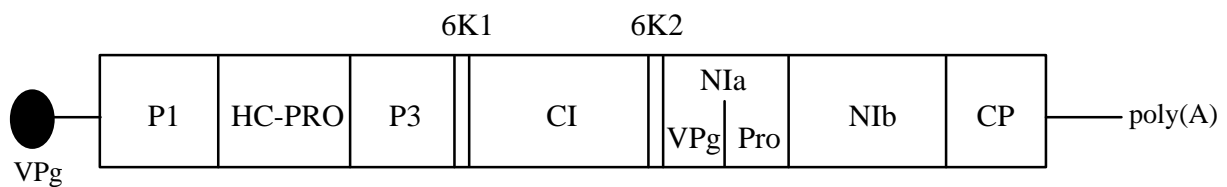


Abb. 2 : Organisation eines *Potyvirus* Genoms (Revers *et al.*, 1999). Potyviren haben eine einzelsträngige, am 3'-Ende polyadenylierte genomische RNA, an deren 5'-Ende ein Virus-kodiertes Protein (VPg) gebunden ist. Erläuterungen der Organisation des Polyproteins im Text.

Das translatierte Polyprotein wird von drei viruskodierten Proteinase - P1, HC-Pro und NIa - in zehn einzelne Proteine zerteilt (Riechmann *et al.*, 1992). Das *nuclear inclusion protein a* (NIa) schneidet als Proteinase an mindestens sieben Schnittstellen (Revers *et al.*, 1997). Die von NIa erkannten Schnittstellen sind die Dipeptide Q/A, Q/S, Q/G und Q/V. Als Konsensus findet man an der Position 4 *upstream* der Schnittstelle die Aminosäure Valin. Eine weitere Schnittstelle liegt intern zwischen der VPg und der Proteinase Domäne an einem E/S Dipeptid (Dougherty & Parks, 1991). Die Proteinase-Aktivität der *helper component* (HC-Pro) wurde erstmalig bei *tobacco etch potyvirus* (TEV) nachgewiesen (Carrington *et al.*, 1989). HC-Pro schneidet an seinem Carboxy-Terminus zwischen G/G, die Sequenz der TEV Schnittstelle findet sich homolog im LMV Polyprotein an den Positionen 890 - 896 (QHRYVG/G). Die dritte Proteinase ist das Protein P1, das an seinem Carboxy-Terminus das Dipeptid Y/S schneidet (Mavankal & Rhoads, 1991).

An der Replikation des viralen Genoms sind wahrscheinlich verschiedene viruskodierte Proteine beteiligt (Revers *et al.*, 1999), aber die zentrale Rolle kommt dem Protein NIB (*nuclear inclusion protein b*) zu, für das Aktivität als RNA-abhängige RNA-Polymerase nachgewiesen werden konnte (Hong & Hunt 1996).

Für das Protein P3 konnte noch keine Funktion nachgewiesen werden, es gibt aber Hinweise, daß es an der Regulation der Replikation beteiligt ist. Nach der Insertion von 12 Nukleotiden in die für P3 kodierende Sequenz von TMV (*tobacco vein mottling potyvirus*) wurde keine Replikation des

viralen Genoms beobachtet (Klein *et al.*, 1994). Das Protein 6K, das zweifach im Polyprotein vorkommt (6K1 und 6K2), wurde in Untersuchungen mit fluoreszierenden 6K-Fusionsproteinen aus TEV (*tobacco etch potyvirus*) als möglicher Membrananker beschrieben (Schaad *et al.*, 1997). Ermöglicht wird diese Verankerung in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) durch eine hydrophobe Domäne, die 19 Aminosäuren umfasst.

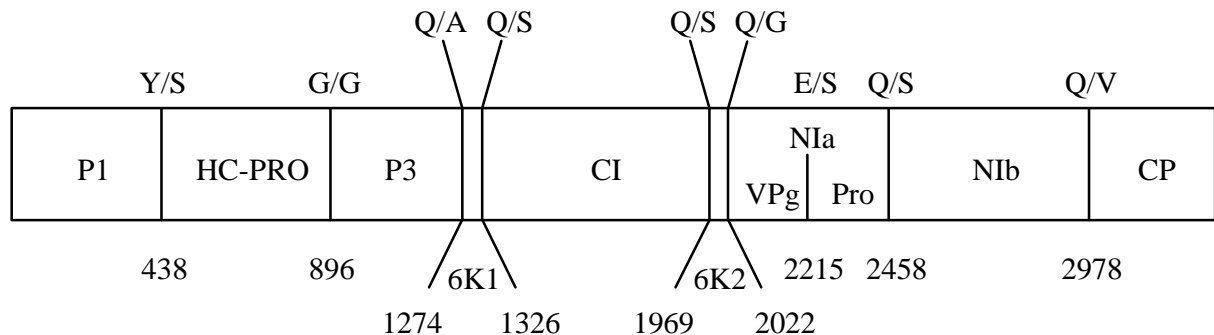


Abb. 3 : Organisation des LMV-Polyproteins (Revers *et al.*, 1997): Positionen und Dipeptide an den mutmaßlichen Schnittstellen des Polyproteins.

Das Hüllprotein (CP, *coat protein*) ist das einzige Strukturprotein, das von der genomischen RNA kodiert wird. Ein Viruspartikel wird aus ca. 2000 Einheiten des Hüllprotein gebildet (Matthews, 1991). Nahe des Amino-Terminus befindet sich das Tripeptid DAG (Position 2983-2985), von dem für TVMV gezeigt wurde, daß es für die Übertragung durch Blattläuse notwendig ist (Atreya *et al.*, 1991). Bereits 1988 hatte man beobachtet, daß dieses Tripeptid in allen Potyviren vorhanden ist, die durch Blattläuse übertragen werden, während es in nicht durch Blattläuse übertragenen Potyviren fehlt (Harrison & Robinson, 1988). Im folgenden Jahr konnte gezeigt werden, daß durch enzymatischen Abbau der amino-terminalen Domäne des CP die Übertragbarkeit durch Blattläuse verloren geht (Salomon, 1989). Andere Studien belegten durch Mutationsversuche die Bedeutung des DAG Tripeptids (Atreya *et al.*, 1990; Atreya *et al.*, 1991). Diese Ergebnisse zeigten auch, daß bestimmte Substitutionen möglich sind, welche die Blattlausübertragbarkeit erhalten, z.B. kann die Asparaginsäure in Position 1 des Tripeptids durch Asparagin ersetzt werden. Alle untersuchten Mutationen der Positionen 2 und 3 des Tripeptids führten zum Verlust der Blattlausübertragbarkeit. Für TVMV konnte gezeigt werden, daß auch die Aminosäure am Carboxy-Terminus des DAG Tripeptids für die Übertragung durch Blattläuse notwendig ist (Atreya *et al.*, 1995). Eine Mutation der Proteinsequenz DAGK zu DAGE führte zum völligen Verlust der Blattlausübertragbarkeit. Untersuchungen an anderen Virusgattungen belegen ebenfalls die Rolle des DAG Tripeptids. Die Sequenzierung des Hüllproteingens von *Potato aucuba mosaic potexvirus* (PAMV), einem durch Blattläuse übertragenem Virus der Gattung *Potexvirus*, zeigte das Vorhandensein des Motivs DAG in

der amino-terminalen Region des CP (Baulcombe *et al.*, 1993). Wird die entsprechende Region im nicht blattlausübertragbaren *potato virus X potexvirus* (PVX) durch die Sequenz aus PAMV ersetzt, wird PVX durch Blattläuse übertragen. Zusätzlich konnte ein Isolat von PAMV charakterisiert werden, bei dem keine Übertragung durch Blattläuse beobachtet wurde. Die Sequenzanalyse ergab, daß das Tripeptid DAG durch DAS ersetzt war. Alle diese Untersuchungen belegen den direkten Einfluß des Motivs DAG am amino-terminalen Ende des CP auf die Übertragung durch Blattläuse.

Neben dem CP ist ein weiteres virales Protein an der Blattlausübertragung beteiligt, HC-Pro (*helper component - proteinase*) (Thornbury *et al.*, 1985). Bei Sequenzvergleichen zwischen dem nicht blattlausübertragbaren *potato virus C potyvirus* (PVC) und dem durch Blattläuse übertragenen *potato virus Y potyvirus* (PVY) konnte gezeigt werden, daß sich HC-Pro in nur zwei Aminosäuren unterscheidet (Thornbury *et al.*, 1990). Im übertragungsdefekten Protein HC-Pro von PVC ist an Position 50 Lysin durch Glutaminsäure und an Position 225 Isoleucin durch Valin ersetzt. Durch Mutationsexperimente mit einem anderen Virus, *tobacco vein mottling potyvirus* (TVMV) wurde nachgewiesen, daß die Substitution einer einzigen Aminosäure in der amino-terminalen Domäne von HC-Pro, Lysin, durch Glutaminsäure zum Verlust der Übertragbarkeit durch Blattläuse führt (Atreya *et al.*, 1992). Wurde Lysin an Position 50 durch andere Aminosäuren ersetzt, führte dies ebenfalls zu einer defekten HC-Pro. Nur eine Substitution durch Arginin erhält die Funktionsfähigkeit des Proteins (Atreya & Pirone, 1993). Das Lysin Motiv KITC in der amino-terminalen cysteinreichen Domäne von HC-Pro scheint also eine essentielle Rolle bei der Übertragung durch Blattläuse zu spielen (Revers *et al.*, 1999). Es wurde noch ein weiteres, für die Blattlausübertragung notwendiges Motiv gefunden. Es handelt sich um das Tripeptid PTK in der carboxy-terminalen Domäne von HC-Pro (Granier *et al.*, 1993). In einem nicht blattlausübertragbaren Isolat von *zucchini yellow mosaic potyvirus* (ZYMV) konnte nachgewiesen werden, daß Threonin durch Alanin ersetzt war. Versuche mit blattlausübertragbaren Stämmen ergaben, daß Mutationen im PTK Motiv zum Verlust dieser Eigenschaft führten (Peng *et al.*, 1998).

Für die Übertragung des Virus ist es offenbar notwendig, daß das Protein HC-Pro vor oder gleichzeitig mit dem Viruspartikel aufgenommen wird. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem das Protein HC-Pro als Brücke zwischen dem CP des Viruspartikels und einem mutmaßlichen, bis jetzt noch nicht identifizierten Rezeptor im Einstichkanal des Insekts fungiert (Pirone & Blanc, 1996). Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen mit goldmarkierten Antikörpern belegen, daß Viruspartikel von TVMV in den Einstichkanälen von Blattläusen nachweisbar sind. Sie fehlen aber, wenn im CP das DAG Motiv und in der HC-Pro das Lysin-Motiv durch Mutation zerstört wurde (Pirone & Blanc, 1996). Ein direkter Beweis für den Zusammenhang von Blattlausübertragung und der spezifischen Interaktion zwischen CP und HC-Pro wurde in unabhängigen Untersuchungen gefunden. Die spezifische Bindung zwischen der HC-Pro von TVMV und einer sieben Aminosäuren umfassenden Domäne des TVMV CP, in der sich auch das DAG Motiv

befindet, konnte *in vitro* nachgewiesen werden (Blanc *et al.*, 1997). Eine hohe Korrelation zwischen der Effizienz der Virusübertragung durch Blattläuse und der Interaktion zwischen HC-Pro und der das DAG Motiv umfassenden Domäne wurde gefunden. Für ZYMV wurde gezeigt, daß die HC-Pro an mittels *dot-blot* immobilisierte Viruspartikel bindet (Peng *et al.*, 1998). Auch hier konnte eine hohe Korrelation zwischen der Blattlausübertragbarkeit der Mutanten von ZYMV und der Bindung von HC-Pro nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in dieser Untersuchung herausgefunden, daß nicht blattlausübertragbare ZYMV Mutanten mit einem veränderten PTK Motiv in der HC-Pro nicht in der Lage waren, an immobilisierte Viruspartikel zu binden. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, daß das PTK Motiv bei der Interaktion zwischen HC-Pro und Viruspartikeln beteiligt ist, und daß diese Interaktion Voraussetzung für eine Übertragung von ZYMV ist. Alle Untersuchungen unterstützen das Modell, daß HC-Pro eine Brücke zwischen Viruspartikel und Mundwerkzeug des Insekts bildet. Aber ein direkter Nachweis einer Interaktion zwischen HC-Pro und dem mutmaßlichen Rezeptor steht noch aus.

Im Gegensatz zu fast allen anderen Gattungen von Pflanzenviren besitzt *Potyvirus* kein spezielles Protein, das für die Ausbreitung der Viruspartikel in der Pflanze zuständig ist. Eine systemische Infektion der Pflanze erfolgt nur, wenn das Virus in der Lage ist, sich nach der Vermehrung in einer Zelle auch in der gesamten Pflanze auszubreiten. Dafür ist es notwendig, die Ausschlußgröße der Plasmodesmata zu vergrößern, damit Viruspartikel passieren können. Diese Funktion übernimmt normalerweise ein spezielles Bewegungsprotein (*movement protein*, MP). Potyviren kodieren kein spezielles MP, an der Ausbreitung der Viruspartikel sind CP, HC-Pro, VPg und das Protein des zylindrischen Einschlußkörpers (*cylindrical inclusion protein*, CI) beteiligt (Revers *et al.*, 1999). Die CI bilden im Infektionszyklus die für Potyviren charakteristischen und in ihrer Vielfalt einzigartigen *inclusion bodies* (Lesemann, 1988). Die im Cytoplasma der infizierten Zelle vorzufindenden, windradartigen oder spiralförmigen *inclusion bodies* sind dabei die charakteristischsten. Die *cylindrical inclusion bodies* werden durch das viruskodierte CI-Protein gebildet (Dougherty & Hiebert, 1980). Diese *cylindrical inclusion bodies* wurden in elektronenoptischen Untersuchungen häufig über den Öffnungen der Plasmodesmata gefunden (Lawson *et al.*, 1971). Versuche an TEV zeigten, daß zwei Mutanten, die in der amino-terminalen Region des CI Proteins verändert waren, sich nicht von Zelle zu Zelle ausbreiten konnten, obwohl sich das Virus in der infizierten Zelle replizierte (Carrington *et al.*, 1998). Aufgrund von Vergleich der Sequenzdaten und experimenteller Untersuchungen an gereinigten CI Proteinen wird vermutet, daß das Protein CI auch Helikase-Aktivität hat und in einen viralen Replikasekomplex eingebunden ist (Lain *et al.*, 1991). Die Einfügung eines 12 nt-Inserts in die für CI kodierende Sequenz von TVMV führte zum Verlust der Replikationsfähigkeit des Virus (Klein *et al.*, 1994).

Die meisten Potyviren verursachen auffällige Blattsymptome an den für sie anfälligen Pflanzen, oft auch verkümmertes Wachstum und Ertragsverluste. Gewöhnlich verursachen sie längsverlaufende

chlorotische oder nekrotische Streifen in den Blättern von monokotylen Pflanzen, mosaikartige Fleckung, Nekrosen und Deformationen an den Blättern von dikotylen Pflanzen. In vielen Fällen sind auch Blüten, Samen und Früchte von der Symptomausprägung betroffen (Shukla *et al.*, 1994). Die Ausprägung und das Ausmaß der Symptome an einem spezifischen Wirt hängen vom Virus und insbesondere dem Virus-Stamm ab, aber auch von Umweltbedingungen, die die Physiologie und die Entwicklung der Wirtspflanze beeinflussen. Symptome einer Virusinfektion sind das Ergebnis von komplexen zellulären und suprazellulären Interaktionen zwischen Wirtspflanze und Virus. Die Effekte können auf dem Verbrauch von Ressourcen für die Synthese viraler Nukleinsäuren und Proteine beruhen, oder auf dem störenden Einfluß virusspezifischer Produkte auf normale zelluläre Prozesse. Allgemein gilt, daß die Schwere der Symptomausprägung einer kompatiblen Wirt/Virus Kombination mit dem Ausmaß der Virusreplikation und Virusakkumulation korreliert (Revers *et al.*, 1999). Es wurden eine Reihe von biochemischen Veränderungen in systemisch infiziertem Pflanzengewebe nachgewiesen, aber es scheint unmöglich, Ursache und Wirkung der Symptomausprägung zu unterscheiden (Zaitlin & Hull, 1987). Erschwert werden die Untersuchungen infizierter Pflanzen dadurch, daß die vollständige systemische Ausbreitung des Virus Tage bis Wochen andauern kann, aber die exponentielle Phase der Virusreplikation in einer einzelnen Zelle nur wenige Stunden anhält. Es ist auch wenig darüber bekannt, welche Proteine der Wirtspflanze mit viralen Proteinen interagieren. Eine der wenigen Untersuchungen wurde mit dem Protein VPg-Proteinase von *turnip mosaic potyvirus* (TuMV) durchgeführt. Mit einem Doppelhybrid-System in Hefe wurde eine exprimierte cDNA Bibliothek aus *Arabidopsis thaliana* nach Interaktionen mit dem viralen Protein durchsucht (Wittmann *et al.*, 1997). Ein cDNA Klon wurde nach Ermittlung der vollständigen Nukleotidsequenz als eukaryotischer Initiationsfaktor (iso) 4E [eIF(iso)4E] identifiziert. Deletionsversuche ergaben, daß die VPg-Domäne des Proteins VPg-Proteinase mit eIF(iso)4E interagiert. Das Protein eIF(iso)4E spielt eine entscheidende Rolle bei der Initiation der Translation von mRNAs, an deren 5'-Ende 7-Methylguanylsäure (5'-cap) gebunden ist. Diese Ergebnisse legen nahe, daß das am 5'-Ende des viralen Genoms gebundene Protein VPg durch seine Interaktion mit einem pflanzlichen Initiationsfaktor die Translation des Polyproteingens ermöglicht. In einer anderen Untersuchung wurde ein 37 kDa Pflanzenprotein aus Chloroplasten von Salat (*Lactuca sativa*) gefunden, das mit dem CP von TuMV interagiert (McClintock *et al.*, 1998). Es ist nicht bekannt, in welcher Weise die gefundenen Interaktionen mit Virusreplikation und Symptomausprägung zusammenhängen.

Lettuce mosaic potyvirus (LMV) wurde erstmals in den 20er Jahren in Florida beschrieben (Jagger, 1921), und wenige Jahre später auch in Deutschland beobachtet (Brandenburg, 1928). Es gehört zu den gefährlichsten Pathogenen an Salatkulturen (*Lactuca sativa*). LMV wird in nicht-persistenter Weise durch Blattläuse übertragen, darunter *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Acyrtosiphon scariolae* und *Aphis gossypii* (Dickson & Laird, 1959). Das Virus ist aber auch samenübertragbar

(Ryder, 1964), was im Zusammenhang mit dem internationalen Samenhandel wahrscheinlich zur weltweiten Verbreitung führte (Dinant & Lot, 1992). Außer auf Salat konnte es mechanisch auch auf viele andere Arten übertragen werden (Horvath, 1980), der natürliche Wirkkreis beschränkt sich allerdings auf weniger als 30 Arten (Dinant & Lot, 1992).

Die unterschiedlichen Isolate von LMV werden in drei Pathotypen klassifiziert, die sich in ihren Möglichkeiten der Überwindung von natürlichen Resistenzen in Salat (*Lactuca sativa*) unterscheiden (Pink *et al.*, 1992). Im Pathotyp I werden die Stämme zusammengefaßt, die nur in der Lage sind *L. sativa* cv. Saladin zu infizieren. Diese Sorte enthält kein bekanntes Resistenzgen und wird für die Klassifizierung nach Pathotypen als virusanfällige Kontrolle benutzt. Im Pathotyp II werden die LMV Stämme zusammengefaßt, die außer *L. sativa* cv. Saladin auch Sorten infizieren, die die rezessiven Resistenzgene *moI¹* oder *moI²* tragen. Die meisten bekannten LMV-Isolate werden dem Pathotyp II zugerechnet (Pink *et al.*, 1992). Der Pathotyp III beschreibt die LMV-Stämme, die alle bekannten Resistenzgene überwinden können.

Resistenz gegen LMV in *L. sativa* wurde das erste Mal in Argentinien in der Sorte 'Gallega de Invernio' gefunden (Von der Pahlen & Crnko, 1965). Es konnte gezeigt werden, daß die Resistenz dieser Sorte - Virusreplikation findet statt, aber es kommt zu keinen Symptomen - auf einem einzigen rezessiven Gen beruht (Bannerot *et al.*, 1969). Ein ähnliches Resistenzverhalten wurde in drei ägyptischen Wildtypen von *L. sativa* gefunden. Auch hier konnte ein einzelnes rezessives Gen als Ursache identifiziert werden (Ryder, 1970). Bei den beschriebenen Resistenzgenen unterschiedlicher geographischer Herkunft handelt es sich um Allele des gleichen Gens, *moI¹* aus Südamerika und *moI²* aus Ägypten (Dinant & Lot, 1992). In Europa wurden für die Züchtung resistenter Salatsorten hauptsächlich die Sorte 'Gallega de Invernio' (*moI¹*), in den USA Wildtypen aus Ägypten (*moI²*) verwendet. Die molekulare Basis dieser Resistenzen, die auf einem rezessiven Gen beruhen, konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Verschiedene Modelle werden verwendet, um die Beobachtungen zu erklären. Eine Möglichkeit wäre, daß der resistenten Wirtspflanze ein funktionelles Protein fehlt, das für bestimmte Stufen der viralen Pathogenese notwendig ist. Das dominante Allel würde demnach ein funktionelles Protein kodieren, das für Virusreplikation und/oder Ausbreitung in der anfälligen Wirtspflanze notwendig ist. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß das Resistenzverhalten der Pflanze abhängig ist von einem Dosis-Effekt des rezessiven Gens, oder daß mehrere interagierende Loci involviert sind (Revers *et al.*, 1999).

Ein weiteres Resistenzgen wurde in *L. sativa* 'Ithaca' identifiziert, das dominante Gen *Mo2* (Pink *et al.*, 1992). Leider wird diese Resistenz von fast allen LMV-Stämmen gebrochen.

Bisher wurden zwei LMV-Stämme des Pathotyps II vollständig sequenziert, LMV-O (Revers *et al.*, 1997) und LMV-R (Zerbini *et al.*, 1995). Die beiden Stämme sind nicht in der Lage, *L. sativa* Pflanzen zu infizieren, die eines der rezessiven Resistenzgene *moI¹* oder *moI²* tragen. Der dritte vollständig sequenzierte Stamm ist LMV-E (Revers *et al.*, 1997). LMV-E überwindet alle bekannten

Resistenzgene und wird zum Pathotyp III gerechnet (Pink *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu den Stämmen LMV-O und LMV-R ist LMV-E nicht samenübertragbar. Die Übertragungsrate bei samenübertragbaren Stämmen schwankt stark, sie liegt, je nach Salatsorte, zwischen 0.5 % und 12 % (Dinant & Lot, 1992). Die Genome der Stämme LMV-O und LMV-E bestehen jeweils aus einem einzelsträngigen (+) RNA Molekül von 10.080 Nukleotiden (nt) zuzüglich einem poly(A)-Schwanz. Diese genomische RNA kodiert für einen einzigen offenen Leserahmen (ORF), ein Polyprotein mit einer Länge von 3255 Aminosäuren (aa). Dieser offene Leserahmen wird von zwei nicht-kodierenden Regionen flankiert, 103 nt am 5'Ende und 212 nt am 3'-Ende.

1.2. *Osteospermum ecklonis*

Innerhalb der letzten Jahre hat die Bedeutung der Kapmargerite, *Osteospermum ecklonis*, als Beet- und Balkonpflanze europaweit zugenommen. Diese aus Südafrika stammende Zierpflanze zeichnet sich durch pflegeleichten Anbau und Toleranz gegenüber Trockenheit aus.



Abb. 4 : *Osteospermum ecklonis* cv. 'Castor'

O. ecklonis wird, wie viele Zierpflanzen, in den Jungpflanzenbetrieben nicht über Saatgut, sondern über Stecklinge vermehrt. Die vegetative Vermehrung gewinnt im Zierpflanzenbau zunehmend an Bedeutung, da phänotypische Abweichungen bei stecklingsvermehrten Kulturen im Gegensatz zu

samenvermehrten seltener sind. Dies ermöglicht die wirtschaftliche Produktion von Pflanzensorten und Neuzüchtungen mit gärtnerisch erwünschten Eigenschaften in großen Stückzahlen. Allerdings birgt die vegetative Vermehrung auch große Gefahren. Eventuell in einer frühen Vermehrungsstufe vorhandene Pathogene werden durch die *in vitro* oder Stecklingsvermehrung an alle weiteren Stufen weitergegeben. Um einen internationalen Standard für die gesundheitliche Überprüfung von Pflanzenkulturen zu erzielen, befaßt sich die EPPO (*european plant protection organisation*) mit der Erstellung von vergleichbaren und kompatiblen Pflanzenkontrollsystemen und Zertifizierungsschemata. Die Hauptaufgabe dieser Organisation ist es, die internationale Verbreitung von potentiellen gefährlichen Pflanzenpathogenen und -krankheiten zu verhindern. Ein Ausschuß von Experten aus mehreren Mitgliedsländern erarbeitet Schemata und Systeme, die den Regierungen der EPPO-Mitgliedsstaaten vorgeschlagen werden, aber keinen rechtsverbindlichen Charakter haben. Das Hauptaugenmerk bei den Schemata liegt in der Kategorisierung der Pflanzenproduktion in Abhängigkeit von der Anzahl der Vermehrungsstufen, d. h. je niedriger die Vermehrungsstufe, desto höher ist der Qualitätsanspruch an das Pflanzenmaterial. Bei der Vermehrung werden drei Kategorien unterschieden: *nuclear stock*, *propagation stock* und *certified stock*. Diese Einteilung wird bei allen Zertifizierungsschemata beibehalten und wurde in einem allgemeinen Schema vorgestellt (OEPP/EPPO, 1991). Das Startmaterial, der sog. *nuclear stock*, wird in der Regel zur Erhaltung der Pathogenfreiheit *in vitro* erhalten. Diese Pflanzen bilden die Grundlage der gesamten Pflanzenproduktion und müssen höchstmöglichen Gesundheitsstatus haben. Der *nuclear stock* ist die höchste Kategorie im Zertifizierungsschema. Der *nuclear stock* geht aus *candidate material* hervor, welches auf die für die jeweilige Kultur definierten Pathogene in Einzelpflanzentests überprüft und für gesund befunden wurde. Aus der Vermehrung des *nuclear stock* im Gewächshaus hervorgegangene Pflanzen, die denselben Status erhalten sollen, müssen zuvor wieder einzeln getestet werden. Die Gewächshäuser für die Aufzucht von *nuclear stock* - Pflanzen genügen höchsten Anforderungen, so herrscht in ihnen beispielsweise permanenter leichter Überdruck, um das Eindringen von Schadinsekten zu erschweren. Die nächste Vermehrungsstufe wird über Stecklinge der *nuclear stock* - Pflanzen aufgebaut, was eine Vervielfachung des Pflanzenmaterials um den Faktor 10 - 20 entspricht. Diese Pflanzen bilden den *propagation stock* und werden ebenfalls auf verschiedene Schaderreger überprüft. Pflanzen, die mit Schaderregern infiziert sind, müssen eliminiert werden, sofern keine Behandlungsmöglichkeiten vorhanden sind. In einem weiteren Vermehrungsschritt geht aus dem *propagation stock* der *certified stock* hervor. Dieser Bestand stellt die Mutterpflanzen, von denen die Stecklinge für den Verkauf geschnitten werden. Diese bewurzelten oder unbewurzelten Stecklinge werden in den Gärtnereien für den Endverkauf fertiggestellt. Auch in diesem letzten Vermehrungsschritt müssen stichprobenartige Kontrollen geführt werden.

Alle Bearbeitungsschritte sowie die Testergebnisse für alle Vermehrungsstufen müssen dokumentiert und festgehalten werden, und bei einer offiziellen Überprüfung durch die Pflanzenschutzdienste zur Verfügung stehen (Feldhoff, 1998).

Diese Vorgehensweise belegt beeindruckend das Potential der vegetativen Vermehrungen, es ist aber auch leicht einsehbar, daß sich Infektionen von Einzelpflanzen exponentiell fortpflanzen und damit zu erheblichen Verlusten führen können. Die Gefährdung der Pflanzengesundheit wird durch die umfassenden, von der EPPO vorgeschlagenen Maßnahmen deutlich vor Augen geführt. Daher machen sowohl gesetzliche Vorgaben für den Vertrieb von Jungpflanzenmaterial im europäischen Binnenmarkt, als auch Aspekte der Pflanzengesundheit ein sehr sorgfältiges Vorgehen bei der Erzeugung der Verkaufsware notwendig.



Abb. 5 : LMV-Blütensymptome an *O. ecklonis* cv. 'Gemma'

Zwar können Schaderreger durch Pflanzenschutzmaßnahmen bekämpft und durch eine sorgfältige Pflanzenhygiene in Schach gehalten werden. Diese Maßnahmen können jedoch keinen wirklichen Schutz vor Pflanzenkrankheiten gewährleisten. Insbesondere die Bekämpfung von Viruserkrankungen ist fast unmöglich, mit Pflanzenschutzmitteln können nur die übertragenden Insekten bekämpft werden. Daher ist die Kultivierung von Pflanzenmaterial, das gegen den Hauptschaderreger der jeweiligen Art widerstandsfähig ist, die wirtschaftlichste Maßnahme. Das Salat Mosaik Virus (LMV, *lettuce mosaic potyvirus*) wird als der wichtigste viröse Schaderreger bei der Produktion von *O. ecklonis* angesehen (<http://www.osteospermum.fsnet.co.uk>). Im Herbst 1994 wurden erstmals bei *O. ecklonis* cv 'Sunny Lady' starke mosaikartige Symptome beobachtet, die durch LMV verursacht

wurden (Feldhoff, 1998). In den USA wurde 1991 LMV in der verwandten Art *O. fruticosum* nachgewiesen (Opgenorth *et al.*, 1991). In *Osteospermum spp.* ist keines der für Salat beschriebenen Resistenzgene gegen LMV, *mo1¹*, *mo1²* und *Mo2*, vorhanden. Alle auf dem Markt befindlichen Sorten sind hochanfällig. Die natürlicherweise vorkommenden LMV-Resistenzgene sind mit klassischen Züchtungsmethoden kaum auf *Osteospermum spp.* zu übertragen. Interspezifische Kreuzungen sind nur unter größten Schwierigkeiten, wenn überhaupt, durchzuführen und das züchterische Interesse an einem solchen Vorgehen ist gering, da durch ein derartiges Einkreuzen die marktrelevanten Sorteneigenschaften nachhaltig verändert würden. Gerade bei einer vegetativ vermehrten, hochanfälligen Zierpflanzenart wie *O. ecklonis* bietet sich daher an, durch gezielte gentechnische Übertragung von Genen eine LMV-Resistenz ohne Veränderung der Sorteneigenschaften zu erreichen.

1.3. Pathogen-abgeleitete Resistenz

Die Induktion von Virusresistenz mittels Transformation der anfälligen Wirtspflanze mit Genomabschnitten des Pathogens beruht auf empirischen Beobachtungen und der molekularen Analyse von Replikationsmechanismen von pflanzenpathogenen Viren. Die Suche nach Möglichkeiten zur Induktion von Virusresistenz wurde durch ein Phänomen unterstützt, das bei virusinfizierten Pflanzen beobachtet und *cross protection* genannt wird. Die Infektion einer Pflanze mit einem schwach virulenten Virusstamm führt zu erhöhter Widerstandsfähigkeit gegen eine Zweitinfektion mit einem virulenten Stamm des gleichen Virus (Hamilton, 1980). Im Jahr 1985 wurde ein Artikel veröffentlicht, in dem die Autoren ein Konzept der "parasit-abgeleiteten Resistenz" (*concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome*) postulierten (Sanford & Johnston, 1985). Der Begriff wurde später in "pathogen-abgeleitete Resistenz" abgewandelt. Dieses Konzept sagt voraus, daß die Expression genetischer Information eines Pathogens in einem Wirt essentielle pathogene Prozesse unterbricht und damit zur Resistenz des Wirts gegen dieses Pathogen führt. Die geringe Größe des Genoms phytopathogener Viren und die Verfügbarkeit von Sequenzdaten - das erste vollständig sequenzierte Genom war ein Pflanzenvirus, *tobacco mosaic tobamovirus* (Goelet *et al.*, 1982) - prädestinierten diese Gruppe im Gegensatz zu bakteriellen und pilzlichen Pathogenen zum experimentellen Nachweis dieses Konzepts. Die genetische Organisation der meisten (RNA) Pflanzenviren, die das CP am 3'-Ende ihres Genoms kodieren, führten dazu, daß dieses leicht zu klonierende Gen der bevorzugte Ansatzpunkt bei der Untersuchung möglicher Resistenzinduktion wurde. Außerdem hat das CP den größten Anteil an der Gesamtmenge der viralen Proteine. Nach der Transformation von Pflanzen mit der T-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens*, in die die cDNA des CP Gens aus TMV (*tobacco mosaic virus*) eingefügt

war, wurde eine Resistenz gegen dieses Virus gefunden (Powell-Abel *et al.*, 1986). Es kam sowohl zu einer Verzögerung der Symptomausprägung, als auch bei 10 - 60 % der inokulierten Pflanzen, je nach transgener Linie, zum völligen Ausbleiben von Symptomen einer Virusinfektion.

Osbourn *et al.* (1989) konnten nachweisen, daß in transgenen Protoplasten von *Nicotiana tabacum*, die das CP von TMV exprimierten, das Entpacken des Viruspartikels behindert wurde. Dazu wurden Pseudo-TMV-Viruspartikel, die die mRNA für das beta-Glucuronidase (GUS) Gen aus *E. coli* enthielten, durch Elektroporation in die Pflanzenzelle eingeführt. In der nicht transgenen Kontrolle konnte das Virus seine (falsche) genetische Information entpacken, und es wurde GUS-Aktivität nachgewiesen. In den transgenen, das CP von TMV exprimierenden Pflanzen konnte sich das Virus offensichtlich nicht vollständig entpacken, die gemessene GUS-Aktivität lag 100-fach unter dem Wert für die nicht transgene Kontrolle. Es wurde der Schluß gezogen, daß in transgenen, das CP exprimierenden Pflanzen das Entpacken des entsprechenden Viruspartikels, und damit die Replikation des Virus, verhindert wird.

Es konnte auch gezeigt werden, daß die Expression anderer viraler Gene zu Virusresistenz führt. Durch die Expression des 54-kDa Gens aus TMV, des vermeintlichen Replikasegens, konnten virusresistente transgene *N. tabacum* Pflanzen erzeugt werden (Golemboski *et al.*, 1990). Für die Resistenzinduktion in transgenen Pflanzen scheint es nicht notwendig zu sein, daß das vollständige Protein exprimiert wird. Transgene *N. benthamiana* Pflanzen, die nur ein verkürztes 54-kDa Protein aus *pepper mild mottle tobamovirus* (PMMoV) exprimierten, waren ebenfalls resistent gegen dieses Virus (Tenllado *et al.*, 1996). Ein drittes virales Protein, das erfolgreich zur Erzeugung resistenter Pflanzen eingesetzt wurde, ist das Bewegungsprotein (MP, *movement protein*). Die Expression des MP aus TMV verhinderte die systemische Infektion der Pflanze durch dieses Virus (Lapidot *et al.*, 1993). Auch für dieses Protein konnte gezeigt werden, daß die Transformation von *N. tabacum* mit einem partiell deletierten Gen zu Resistenz führt. Die Translation eines NS_M-Gens, des MP aus *tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV), mit deletiertem Startkodon führte ebenso zu Virusresistenz wie die Expression des funktionellen Proteins (Prins *et al.*, 1997).

Auch für die Potyviren ist es bereits gelungen, durch die Transformation viraler Sequenzen Virusresistenz in Pflanzen zu induzieren. Moreno *et al.* (1998) transformierten *N. tabacum* Pflanzen mit dem Gen P1 oder P3 aus *tobacco vein mottling potyvirus* (TVMV). Obwohl die transgenen Pflanzen, die das Gen P3 enthielten, in ihrem Wachstum stark gehemmt waren, waren sowohl die P1, als auch die P3 transgenen Pflanzen resistent gegen TVMV.

N. benthamiana, die mit dem CI Gen aus *plum pox potyvirus* (PPV) unter Kontrolle des 35S Promotors transformiert wurden, zeigten in einer transgenen Linie Virusresistenz (Wittner *et al.*, 1998). Die entsprechenden Pflanzen zeigten nach einer Inokulation mit PPV keinerlei Symptome. Swaney *et al.* (1995) konnten mit der Expression der kodierenden Sequenz für 6K2 und VPg aus *tobacco etch potyvirus* (TEV) virusresistente Pflanzen erzeugen.

Für das NIa Gen wurde in zwei unabhängigen Untersuchungen (Maiti *et al.*, 1993; Vardi *et al.*, 1993) gezeigt, daß entsprechend transformierte Pflanzen gegen das jeweilige Virus resistent sind. Maiti *et al.* (1993) konstruierten einen VPg Gen und Pro Gen aus TVMV umfassenden Transformationsvektor. Transgene Pflanzen zeigten keine Symptome nach Inokulation mit TVMV, auch wenn eine hohe Dosis verwendet wurde. Vardi *et al.* (1993) exprimierten eine Sequenz in *N. tabacum*, die das NIa Gen (mit Ausnahme der ersten 100 nt am 5'-Ende) und die ersten 251 nt des NIb Gens aus PVY umfaßte. Unter den F1-Nachkommen der geselbsteten transformierten Pflanzen konnten einige Linien identifiziert werden, die bei einer Inokulation mit PVY keine Symptome zeigten und bei denen keine Akkumulation viraler Partikel durch ELISA nachgewiesen werden konnte.

Audy *et al.* (1994) exprimierten das vollständige, mit Start- und Stopkodon versehene NIb Gen aus PVY (O-Stamm) in *N. tabacum*. Ein Viertel der entstandenen Linien zeigten Symptomfreiheit und Resistenz gegen PVY (O-Stamm), obwohl eine Replikation des Virus in den Pflanzen nachgewiesen werden konnte. Auch die Transformation mit teilweise deletierten Konstrukten (5'-Ende oder 3'-Ende des NIb Gens deletiert) erzeugte in einigen Fällen virusresistente Pflanzen. Jones *et al.* (1998) verwendeten das NIb Gen aus *pea seed-borne mosaic potyvirus* (PSbMV) zur Induktion von Virusresistenz. Sie konnten drei transgene Pflanzenlinien identifizieren, in denen erst nach einer Initialinfektion mit PSbMV ein Zustand hochgradiger Resistenz in der Pflanze erzeugt wurde. Nach dem Erreichen des resistenten Zustands konnten in der Pflanze weder virale noch transgene RNA nachgewiesen werden. Die Pflanzen zeigten bei einer weiteren Inokulation keinerlei Symptome. Lindbo & Dougherty (1992b) transformierten *N. tabacum* mit verschiedenen Konstrukten, die das vollständige CP Gen aus TEV oder Teile davon enthielten. Die erzeugten transgenen Linien zeigten ein breites Spektrum von Anfälligkeit bis Immunität gegenüber Virusinfektion. Von den transgenen Pflanzen wurden Protoplasten-Kulturen angelegt. Es zeigte sich, daß Zellen, die untranslatierbare CP mRNA transkribierten, die Virusreplikation unterdrückten.

1.4. Blühverfrühung

Die Produktion von Früchten und Samen bestimmt bei vielen landwirtschaftlichen und gartenbaulichen Kulturpflanzenarten den wirtschaftlichen Wert und ist von der Blütenbildung nicht zu trennen. Bei der Produktion von Zierpflanzenarten ist der Wert der Kultur noch unmittelbarer an das Blühverhalten gebunden. Wie alle Entwicklungsprozesse wird auch die Blüteninduktion und die Entwicklung der Blüten genetisch gesteuert. Die Kenntnis der wichtigsten an diesen Prozessen beteiligten Gene, ihre Funktion sowie ihre Wechselwirkung mit der Umwelt bildet die Grundlage für eine gezielte Änderung dieser Eigenschaften mit Hilfe molekularbiologischer und gentechnischer Methoden.

Eine Modellpflanze, bei der der Prozeß der Blühinduktion auf molekulargenetischer Ebene schon gut untersucht ist, ist das Löwenmaul (*Antirrhinum majus*). Wie die meisten Pflanzen bildet das Löwenmaul während der vegetativen Wachstumsphase ständig neue Laubblätter mit Achselknospen, die als Seitensprosse auswachsen können. Dies wird durch kontinuierliche Zellteilungen in einer Gruppe von Zellen am Sproßscheidung, dem Apikalmeristem, bewirkt. Bei Blühinduktion, d. h. wenn geeignete Umweltfaktoren mit dem richtigen Zeitpunkt der pflanzlichen Entwicklung zusammentreffen, schaltet das Apikalmeristem um und bildet anstelle der Laubblätter Deckblätter mit Blütenknospen in den Achseln. Auf diese Weise entsteht ein Blütenstand, eine Infloreszenz, mit vielen lateralen Blüten. Für die Festlegung der lateralen, axillären Meristeme als Blütenmeristeme sind eine Reihe von Genfunktionen notwendig, in die wiederum eingegriffen werden muß, wenn der Blühzeitpunkt beeinflußt werden soll.

Vor einigen Jahren konnte eines der an der Blütenbildung beteiligten Gene aus *A. majus* isoliert werden (Huijser *et al.*, 1992) und wurde *SQUAMOSA* (*SQUA*) benannt. Mutationen von *SQUA* führen zu Infloreszenzen mit fehlenden oder wenigen abnormen Blüten. In diesen mutanten Blüten werden immer noch Deckblätter gebildet, aber die Achselknospen entwickeln sich zu Sprossen, die denen von Infloreszenzen nicht unähnlich sind. *SQUA* legt also die Identität der Seitenknospen als Blütenprimordien in der Infloreszenz fest und ist demnach für die Blütenbildung notwendig. In der *SQUA*-Mutante werden im Verlauf der Entwicklung ebenfalls Laubblätter am Sproßscheidung durch deckblattähnliche Strukturen ersetzt. Dies deutet darauf hin, daß ein Umschalten vom vegetativen zum generativen Wachstum bereits stattgefunden hat und die Blühinduktion somit bereits erfolgt ist. Das *SQUA*-Gen fungiert daher als Wirkungsort für andere Gene, die die am Umschaltprozeß beteiligten Gene kontrollieren.

Vermutliche Regulatoren von *SQUAMOSA* konnten aufgrund ihrer Erkennung und Bindung eines DNA-Sequenzmotivs im *SQUA*-Promotor identifiziert werden (Klein *et al.*, 1996). Die von der

Isolierung der entsprechenden cDNAs abgeleiteten Gene wurden *SBP1* und *SBP2* (*SQUAMOSA* promotor binding protein) genannt. Die abgeleiteten Proteine zeigen eine konservierte Region, die als SBP-Domäne bezeichnet wurde. Diese SBP-Domäne ist für die Bindung der Proteine an den *SQUA*-Promotor verantwortlich. Diese DNA-bindende Domäne zeigte keine Homologien mit den in Datenbanken vorhandenen Sequenzen anderer Proteine. Die SBP-Box Gene repräsentieren daher eine neue Klasse von DNA-bindenden Proteinen und wirken vermutlich als Transkriptionsfaktoren.

Die Expression der Gene *SBP1* und *SBP2* ist entsprechend der Pflanzenentwicklung reguliert, und die Aktivierung der Transkription erfolgt vor der von *SQUAMOSA*. Die SBP-Gene spielen eine wichtige Rolle bei der Blühinduktion und können offensichtlich genutzt werden, um den Umschaltprozeß vom vegetativen zum generativen Wachstum gezielt zu beeinflussen.

In *Arabidopsis thaliana* wurden bereits früher die Gene *APETALA1* (*API*) und *LEAFY* (*LFY*) identifiziert, deren konstitutive Expression zu Blühverfrühung führt (Mandel & Yanofsky, 1995; Weigel & Nilsson, 1995). *SQUA* ist das vermutliche *A. majus* Ortholog zu *API* in *A. thaliana*. Cardon *et al.* (1997) screenen cDNA Bibliotheken von *A. thaliana* mit den mit Genen *SBP1* und *SBP2* aus *A. majus* als Probe und konnten so sieben SBP-Box Gene in *A. thaliana* identifizieren, die sie *SPL1* - *SPL7* benannten (*SQUA* promotor binding protein-like). *SPL3* konnte als das *A. thaliana* Ortholog von *SBP1* identifiziert werden, wobei *SPL3* vermutlich mit einer regulatorischen Sequenz in der Promotorregion von *API* interagiert.

Northern-blot Untersuchungen von mRNA aus 1-3 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen zeigten, daß die *SPL3* Expression in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand der Pflanze reguliert ist, wobei zu Beginn des Experiments so gut wie keine Transkripte, nach drei Wochen jedoch eine starke Transkription entdeckt wurden. *API* mRNA konnte erst in drei Wochen alten Pflanzen gefunden werden. Diese Ergebnisse scheinen zu bestätigen, daß *SPL3* als positiver transkriptioneller Regulator von *API* zu betrachten ist.

Eine konstitutive Expression des *SPL3* Gens unter der Kontrolle des 35S Promotors aus CaMV (*cauliflower mosaic caulimovirus*) in transgenen *A. thaliana* Pflanzen führte zu einer deutlichen Veränderung des Blühverhaltens, alle transgenen Linien blühten früher als die Kontrollpflanzen (Cardon *et al.*, 1997). Zur quantitativen Bestimmung des Blühzeitpunktes unter Langtagbedingungen wurden die Anzahl der vor der Blüte gebildeten Laubblätter bei transgenen und nicht transgenen Linien verglichen. Während die Blütenbildung in der Kontrolle im Durchschnitt nach der Anlage von 14,9 Laubblättern erfolgte, blühten die transgenen *A. thaliana* bereits nach der Anlage von 8,8 bis 12,1 Laubblättern. Zudem war der Wuchs der transgenen Linien niedriger und die Pflanzen entwickelten früher Seitenknospen. Unter Kurztagbedingungen war der Blühverfrühungseffekt schwächer ausgeprägt.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, züchterisch relevante Sorten von *Osteospermum ecklonis* mit gentechnischen Methoden resistent gegen das Salat Mosaik Virus (LMV) zu machen. Durch die Übertragung von pathogen-abgeleiteten Sequenzen soll Resistenz gegen diesen wichtigsten virösen Schaderreger erzielt werden und so die Produktion sicherer gemacht werden.

Für die Etablierung einer Transformationsmethode für die kommerziell relevanten Sorten von *O. ecklonis* muß zunächst ein geeignetes Regenerationsprotokoll entwickelt werden. Nach der erfolgreichen Etablierung einer geeigneten Methode zur Regeneration der Pflanzen aus vegetativem Gewebe kann mit der Transformation von Markergenen begonnen werden, um eine Transformationsmethode zu entwickeln. Hierfür muß auch ein geeigneter Selektionsmarker, Antibiotika- oder Herbizidresistenz, identifiziert werden, der die Selektion transgener, nicht-chimärer Regenerate ermöglicht. Im Anschluß an die Herstellung der Konstrukte zur Induktion der LMV-Resistenz können mit diesen die Pflanzen transformiert werden.

Ein weiteres Ziel ist die Induktion von Blühverfrühung in *O. ecklonis*. Hierzu soll geprüft werden, ob die in Modell-Organismen gewonnenen Ergebnisse auf züchterisch relevanten Sorten von *O. ecklonis* übertragen werden können. Zu diesem Zweck soll, nach erfolgreicher Etablierung eines Transformationsprotokolls, die Übertragung des *SPL3*-Gens aus *Arabidopsis thaliana* - *SPL3* ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulierung der Blüteninduktion beteiligt ist - auf *O. ecklonis* durchgeführt werden. Eine mögliche Blühverfrühung würde zu einer kürzeren Kulturzeit im Gewächshaus und damit zu einer erhöhten Produktivität und Kostenreduzierung führen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Bakterienstämme

Agrobacterium tumefaciens

Für die Etablierung eines Transformationsprotokolls für *Osteospermum ecklonis* wurden verschiedene Stämme von *A. tumefaciens* getestet, die sich hinsichtlich ihrer auf dem Helfer-Plasmid liegenden *vir*-Gene in ihrer Virulenz unterscheiden. Die von den *vir*-Genen kodierten Proteine sind für den Transfer und die Integration der T-DNA in die genomische DNA der Pflanze notwendig. GV3101 und LBA4404 sind häufig benutzte Standardstämme, für ATHV wurde eine erhöhte Virulenz und damit höhere Transformationsraten beschrieben. Ein gemeinsames Merkmal aller verwendeter Stämme ist die auf ihrer genomischen DNA kodierte Rifampicin-Resistenz.

Stamm	Genomische Antibiotikaresistenz	Helfer-Plasmid	Antibiotikaresistenz des Helfer-Plasmids
GV3101 (Koncz & Schell, 1986)	C58C1 Rif ^r	pMP90	Gm ^r
LBA4404 (Jen & Chilton, 1986)	Rif ^r	pAL4404	Km ^r
ATHV (Hood <i>et al.</i> , 1986)	C58C1 Rif ^r	pEHA101	- (Km ^r deletiert)

Tab. 1 : Für die Transformationsexperimente verwendete Stämme von *A. tumefaciens* und deren Eigenschaften

Escherichia coli

Für die Klonierung und Erhaltung der jeweiligen Transformationsvektoren und Plasmide wurde der *E. coli*-Stamm DH5A α F' (Gibco BRL) verwendet. Dieser Stamm ist zur α -Komplementation befähigt und erlaubt in Verbindung mit pBluescript II KS+ die Erkennung rekombinanter Bakterienkolonien durch Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal/IPTG-haltigen Agarplatten.

2.1.2. Plasmide

Binäre Vektoren mit Reportergenen

Um die Transformationseffizienz bestimmter *Agrobacterium*-Stämme und Konstrukte zu ermitteln, ist es notwendig, eine erfolgreiche Übertragung und Integration der T-DNA nachweisen zu können. Hierfür bieten sich Reportergene wie *uidA* (Jefferson *et al.*, 1986) und *GFP* (Prasher *et al.*, 1992) an. Das Gen *uidA* aus *Escherichia coli* kodiert das Enzym β -D-Glucuronidase (GUS). Dieses Enzym spaltet für den histochemischen Nachweis ein synthetisches Substrat, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronsäure (X-GlcA), dabei entsteht ein wasserunlöslicher blauer Farbstoff. Ein weiterer interessanter Reporter ist das *Green fluorescent protein* (GFP). Das entsprechende Gen wurde ursprünglich aus der nordwestpazifischen Tiefseequalle *Aequorea victoria* kloniert und sequenziert (Prasher *et al.*, 1992). Neben einer Vielzahl von anderen Organismen konnte GFP auch erfolgreich in Pflanzen exprimiert werden (Sheen *et al.*, 1995; Reichel *et al.*, 1996). Das Wildtyp-GFP ist ein 27 kDa Monomer, das aus 238 Aminosäuren besteht. Die Besonderheit dieses Proteins besteht darin, daß nach Anregung mit Licht bestimmter Wellenlängen (360-400 nm oder 440-480 nm) grünes Licht emittiert wird. Das Protein GFP benötigt dafür weder Substrat noch Kofaktoren. Ein Nachteil von GFP besteht jedoch darin, daß in Pflanzen eine sehr hohe Expressionsrate vorliegen muß, um eine detektierbare Leuchtintensität zu erhalten.

Außerdem ist es notwendig, einen geeigneten Selektionsmarker für *Osteospermum ecklonis* zu finden. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Selektionsmethoden mit entsprechenden Resistenzgenen überprüft. Eine Möglichkeit besteht darin, daß in der T-DNA des binären Vektors ein Gen für Kanamycin-Resistenz vorhanden ist, das *nptII* Gen (Neomycinphosphotransferase II). Wird dieses Gen erfolgreich in das Genom der Pflanze übertragen, kann die transgene Pflanze auf Medien wachsen, die Kanamycin enthalten. Bedingung ist allerdings, daß die untransformierte Pflanze durch Kanamycin in ihrer Entwicklung gehemmt wird. Kanamycin gehört zur Gruppe der Aminoglykoside. Diese Antibiotika wirken durch ihre Bindung an Untereinheiten der Ribosomen, behindern so die Proteinsynthese und verursachen eine fehlerhafte Translation. Eine weitere Möglichkeit ist die Selektion mit einem die Glutamin-Synthetase hemmenden Herbizid (Phosphinotricin, BASTA®). Durch Phosphinotricin, einem Substratanalogon von Glutamat, läßt sich die Glutamin-Synthetase hemmen. Pflanzen, bei denen durch Zugabe von Phosphinotricin dieses Enzym gehemmt ist, akkumulieren das Zellgift NH_4^+ , das sonst unter Verbrauch von ATP auf Glutamat übertragen wird, und sterben ab. In entsprechenden Transformationsvektoren befindet sich innerhalb der T-DNA das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus*, das eine Resistenz gegenüber der Behandlung mit Phosphinotricin bewirkt.

Plasmid	Kurzbeschreibung
p222-GUS	Dieses Plasmid basiert auf dem binären Vektor pBIN19 und enthält in der T-DNA das <i>uidA</i> Gen unter Kontrolle des 35S Promotors und Poly(A)-Signals aus CaMV sowie das <i>nptII</i> Gen (Kanamycin-Resistenzgen) unter Kontrolle des <i>nos</i> -Promotors und Poly(A)-Signals
pGUS-INTRON	Dieses Plasmid basiert auf dem binären Vektor pBIN19 und enthält in der T-DNA das <i>uidA</i> Gen unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors und Poly(A)-Signals aus pRT102 (Töpfer et al, 1987). Um zu verhindern, daß das Enzym GUS in <i>A. tumefaciens</i> exprimiert wird, wurde das Intron IV2 aus dem Gen <i>ST-LS1</i> aus Kartoffel (GenBank Zugangsnummer X04753, Eckes <i>et al.</i> , 1986) in das <i>uidA</i> Gen inseriert (Vancanneyt <i>et al.</i> , 1990).
pROK2275	Das Plasmid enthält in der T-DNA das <i>uidA</i> Gen unter Kontrolle des 35S Promotors und Poly(A)-Signals aus CaMV und das Gen <i>nptII</i> unter der Kontrolle von <i>nos</i> -Promotor und Poly(A)-Signal. pROK2275 ist ein Derivat von pBIN19 (Bevan, 1984).
pBINGFP	Das Plasmid enthält in der T-DNA das CAT-GFP Gen unter der Kontrolle eines doppelten 35S Promotors und (einfachen) Poly(A)-Signals aus CaMV. Diese Expressionskassette wurde aus dem Plasmid pCATgfp mit <i>Hind</i> III ausgeschnitten und in die T-DNA von pBIN19 eingefügt.

Tab. 2 : Verwendete binäre Vektoren mit Reporter genen

Für Klonierungsschritte verwendete Plasmide

Nach der erfolgreichen Etablierung eines Transformationsprotokolls mit Hilfe der Reporter gene sollten die Pflanzen mit den Konstrukten transformiert werden, die von züchterischem Interesse sind. Die hierzu notwendigen Konstrukte, die zur Induktion von Virusresistenz führen sollen, mußten selber hergestellt werden.

Plasmid	Kurzbeschreibung
pRT101	Dieses Plasmid enthält den 35S Promotor und das Poly(A)-Signal aus dem CaMV-Stamm "Cabb B-D" (Töpfer <i>et al.</i> , 1987).
pGJ357	Ein auf dem Plasmid pPZP200 (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994) basierender binärer Vektor, in dessen T-DNA ein <i>nptII</i> Gen unter Kontrolle von <i>nos</i> -Promotor und Poly(A)-Signal kloniert wurde. Die erfolgreiche Transformation von Bakterien kann durch eine auf dem Plasmid kodierte Streptomycin- und Spectinomycinresistenz überprüft werden.

pLMV15	Das Plasmid enthält die 3'-Hälfte des <i>full-length</i> -Klons von LMV-O (nt 5363 - nt 10080) in pBluescript II KS+ (Revers <i>et al.</i> , 1997; GenBank X97704 - siehe Anhang 1).
pBTΩ	Dieses Plasmid enthält die Ω- <i>leader</i> Sequenz in pBluescript II KS+. Diese Sequenz (67 nt) stammt vom nicht-kodierenden 5'-Ende des viralen Genoms von <i>tobacco mosaic tobamovirus</i> (TMV) und verstärkt die Translation transgener Transkripte (Gallie <i>et al.</i> , 1987).
pBAR-SPL3	Das Plasmid ist ein Derivat des binären Vektors pGPTV-BAR (Becker <i>et al.</i> , 1992). Es enthält die SPL3 cDNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> (EMBL Zugangsnummer für SPL3 cDNA : Y09427) unter der Kontrolle des 35S Promotors und Poly(A)-Signals aus CaMV. Als Selektionsmarker dient das bar-Gen (Phosphinotricin-Resistenz) unter Kontrolle des nos-Promotors und Poly(A)-Signals.
pBIN19	Binärer Vektor mit <i>nptII</i> -Gen (Kanamycinresistenz) unter Kontrolle des <i>nos</i> -Promotors und Poly(A)-Signals in der T-DNA (Bevan, 1984). Die erfolgreiche Transformation von Bakterien kann durch eine auf dem Plasmid kodierte Kanamycinresistenz überprüft werden.
pUC18 und pUC19	Standardklonierungsvektor mit Ampicillinresistenz (Vieira & Messing, 1982).
pBluescript II KS+	Standardklonierungsvektor mit Ampicillinresistenz (Alting-Mees & Short, 1989).

Tab. 3 : Plasmide, die zur Herstellung eigener Transformationsvektoren benutzt wurden

2.1.3. Primer

Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, in PSF-gereinigter Qualität bezogen.

LMV1	5' - GAT ATC AAC AAT GTC GAA AGA AGC TCT C - 3'
LMV2	5' - TCG AAA AGC TTG CAA AGG TAA ACG G - 3'
LMV3	5' - TTG CAA GCT TTT CGA ACT GCA TCA G- 3'
LMV4	5' - GAT ATC TTA TTG AAA CTG TAC TGC GTC TCC - 3'
CORE1	5' - GTC GAC TAA TAG AAG GAT GAC GAC ATC AAC - 3'
CORE2	5' - CTC GAG CCT CTC CGT GTT CTC TTC - 3'

PCASS	5' - GAC GCA CAA TCC CAC TAT CC - 3'
LMV6260R	5' - CCA TCG TCG CAT CGT CAC CA - 3'
NPTII - 5	5' - AGG CTA TTC GGC TAT GAC TG - 3'
NPTII - 3	5' - GTC CAG ATC ATC CTG ATC G - 3'
NAD5 - 5	5' - TAG CCC GAC CGT AGT GAT GTT AA - 3'
NAD5 - 3	5' - ATC ACC GAA CCT GCA CTC AGG AA - 3'
CHVE - 5	5' - GAT GGC AAG GGT CCG TTC AA - 3'
CHVE - 3	5' - CGC ATG TGT CTT CAG CTT ATT TCA - 3'
SPL3-35S	5' - GAC GCA CAA TCC CAC TAT CCT TCG - 3'
SPL3-241	5' - CAG TCT AGA GTA AGC AAA GCC TGT TTC - 3'

Tab. 4 : Primer, die für Klonierungsschritte oder PCR-Nachweise verwendet wurden

Die cDNA der genomischen RNA von LMV-O (GenBank X97704) und die Bindungsstellen der Primer LMV1, LMV2, LMV3, LMV4, CORE1, CORE2 und LMV6260R werden im Anhang 1 aufgeführt.

Primer LMV1 entspricht der Nukleotidsequenz der *full-length* cDNA von LMV-O von nt 6008 bis nt 6022 (TCGAAAGAAGCTCTC). Vor dieser Sequenz ist ein Startkodon (ATG) und am 5'-Ende des Primers eine *Eco* RV-Schnittstelle (GATATC) eingefügt. Primer LMV2 entspricht der Sequenz von nt 6168 bis nt 6181 (GCAAAGGTAAACGG) und enthält eine *Hind* III-Schnittstelle (AAGCTT). Primer LMV3 ist komplementär zur Sequenz von nt 6161 bis nt 6147 (TTCGAACTGCATCA) und enthält ebenfalls eine *Hind* III-Schnittstelle (AAGCTT). Primer LMV4 ist komplementär zur Sequenz von nt 7474 bis nt 7454 (TTGAAACTGTACTGCGTCTCC), enthält ein komplementäres Stopkodon (TTA) und eine *Eco* RV-Schnittstelle (GATATC). Diese Primer wurden zur Klonierung des 6K2-VPg-Pro Konstrukts verwendet.

Primer CORE1 entspricht der Sequenz von nt 9150 bis nt 9169 (AGAAGGATGACGACATCAAC) und enthält zusätzlich eine *Sal* I-Schnittstelle (GTCGAC). Primer CORE2 ist komplementär zur Sequenz von nt 9808 bis 9791 (CCTCTCCGTGTTCTCTTC) und enthält zusätzlich eine *Xho* I-Schnittstelle (CTCGAG). Diese Primer wurden für die Klonierung der CORE Konstrukte verwendet, die ein nichttranslatierbares Fragment des CP-Gens enthalten.

Primer LMV6260R ist komplementär der Sequenz von nt 6260 bis nt 6241. Primer PCASS entspricht einem Teil der Sequenz des 35S Promotors aus CaMV. Diese beiden Primer wurden zum PCR-Nachweis für transgene Pflanzen verwendet.

Die Primer NPTII-5 und NPTII-3 dienen zum spezifischen Nachweis des *nptII*-Gens in transgenen Pflanzen.

Die Primer NAD5-5 und NAD5-3 (Mannerlöf *et al.*, 1997) wurden als Kontrolle in PCR-Nachweisen zur Amplifikation eines Fragments des hochkonservierten mitochondrialen Gens für NADH-Dehydrogenase, *nad5* (Ecke *et al.*, 1990) verwendet. Die Sequenz der Primer entspricht der Position 1285-1307 (NAD5-5), bzw. Position 2093-2115 (NAD5-3) des mitochondrialen Gens *nad5* aus *Beta vulgaris* (GenBank X55786).

Primer CHVE-5 und CHVE-3 dientem zum PCR-Nachweis des Gens *chvE* aus *Agrobacterium tumefaciens*. ChvE spielt als Monosaccharid-bindendes Protein eine wichtige Rolle bei der Induktion der Expression der *vir*-Gene (Shimoda *et al.*, 1993). Die Primer binden an Position 854-873 (CHVE-5) und an Position 1461-1484 (CHVE-3). Die Positionen beziehen sich auf die unter GenBank D17457 veröffentlichte Gensequenz. Mit dieser Primer-Kombination konnten regenerierte Pflanzen im PCR-Test auf eine Kontamination mit *A. tumefaciens* überprüft werden.

Primer SPL3-35S entspricht einem Teil des 35S Promotors im SPL3-Konstrukt, Primer SPL3-241 bindet innerhalb des SPL3-Gens an der Position 460-480 (GenBank Y09427). Zusätzlich enthält Primer SPL3-241 eine *Xba* I-Schnittstelle am 5'-Ende. Diese Primer-Kombination wurde zum PCR-Nachweis des SPL3-Konstrukts in transgenen Pflanzen benutzt.

2.1.4. Chemikalien und Enzyme

Sämtliche Restriktionsenzyme wurden von der Firma Eurogentec (Belgien) bezogen, *Taq*-DNA-Polymerase von der Firma Perkin-Elmer, *Pwo*-DNA-Polymerase und alle weiteren Enzyme, sofern nicht gesondert angegeben, von der Firma Boehringer Mannheim. Alle für Gewebekultur verwendeten Chemikalien, Medien, Phytohormone und Antibiotika wurden von der Firma Duchefa (Niederlande) bezogen.

2.1.5. Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

Osteospermum ecklonis Pflanzen wurden von der Firma Kientzler zur Verfügung gestellt. Die bereits *in vitro* etablierten Pflanzen waren immunologisch auf Viren getestet und wurden in Weck-Gläsern auf MS-Medium mit 0.1 mg IES und 1 mg Kinetin pro Liter Medium geliefert. Die verwendeten Sorten sind Teil des Verkaufssortiments oder von züchterischem Interesse. Es handelt sich um *O. ecklonis*-Sorten aus der SPRINGSTAR®-Kollektion - 'Mira', 'Gemma', 'Sirius', 'Castor', 'Arctur' und 'Pollux' - sowie 'Lila mini' und 'pp26/95'. Die *in vitro* Pflanzen wurden in einer Klimakammer bei 24°C und einem Licht/Dunkel-Wechsel von 16 h/8 h angezogen.

Für die Vermehrung und Erhaltung von LMV wurde *Lactuca sativa* cv. Trocadero verwendet, diese Salatsorte enthält kein bekanntes Resistenzgen. Für einige Transformationsexperimente wurde *Nicotiana benthamiana* cv. Evergrow benutzt, da diese Pflanze durch ihre schnelle Regeneration eine frühzeitige Analyse selbstgefertigter Konstrukte ermöglicht. *N. benthamiana* und *L. sativa* wurden in Floraton 1, Floragard Oldenburg, pH 5,5 bis 6,5, gezogen. Die Aussat erfolgte in 6cm Töpfen bei täglicher Benetzung mit Wasser aus einer Sprühflasche. Das Saatgut wurde zur Erhaltung der Keimfähigkeit im Kühlschrank bei +4° C aufbewahrt. Nach Erreichen des Zweiblattstadiums wurden die Jungpflanzen in 8cm Töpfe pikiert und später nach Bedarf umgetopft.

2.1.6. Virusmaterial

Der E-Stamm von LMV wurde freundlicherweise von Dr. LeGall (INRA Bordeaux) zur Verfügung gestellt. Die Aufbewahrung des Virus erfolgte durch Lyophilisation oder Einfrieren infizierter Blätter eines geeigneten Wirtes. Zur experimentellen Virusinfektion der Pflanzen wurde die mechanische Inokulation durch Abreiben verwendet. In Gegenwart des zu übertragenden Virus werden dabei kleine Wunden auf der Zelloberfläche durch ein Abrasiv, z.B. SiC, verursacht, durch die das Virus in die Pflanzenzelle eindringen kann. Eine Etablierung des Virus führt zur Infektion.

Das zu untersuchende frische, lyophilisierte oder bei -80 °C gefrorene Pflanzenmaterial wurde in kaltem Puffer (25 mM Na₂HPO₄) in einer 1:3 (w/v) Verdünnung unter Zugabe von Aktivkohle (0.4g/ml Puffer) und SiC (0.4g/ml Puffer) in einem eisgekühlten Mörser zerrieben.

Zur Inokulation wurden zwei entwickelte, gegenüberstehende Blätter der jeweiligen Pflanze (4-6 Blattstadium) mit SiC bestäubt und wenige Tropfen des gemörserten Materials mit den Fingern reibend verteilt. Kontrollpflanzen wurden mit Puffer ohne Zugabe von Blattmaterial abgerieben, um Viruskontamination des Puffers und Schäden durch die mechanische Belastung auszuschließen.

Nach dem Antrocknen wurden die abgeriebenen Blätter vorsichtig mit dest. Wasser abgespült. Nach ca. 10-12 Tagen waren Symptome einer systemischen Infektion sichtbar.

2.2. Pflanzenkulturtechniken

2.2.1. Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Die Transformation von *N. benthamiana* fand nach der Blattscheiben- (*leaf disc*) Methode durch Kokultivierung mit *Agrobacterium tumefaciens* statt. Dabei übertragen die Agrobakterien die Gene der T-DNA des Transformationsvektors auf Chromosomen im Zellkern der Pflanze.

10 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (15 mg Rifampicin/l, dazu 50 mg Kanamycin oder 200 mg Spectinomycin) wurden in einem sterilen 50-ml Glaskolben mit einer Bakterienkolonie der entsprechend transformierten Agrobakterien inokuliert und 18-24 h bei 27°C auf einem Schüttler bei 200-250 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Agrobakterien 5 min. bei 3000g in 10-ml Röhrchen bei Raumtemperatur zentrifugiert (4000 rpm in Hermle Z383K). Das Pellet wurde in 10 ml LB ohne Antibiotika resuspendiert und wieder in einem 50-ml Kolben für 2 h bei 27°C und 200-250 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Durch dieses Verfahren wurde ausgeschlossen, daß die Pflanzenzellen bei der Kokultur durch Antibiotika geschädigt werden. Zur Erhöhung der Transformationsrate kann bei der Resuspendierung 200 µM Acetosyringon beigefügt werden. Für die Kokultur wurde die *Agrobacterium*-Suspension unverdünnt oder 1:5 (v/v) mit sterilem MS-Medium (30 g Saccharose/l) verdünnt verwendet.

Antibiotika	verwendete Konzentrationen	Wirkung
Kanamycin (Km)	5-100 mg/l	Selektion transgener Pflanzen.
Cefotaxim (Cef)	250 mg/l	Eliminierung von <i>A. tumefaciens</i> durch Inhibierung der Zellwandsynthese. Cefotaxim ist sehr resistent gegenüber β -Lactamase-Aktivität.
Carbenicillin (Carb)	500 mg/l	Eliminierung von <i>A. tumefaciens</i> durch Inhibierung der Zellwandsynthese. Sensitiv gegenüber β -Lactamase.
Vancomycin (Vanc)	200 mg/l	Eliminierung von <i>A. tumefaciens</i> durch Inhibierung der Zellwandsynthese. Seine Wirkung als Glycopeptid wird durch β -Lactamase nicht inhibiert.
Timentin (Tim)	200 mg/l	Timentin ist eine Mischung aus Ticarcillin und Clavulanat. Ticarcillin inhibiert die Zellwandsynthese von <i>A. tumefaciens</i> , ist aber sehr empfindlich gegenüber β -Lactamase. Clavulanat ist ein spezifischer β -Lactamase-Inhibitor und schützt so Ticarcillin gegen Inaktivierung.

Tab. 5 : Für Pflanzentransformationen verwendete Antibiotika

Als Pflanzengewebe für die Kokultivierung mit *A. tumefaciens* wurden ca 1-2 cm² Blattstücke von bereits *in vitro* etablierten *N. benthamiana* verwendet. Die *in vitro* Pflanzen waren auf MS-Medium (10 g Agar/l, 20 g Saccharose/l) ohne Phytohormone angezogen worden. Es ist aber auch möglich, Blätter von Pflanzen aus dem Gewächshaus zu nehmen und diese vor der Kokultur in 2%iger (w/v) CaClO-Lösung zu sterilisieren. Möglichst junge Blätter wurden der *in vitro* Kultur entnommen und ohne Blattstiele quer in 3-5 Streifen, jeweils mit Mittelrippe, geschnitten. Diese Streifen wurden bei entsprechender Größe noch einmal entlang der Mittelrippe halbiert.

Die Blattscheiben wurden dann 10-15 min. in der Bakteriensuspension gebadet, die zuvor in eine Petrischale umgefüllt worden war. Während dieser Zeit wurde das Gefäß einige Male leicht bewegt, damit die Blattoberflächen vollständig benetzt wurden. Nach der Herausnahme der Blattscheiben wurden diese zum Abtrocknen auf sterilem Filterpapier abgestreift und auf MS-Platten (10 g Agar/l, 30 g Glucose/l, 1 mg BAP/l, 0.1 mg NAA/l) gelegt. Hierbei wurden die Blattscheiben fest angedrückt, damit die Wundstellen in direktem Kontakt mit dem Medium stehen.

Nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 24°C im Dunkeln waren um die Blattscheiben herum Bakterien sichtbar. Die Blattscheiben wurden von den Platten abgenommen, wenige Sekunden in MS-Medium geschwenkt, auf sterilem Filterpapier abgetrocknet und anschließend auf Selektivmedium (MS-Medium, 10 g Agar/l, 20 g Saccharose/l, 1 mg BAP/l, 0.1 mg NAA/l, 100 mg Km/l, 200 mg Vancomycin/l, 200 mg Timentin/l) gelegt. Auch bei diesem Schritt wurde darauf geachtet, die Blattscheiben fest auf die MS-Platten zu drücken, damit die Wundstellen in direktem Kontakt mit dem Medium stehen. Ein fester Kontakt war notwendig, um die Aufnahme von Nährstoffen und den die Kallusbildung induzierenden Phytohormonen zu gewährleisten. Außerdem war es für die erfolgreiche Selektion transgener Pflanzenzellen notwendig, daß die Antibiotika aufgenommen werden konnten. Nur transgene Zellen waren in der Lage, auf einem Medium mit 100 mg Km/l zu wachsen, das restliche Gewebe wurde gelblich-weiß und starb zum Teil ab. Die Petrischalen wurden in einer Klimakammer bei 24°C und einem Licht/Dunkel-Wechsel von 16 h/8 h inkubiert.

Nach 3 Tagen wurde das Medium gewechselt und die Blattscheiben auf frische Platten mit Selektivmedium gelegt. Danach wurde das Medium noch einmal nach 7-10 Tagen gewechselt. Ungefähr eine Woche nach der Kokultur war eine deutliche Kallusbildung zu beobachten, ca. 3-4 Wochen nach der Kokultur erschienen die ersten adventiven Sprosse. Sobald die adventiven Sprosse 2-3 Blättchen angelegt hatten, wurden die Sprosse möglichst tief abgeschnitten und auf neue MS-Platten (10 g Agar/l, 20 g Saccharose/l, 100 mg Km/l, 250 mg Cef/l) übertragen. Das weitere Wachstum erfolgte ohne Zugabe von Phytohormonen. Nach weiteren 2 Wochen war bei den ersten Pflanzen die Bildung von Wurzeln im MS-Medium sichtbar. Nur Pflanzen, die auf Medium mit 100 mg Km Wurzeln bildeten und *in vitro* eine normale Wuchsform zeigten, wurden ins Gewächshaus überführt.

Für die Überführung der *N. benthamiana* Pflanzen von *in vitro*- in Erdkultur wurden die steril gehaltenen, bewurzelten Sprosse aus den Petrischalen genommen und das Medium vorsichtig in lauwarmem Wasser abgespült. Es wurden solche Pflanzen ausgewählt, deren Wurzeln eine maximale Länge von 1 cm hatten. Anschließend wurden die Pflanzen in eine 1:1 Mischung (v/v) von Topferde (Floraton 1, Floragard Oldenburg, pH 5,5 bis 6,5) und Sand gesetzt. Diese Mischung wurde zuvor gut durchfeuchtet. Die Töpfe wurden mit Deckeln von Petrischalen abgedeckt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit für die ausgetopften Pflanzen zu gewährleisten.

Um Pilzbefall, z.B. *Botrytis* sp., zu verhindern, wurden die Pflänzchen mit einem Fungizid mit Kontaktwirkung eingesprüht (0.2 % RONILAN WG, BASF). Die Töpfe wurden in ein S1-Gewächshaus mit 14 h Tageslänge bei künstlicher Beleuchtung gestellt. Nach 4 Tagen wurde die Abdeckung ein wenig verschoben, um eine vorsichtige Luftzufuhr zu ermöglichen. Jeweils nach 2 Tagen wurde der Deckel ein weiteres Mal um 1 cm verschoben und schließlich nach insgesamt 10 Tagen vollständig entfernt. Teilweise kam es zu Welkephasen, die meisten Pflanzen erholten sich jedoch wieder. Es zeigte sich aber, daß relativ kleine Pflanzen (4-5 Blattstadium) die Überführung aus *in vitro*- in Erdkultur am besten verkrafteten und ohne Wachstumsverzögerung sofort weiterwuchsen.

2.2.2 Transformation und Regeneration von *Osteospermum ecklonis*

Für die Transformationsexperimente mit *O. ecklonis* konnte auf keine publizierten Protokolle zurückgegriffen werden. Daher war es notwendig, zunächst eine Methode zur Regeneration von Pflanzen aus vegetativem Gewebe zu finden. Aufgrund der Erfahrung mit *N. benthamiana* wurde auch für *O. ecklonis* die Regeneration über Kallusbildung an Blattscheiben erwogen.

Regeneration von *O. ecklonis*

Als Pflanzengewebe für die Regenerationsversuche wurden ca. 1 cm² große Blattstücke von *in vitro* vermehrten *O. ecklonis* verwendet. Diese Pflanzen waren auf Vermehrungsmedium F3 (MS, 10 g Agar/l, 30 g Saccharose/l, 0.1 mg IAA, 1 mg Kinetin/l) angezogen worden. Es wurden möglichst junge Blätter entnommen und entsprechend der Vorgehensweise bei *N. benthamiana* zerschnitten. Zusätzlich wurden die Blattstücke mit wenigen Stichen oder Schnitten perforiert, um möglichst große Wundflächen zu erzeugen. Anschließend wurden die Blattstücke auf MS-Platten (8.5 g Agar/l, 30 g Saccharose/l) aufgelegt. Um geeignete Bedingungen für die Bildung adventiver Sprosse zu finden, wurden verschiedene Kombinationen von Phytohormonkonzentrationen verwendet. Als Phytohormone wurden ein Auxin (Indol-3-Essigsäure, IAA) und ein Cytokinin (6-Benzylaminopurin, BAP) verwendet. Eine ausgewogene Kombination von Auxin und Cytokinin führt in vielen

Pflanzengewebekulturen zur Bildung von Kallus und adventiven Sprossen (George, 1993). Überwiegt die Menge an Auxin, kommt es eher zur Bildung von adventiven Wurzeln aus Kallus. In den MS-Platten wurde jeweils die Konzentration des Auxins konstant gehalten (0.5 mg IAA/l) und die Konzentration des Cytokinins variiert (0, 0.5, 1, 1.5, 2 und 2.5 mg BAP/l). Für diesen Versuch wurden alle 8 verfügbaren Sorten von *O. ecklonis* verwendet und die ausgeschnittenen Blattscheiben auf die 6 unterschiedlichen MS-Platten aufgelegt. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen, um ein Austrocknen der Pflanzen zu verhindern, und anschließend 5 Wochen bei 20°C in der Klimakammer inkubiert (Licht/Dunkel-Wechsel 16 h/8 h).

Nach der Etablierung einer geeigneten Regenerationsmethode war es notwendig, die Konzentrationen des selektiven Antibiotikums bzw. Herbizids (PPT) zu bestimmen, bei denen transgene Pflanzen wachsen können, nicht transformierte Zellen jedoch am Wachstum gehindert werden oder absterben. Außerdem mußte überprüft werden, ob die zur Eliminierung der Agrobakterien eingesetzten Antibiotika einen negativen Einfluß auf die Regenerationsrate von *O. ecklonis* haben.

Die Empfindlichkeit von *O. ecklonis* wurde zunächst am Wachstum von Sprossen untersucht. Hierfür wurden *in vitro* Pflanzen in kleinere Segmente zerschnitten und in MS-Medium (10 g Agar/l, 30 g Saccharose, 0.1 mg IAA/l, 1 mg Kinetin/l) gesteckt. In diesem Medium wird bei *O. ecklonis* die Bildung von Sprossen aus Blattknospen gefördert. Dem Medium wurden verschiedene Konzentrationen an PPT zugesetzt: 20, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05 und 0 mg/l. Für die Bestimmung der Empfindlichkeit gegen Kanamycin wurden folgende Konzentrationen verwendet: 100, 50, 20, 10 und 0 mg/l. Es wurden jeweils 5 Pflanzensegmente pro Platte in das Medium gesteckt. Die Pflanzen wurden anschließend 3 Wochen unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert.

Nachdem ein geeignetes selektives Agens für *O. ecklonis* ermittelt worden war, wurde der Einfluß von selektivem Agens und Antibiotikum zum Eliminieren der Bakterien auf die Regeneration untersucht. Hierzu wurden, wie oben beschrieben, Blattstücke auf MS-Platten (10 g Agar/l, 30 g Saccharose/l) mit regenerationsfördernder Phytohormonkonzentration (0.5 mg IAA/l, 1 mg BAP/l) gelegt. Zusätzlich wurden dem MS-Medium verschiedene Mengen an Antibiotika beigefügt: 60, 40, 20, 10 und 0 mg Km/l in Kombination mit 500 mg Carbenicillin/l, 250 mg Cefotaxim/l, oder ohne weiteres Antibiotikum. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und 6 Wochen bei 22°C in der Klimakammer inkubiert (Licht/Dunkel-Wechsel 16 h/8 h).

Transformation von *O. ecklonis*

Im Anschluß an die Etablierung einer geeigneten Regenerationsmethode konnten die Versuche zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation von *O. ecklonis* durchgeführt werden.

3 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (15 mg Rifampicin/l, dazu 50 mg Kanamycin/l oder 200 mg Spectinomycin/l, je nach Transformationsvektor) wurden in einem 10-ml Kunststoffröhrchen

mit einer Bakterienkolonie der entsprechend transformierten Agrobakterien inokuliert und über Nacht bei 27°C auf einem Schüttler (250 rpm) inkubiert. Am folgenden Tag wurden 15 ml LB-Medium ohne Antibiotika in einem 50-ml Glaskolben mit 150 µl Bakteriensuspension vom Vortag inokuliert und über Nacht bei 27°C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Für die Kokultur mit *O. ecklonis* wurde die Bakteriensuspension unverdünnt oder 1:5 bzw. 1:10 (v/v) mit MS-Medium (30 g Glucose/l, 0.5 mg IAA/l, 1 mg BAP/l) verdünnt eingesetzt.

Die Blattscheiben wurden wie oben beschrieben hergestellt und 5-10 min. in der verdünnten Bakteriensuspension gebadet, die zuvor in eine Petrischale umgefüllt worden war. Das Gefäß wurde einige Male leicht bewegt, um die Blattoberflächen vollständig zu benetzen. Anschließend wurden die Blattscheiben auf sterilem Filterpapier abgestreift und auf MS-Platten (10 g Agar/l, 30 g Glucose/l, 0.5 mg IAA/l, 1 mg BAP/l) gelegt. Alternativ dazu wurden Blattstücke mit der Pinzette ergriffen und nur wenige sec. mit den Wundflächen in unverdünnte Bakteriensuspension gehalten. Diese Blattsegmente wurden danach direkt auf MS-Platten (10 g Agar/l, 30 g Glucose/l, 0.5 mg IAA/l, 1 mg BAP/l) gelegt, ein Abtrocknen auf Filterpapier war nicht erforderlich. Auch bei *O. ecklonis* wurden die Blattscheiben fest auf das Medium angedrückt, die Blattsegmente neigen noch stärker als solche von *N. benthamiana* zum Zusammenrollen.

Nach einer Inkubation von 2 Tagen in der Klimakammer (24°C, Licht/Dunkel-Wechsel von 16h/8h) waren um die Blattscheiben herum Bakterien schwach sichtbar. Die Blattsegmente wurden abgenommen, wenige Sekunden in MS-Medium (0.5 mg IAA/l, 1 mg BAP/l) geschwenkt und dann auf sterilem Filterpapier abgestreift. Anschließend wurden die Blattscheiben auf Selektivmedium (MS-Medium, 10 g Agar/l, 30 g Saccharose/l, 0.5 mg IAA/l, 1 mg BAP/l, 20 oder 40 mg Km/l, 250 mg Cefotaxim/l oder 500 mg Carbenicillin/l) gelegt. Auch hierbei wurde darauf geachtet, die Blattscheiben fest auf die Platten zu drücken und möglichst das Blatt in der gleichen Orientierung wie auf dem Kokulturmmedium aufzulegen. Die Blattscheiben wurden auf Blattober- oder Unterseite gelegt, je nach Erfordernis, um ein Zusammenrollen zu verhindern.

Nach ungefähr 7 Tagen wurde das Medium erneut ausgetauscht, die Blattscheiben wurden wieder auf Selektivmedium (MS-Medium, 10 g Agar/l, 30 g Saccharose/l, 0.5 mg IAA/l, 1 mg BAP/l, 20 oder 40 mg Km/l, 250 mg Cefotaxim/l oder 500 mg Carbenicillin/l) gelegt. Dieser Schritt wurde ungefähr 10 Tage später wiederholt. War in der Zwischenzeit auf einer Platte Bakterienwachstum sichtbar, wurde das Medium sofort gewechselt. Kam es zu einer Kontamination durch Pilze, wurde versucht, die verbleibenden Blattscheiben in der Petrischale durch 30 sec. Waschen in 1%iger (w/v) CaClO-Lösung, Abspülen in sterilem MS-Medium und Auflegen auf neues Medium zu sichern. Blattscheiben, an denen bereits Pilzmycel sichtbar war, wurden verworfen.

Nach 5-8 Wochen waren adventive Sprosse sichtbar und sobald diese das 2-3 Blattstadium erreicht hatten, wurden die Sprosse möglichst tief abgeschnitten und auf F3-Vermehrungsmedium (MS, 10 g Agar/l, 30 g Saccharose/l, 0.1 mg IAA/l, 1 mg Kinetin/l) oder auf phytohormonfreies Medium (MS, 10

g Agar/l, 30 g Saccharose/l) gelegt. Je nach Bedarf wurden diesen Medien noch Antibiotika beigefügt: 20 oder 40 mg Km/l, 250 mg Cefotaxim/l oder 500 mg Carbenicillin/l. Wenn die Sprosse eine Länge von 1-2 cm erreicht hatten, wurden sie in ein größeres Gefäß überführt. Dafür wurde der Boden einer Kunststoff-Petrischale (Greiner 94/16, Greiner Labortechnik) als Deckel für eine mit Medium gefüllte Schale verwendet. Nachdem der Boden vorsichtig aufgesetzt worden war, wurde er mit Parafilm oder sterilem Klebeband (MICROPORE™, 3M) fixiert.

Als Alternative wurden Kunststoffschalen mit den Maßen 60 mm Breite x 85 mm Länge x 65 mm Höhe (Becher 5/47 PS klar, Wächter Kunststoffwarenfabrik, Leopoldshöhe) verwendet. Da es bei diesen Gefäßen aber häufig Probleme mit der Sterilität gab und die Handhabung des Verschlusses umständlich war, wurden sie nur kurzzeitig verwendet.

Nach 4-8 Wochen, je nach Wachstum der Sprosse, wurde das Medium erneut gewechselt und Sprosse mit einer Länge von mehr als 4 cm in 500 ml Weckgläser mit 70 ml MS-Medium (10 g Agar/l, 20 g Saccharose/l, evtl. 0.1 mg IAA/l, 1 mg Kinetin/l) überführt.

Ein weiteres Verfahren für die Kokultur war die Inkubation der Blattscheiben in einer 1:200 (v/v) verdünnten Bakteriensuspension für 36 h bei 24° auf dem Schüttler bei 75 rpm. Diese Versuche wurden bald wieder abgebrochen, da es in keinem Fall auch nur zu einer Kallusbildung kam. Die Blattscheiben entfärbten sich und starben innerhalb kurzer Zeit auf dem Selektivmedium ab.

2.3. Herstellung der Transformationsvektoren

2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Überprüfung von Transformationen wurde Plasmid DNA mittels alkalischer Lyse extrahiert und gereinigt, wie von Ausubel *et al.* (1994) beschrieben. Um Zeit zu sparen, wurde die beschriebene Methode modifiziert: 1 ml LB-Medium in einem 2-ml Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf) wurde mit einer Bakterienkolonie inokuliert. Für ein schnelles Wachstum im LB-Medium war es notwendig, daß die entsprechende Platte direkt aus dem 37°C-Inkubator kam und nicht aus dem Kühlschrank.

Nach 5-6 h auf dem Schüttler (250 rpm, 37°C) war eine für Plasmidpreparationen ausreichende Zelldichte erreicht. Die Proben wurden 30 sec. bei 13.000 rpm (Heraeus Biofuge 13) zentrifugiert und das Pellet in 100 µl GTE-Lösung (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0) resuspendiert. Nach 5 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl NaOH/SDS [0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS] zugefügt, die Probe durch Invertieren gemischt und für 5 min. auf Eis gelagert. Danach wurden 150 µl 5 M K-Acetat pH 4.8 hinzugegeben, die Probe durch mehrfaches Invertieren gut gemischt und 5 min. auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Probe 2 weitere Male durch

Invertieren gemischt und danach 3 min. bei 13.000 rpm (Heraeus Biofuge 13) zentrifugiert. 400 µl des Überstands wurden abgenommen, in ein neues Mikroreaktionsgefäß (1.5-ml Eppendorf) überführt und mit 800 µl 95% Ethanol (+4°C) vermischt.

Nach 2 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe 3 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Pellet noch einmal mit 70% Ethanol (+4°C) gewaschen. Nach einer anschließenden vorsichtigen Trocknung unter Vakuum wurde das Pellet in nur 10 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) aufgenommen. Für einen entsprechenden Restriktionsverdau des gereinigten Plasmids wurden 5 µl eingesetzt. Das oben beschriebene Verfahren eignet sich nur für Plasmide, die in der Bakterienzelle in hoher Kopienzahl vorliegen (z.B. pBluescript II KS+ oder pUC18). Für Plasmide, die nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vorliegen (z.B. pBIN19 und pGJ357), wurden für die Bakterienkultur 3 ml LB-Medium in 10-ml Polypropylen-Röhrchen inokuliert und 12-14 h bei 37°C auf dem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen 5 min. bei 3000g (4000 rpm in Hermle Z383K) zentrifugiert und das in 100 µl GTE gelöste Pellet in ein 1.5-ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Die weitere Vorgehensweise entsprach der oben beschriebenen.

Wurde eine hohe Ausbeute und hohe Reinheit der extrahierten DNA benötigt, z. B. für Ligationen, wurde Plasmid DNA mit Hilfe des „QUIAGEN Plasmid Mini Kit“ (Quiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert und gereinigt. Für Plasmide, die nur in einer niedrigen Kopienzahl in der Bakterienzelle vorliegen, z. B. binäre Vektoren, wurde das "QUIAGEN Plasmid Maxi Kit" (Quiagen) verwendet und als Ausgangsmaterial eine 500 ml Bakteriensuspension benutzt.

2.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens*

Da mit der konventionellen Alkali Methode aus *A. tumefaciens* nur unzureichende Mengen Plasmid-DNA gewonnen werden konnten, mußte ein modifiziertes Verfahren angewandt werden.

1.5 ml LB-Medium wurden in einem Mikroreaktionsgefäß (2-ml Eppendorf) mit einer Bakterienkolonie inokuliert und 18 h bei 27°C auf einem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Danach wurde die Probe 30 sec. bei 13.000 rpm (Heraeus Biofuge 13) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl TEG (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0) resuspendiert und 200 µl 0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS hinzugefügt. Nach 10 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden 150 µl 3 M Na-Acetat pH 4.8 zugegeben. Anschließend wurden 30 µl Phenol/Chloroform (siehe unten) dazu pipettiert, kurz gevortext und die Probe 20 min. bei -20°C eingefroren. Direkt nach dem Auftauen wurde die Probe 15 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort in ein neues Mikroreaktionsgefäß (1.5-ml Eppendorf) überführt und die Plasmid-DNA mit 2.5 Vol. kaltem Ethanol

(+4°C) gefällt. Danach wurde die Probe in einer Kühlzentrifuge (Hermle Z383K) bei 13.000 rpm (16.000 g) für 30 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet noch 2x mit kaltem (+4°C) 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 20 µl TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) aufgenommen.

Das Phenol/Chloroform-Gemisch wurde wie folgt hergestellt: Phenol wurde bei 80°C im Wasser geschmolzen, 500 µl Phenol wurden mit einer Spatelspitze 8-Hydroxyquinolin und 500 µl 1 M Tris-HCl pH 8.0 versetzt und gevortext. Nach einer kurzen Zentrifugation (10 sec., 13.000 rpm) wurde die obere Phase abgenommen und das zurückbleibende Phenol noch einmal mit 500 µl 1 M Tris-HCl pH 8.0, gevortext, zentrifugiert und die obere Phase abpipettiert. Anschließend wurde das Phenol noch 2x mit 500 µl 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 äquilibriert und am Ende mit 500 µl Chloroform versetzt und gut durchmischt.

2.3.3. Transformation von *E. coli*

Die Transformation der DH5AαF' kompetenten Zellen (Gibco BRL) und Identifizierung der Bakterienkolonien mit rekombinanten Plasmiden erfolgte nach Angaben des Herstellers. Plasmid DNA wurde mittels alkalischer Lyse extrahiert und gereinigt, wie von Ausubel *et al.* (1994) beschrieben, und DH5AαF' kompetente Zellen (Gibco BRL) wurden erneut mit dem gereinigten Plasmid transformiert. Plasmid DNA aus retransformierten Zellen wurde mit Hilfe des „QUIAGEN Plasmid Mini Kit“ (Quiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert und gereinigt.

2.3.4. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Als eine schnelle und effektive Methode zur Transformation von *E. coli*- als auch *A. tumefaciens*-Zellen mit Plasmiden hat sich die Elektroporation erwiesen. Bei dieser Technik werden Bakterienzellen kurze Zeit (5-10 ms) einem Hochspannungsfeld ausgesetzt, das transient Löcher in der Zellmembran erzeugt, durch welche die Plasmid-DNA in die Bakterienzelle gelangt (Shigekawa *et al.*, 1988).

Zur Vorbereitung für die Elektroporation mußten die *A. tumefaciens*-Suspensionen von Salzen befreit und konzentriert werden. Hierzu wurden die Zellen mehrfach mit deionisiertem Wasser gewaschen und in einem kleinen Volumen 10%igem Glycerin aufgenommen, so daß eine Zelldichte von ca 10^{11} Zellen/ml erreicht wurde.

Vorbehandlung

Mit einer Bakterien-Kolonie wurden 5 ml Vorkultur (LB-Medium) angeimpft und über Nacht auf dem Schüttler bei 200 rpm und 27°C inkubiert. Das LB-Medium enthielt in allen Schritten Antibiotika, die sicherstellen, daß nur Bakterien mit Helfer-Plasmid wachsen (50 mg Gentamycin/l für GV3101 pMP90). Für den Stamm ATHV pEHA101 ist diese Selektion allerdings nicht möglich, da die Kanamycin-Resistenz auf dem Helfer-Plasmid deletiert ist. Mit 3 ml der Vorkultur wurden 250 ml Hauptkultur inokuliert und ebenfalls über Nacht auf dem Schüttler bei 200 rpm und 27°C inkubiert. Bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0.5-0.6 wurden die Zellen geerntet, indem sie im Eisbad 10-15 min. gekühlt und dann 10 min. bei 3000g in 50-ml Röhren (*Falcon Tubes*) bei 2°C in der Kühlzentrifuge (4000 rpm in Hermle Z383K) zentrifugiert wurden. Auch bei allen weiteren Arbeitsschritten sollten die Zellen kühl gehalten werden, entweder auf Eis oder in der vorgekühlten Zentrifuge. Das Bakterienpellet wurde in insgesamt 200 ml kaltem, sterilem Wasser aufgenommen (40 ml pro Röhren) und ein weiteres Mal wie oben beschrieben zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in insgesamt 100 ml Wasser aufgenommen (20 ml pro Röhren). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in insgesamt 50 ml kaltem, sterilem 10%igem Glycerin aufgenommen (10 ml pro Röhren). Die Suspensionen wurden vereinigt und in 30-ml Glasröhren (Schott Mainz) bei 3000g 10 min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in insgesamt 1 ml (500 µl pro Röhren) kaltem, sterilem 10%igem Glycerin resuspendiert und in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Diese Aliquots wurden direkt für die Elektroporation verwendet oder in 1.5-ml *Nalgene Cryotubes* bei -80°C eingefroren.

Elektroporation

In einem Eisbad wurden die vorbereiteten Zellen aufgetaut und die durch einen QUIA-Miniprep gereinigte Plasmid-DNA sowie die Elektroporationsküvette (BioRad, 0.2 cm Elektrodenabstand) gekühlt. Für eine Elektroporation wurden ca 50-100 ng Plasmid-DNA verwendet (entspricht ca 1-2 µl aus einem QUIA-Miniprep). Am Elektroporator (BioRad Gene Pulser II + Pulse Controller II) wurden folgende Parameter eingestellt: Spannungstärke 2.5 kV, Kapazität 25 µF und Widerstand 200 Ω.

Die Plasmid-DNA (1-2 µl) wurde zu den Zellen (50 µl) pipettiert und gut vermischt. Nach 2 min. Inkubation auf Eis wurde die Bakteriensuspension in die vorgekühlte Küvette gegeben. Diese wurde sorgfältig von Wasser und Eis befreit und in den Probeschlitzen des Elektroporators eingesetzt. Der Spannungsimpuls wurde appliziert, der bei obigen Einstellungen ca. 5 ms dauerte. Sofort nach der Elektroporation wurde 1 ml SOC-Medium [0.5% (w/v) Hefe-Extrakt, 2% (w/v) Trypton, 10 mM

NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glucose] in die Küvette gegeben. Die Bakteriensuspension wurde dann in ein 2-ml Mikroreaktionsgefäß pipettiert und 1 h im Schüttler bei 27°C und 100 rpm inkubiert. Anschließend wurden Aliquots, bzw. entsprechende Verdünnungen, dieser Zellsuspension auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert. Zur Selektion der Transformanten wurden 50 mg Kanamycin/l für auf pBIN19 beruhenden Transformationsvektoren verwendet und für auf pGJ357 basierenden Konstrukten 200 mg Streptomycin/l und 200 mg Spectinomycin/l. Nach 2 Tagen Inkubation bei 27°C wurden Kolonien auf den LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika sichtbar.

2.3.5. Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentrationen von Nukleinsäuren wurden durch zwei verschiedene Methoden bestimmt. Zum einen wurde die Konzentration von DNA bzw. RNA durch deren optische Dichte bei 260 nm bestimmt. Die Messungen erfolgten in einem UV-16101PC Photometer (Shimadzu) in Quarzküvetten (Hellma) mit 1 cm Schichtdicke. Nach Sambrook *et al.* (1989) entspricht bei 260 nm eine optische Dichte von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (42 µg/ml für RNA).

Eine zweite Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen war die Messung mit einem Fluorometer "VersaFluor" (Bio-Rad). Hierbei wurde nach Herstellerangaben das entsprechende "Fluorescent DNA Quantitation Kit" (Bio-Rad) angewandt. Dabei bindet der Farbstoff bis Benzimidazol, ein Fluorochrom, spezifisch an DNA und die Fluoreszenz dieses DNA-Farbstoff-Komplexes kann mit Hilfe des Fluorometers gemessen werden. Die Konzentration der Probe wurde nach Vergleich mit Referenz-DNA-Lösungen bekannter Konzentrationen bestimmt. Eventuell vorhandene RNA in den Proben hatte hierbei keine Auswirkungen auf die DNA-Konzentrationsbestimmung, da der Farbstoff fast ausschließlich an DNA bindet.

2.3.6. Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Um die Klonierung von PCR-Amplifikaten zu erleichtern, wurden die entsprechenden Primer vor der PCR-Reaktion an ihrem 5'-Ende phosphoryliert. Dazu wurde die T4 Polynukleotidkinase (PNK) verwendet, die den Transfer der γ -Phosphatgruppe von ATP an das 5'-Hydroxyl Ende von DNA und RNA katalysiert.

Reaktionsansatz : 5 μ l Oligonukleotide (100 μ M)
 2.5 μ l 10x PNK-Reaktionspuffer (Boehringer Mannheim)
 2.5 μ l 10 mM ATP
 1 μ l T4 Polynukleotidkinase (10 U/ μ l, Boehringer Mannheim)
 14 μ l H₂O

Σ 25 μ l

Inkubation des Reaktionsansatzes für 15 min. bei 37°C, anschließend Inaktivierung der PNK bei 75°C für 10 min..

2.3.7. Amplifikation viraler cDNA-Fragmente

Die für die Konstruktion der LMV-Konstrukte notwendigen Amplifikationsschritte wurden mit *Pwo* DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) aus *Pyrococcus woesei* durchgeführt. Durch seine inherente 3'→5' Exonuklease-Aktivität hat *Pwo* DNA-Polymerase eine um das 10-fache höhere Genauigkeit bei der Amplifikation gegenüber *Taq* DNA-Polymerase. Außerdem hat *Pwo* DNA-Polymerase eine verbesserte Stabilität bei hohen Temperaturen. Durch die 3'→5' Exonuklease-Aktivität der *Pwo* DNA-Polymerase war es notwendig, das Enzym erst direkt vor Beginn der Amplifikation beizufügen. Zu diesem Zweck wurden zwei separate Reaktionsansätze vorbereitet, die erst direkt vor dem Einsetzen der Reaktionsgefäße in die PCR-Maschine vereinigt wurden.

Reaktionsansatz 1: 0.5 μ l 20mM dNTP
 0.2 μ l der jeweiligen Primer (100 μ M)
 1 μ l pLMV15 (25 ng)
 23.3 μ l H₂O

Σ 25 μ l

Reaktionsansatz 2: 5 μ l 10x *Pwo*-PCR Puffer (20 mM MgSO₄)
 0.5 μ l *Pwo* DNA-Polymerase (5 U/ μ l)
 19.5 μ l H₂O

Σ 25 μ l

Der Reaktionsansatz 1 befand sich bereits in 0,2-ml PCR-Gefäßen, die 25 µl des Reaktionsansatzes 2 wurden dazu pipettiert und das PCR-Gefäß direkt in den bereits auf über 70°C vorgeheizten Block der PCR-Maschine gestellt. Die Amplifikation verlief in einem Perkin-Elmer GeneAmp 2400 nach folgendem Schema:

Denaturierung der Probe	94°C	2 min.
-------------------------	------	--------

Danach 35 Amplifikationszyklen:

Matrizendenaturierung	94°C	30 sec.
-----------------------	------	---------

Primeranlagerung	52°C	30 sec.
------------------	------	---------

Elongation	72°C	30 sec.
------------	------	---------

PCR-Amplifikate wurden im Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Banden ausgeschnitten und eluiert. So konnte verhindert werden, daß pLMV15 in Ligationsansätze übertragen wurde und anschließend nach Transformation von *E. coli* durch seine Ampicillin-Resistenz falsch-positive Bakterienkolonien verursachte.

Die von der *Pwo* DNA-Polymerase generierten Amplifikate hatten *blunt-ends* und wurden nach der Eluierung aus dem Agarosegel direkt in entsprechend linearisierte und dephosphorylierte Vektoren kloniert.

2.3.8. Agarose-Gelelektrophorese für DNA

Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer (Midi-S Harnischmacher, Arnsberg) in 1-1,5 %ige Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele und als Laufpuffer wurde 1 x Tris-Borat-EDTA (TBE) verwendet. Die Herstellung der Gelmasse erfolgte durch Zugabe der erforderlichen Menge Agarose in 35 ml 1x TBE und Aufkochen in der Mikrowelle. Nach Abkühlung auf ca 60°C wurde 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg EtBr/ml, Sigma) zugegeben und in die vorbereiteten Gelträger gegossen. Als Standard wurde 1 kb DNA ladder (Gibco) aufgetragen. Die Proben wurden bei 5 V/cm aufgetrennt (Sambrook *et al.* 1989) und im UV-Durchlicht ausgewertet.

2.3.9. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Wenn im Gel aufgetrennte DNA-Fragmente für weitere Klonierungsschritte verwendet werden sollten, wurden sie unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2-ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Eluierung erfolgte mit Hilfe des "JETSORB DNA Extraction-Kit" (Genomed), im Wesentlichen nach Angaben des Herstellers. Sofern das Gewicht des Gelfragments 100 mg nicht überschritt, wurden 300 µl Puffer A1 und 10 µl JETSORB Suspension hinzugefügt. Die Probe wurde gevortext und 15 min. bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde das Mikroreaktionsgefäß 20 sec. bei 11.000 rpm (Heraeus Biofuge 13) zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Bei dem anschließenden Waschen mit Puffer A1 und A2 war darauf zu achten, daß die JETSORB Silicat-Partikel niemals durch Vortexen resuspendiert wurden. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet 30 min. an der Luft getrocknet. Die Elution der DNA von den Silicat-Partikeln geschah durch Zugabe von 15 µl H₂O und anschließender Inkubation für 5 min. bei 60°C. Nach Zentrifugation der Probe für 45 sec. bei 13.000 rpm wurde der Überstand abgenommen, in ein 0.5-ml Mikroreaktionsgefäß überführt und ein weiteres Mal 45 sec. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Durch die zweifache Zentrifugation konnten enzymatische Reaktionen hemmende Silicat-Partikel sicher abgetrennt werden.

2.3.10. Generieren von glatten Enden (*blunt-ends*)

Sollten kohäsive Enden von linearisierten Plasmiden mit glatten Enden (*blunt-ends*) eines Inserts verknüpft werden, mußten zuvor die 5'-Überhänge aufgefüllt, bzw. die 3'-Überhänge abgebaut werden. Das Auffüllen der 5'-Überhänge erfolgte mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*.

Reaktionsansatz: 10 µl restriktionsverdaute Plasmid-DNA (0.5-1 µg)
 0.5 µl dNTPs (10 mM)
 1 µl Klenow-Fragment (2 U/µl, Boehringer Mannheim)
 2 µl 10x Klenow-Fragment Reaktionspuffer
 5.5 µl H₂O

Σ 20 µl

Inkubation des Reaktionsansatzes für 30 min. bei 37°C, anschließend Inaktivierung des Enzyms (10 min., 70°C).

Der Abbau von überstehenden 3'-Enden erfolgte mit T4 DNA-Polymerase aufgrund ihrer im Vergleich zum Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* stärkeren 3'→5' Exonuklease-Aktivität.

Reaktionsansatz: 10 µl restriktionsverdaute Plasmid-DNA (0.5-1 µg)
 0.5 µl dNTPs (10 mM)
 0.75 µl T4 DNA-Polymerase (6 U/µl, Promega)
 2 µl 10x T4 DNA-Polymerase Reaktionspuffer
 16.75 µl H₂O

Σ 20 µl

Inkubation des Reaktionsansatzes für 5 min. bei 37°C, danach Reaktionsstop durch 10 min. bei 75°C.

2.3.11. Dephosphorylierung

Um die Religation eines linearisierten Plasmids bei der Verwendung von Ligase zur Klonierung eines Inserts zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen der kompatiblen Enden des Plasmids entfernt. Hierzu wurde die Shrimp alkalische Phosphatase (SAP) aus arktischen Garnelen verwendet. Sie hat im Gegensatz zu alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm den großen Vorteil, daß sie durch Inkubation bei 65°C vollständig und irreversibel inaktiviert werden kann. Nach dieser Hitzeinaktivierung kann der Reaktionsansatz direkt für Ligationen weiterverwendet werden.

Reaktionsansatz: 10 µl restriktionsverdaute Plasmid-DNA (0.5-1 µg)
 1 µl Shrimp alkalische Phosphatase (1 U/µl, Boehringer Mannheim)
 1.2 µl 10x Dephosphorylierungs-Puffer

Σ 12 µl

Bei kohäsiven Enden wurde der Reaktionsansatz 10 min. bei 37°C inkubiert, bei *blunt-ends* 60 min. bei 37°C. Anschließend wurde die SAP für 15 min. bei 65°C hitzeinaktiviert.

2.3.12. Ligation

Die Ligation der linearisierten Klonierungsvektoren mit den entsprechenden Fragmenten erfolgte unter Verwendung der T4 DNA-Ligase. Für eine effektive Ligationsreaktion sollte das Verhältnis von Vektor zu klonierendem Fragment 1:3 betragen. Die Abschätzung der einzusetzenden Volumina geschah durch Vergleich der Leuchtintensität der im Agarosegel aufgetrennten Banden.

10x Ligationspuffer: 200 mM Tris-HCl, pH 7.6
50 mM ATP
50 mM MgCl₂
50 mM DTT

Ligationsansatz: 7 µl Vektor und Fragment im Mengenverhältnis 1:3
1 µl PEG 4000
1 µl 10x Ligationspuffer
1 µl T4 DNA-Ligase (1U/µl, Boehringer Mannheim)

Σ 10 µl

Der Ligationsansatz wurde 12-16 h bei 14°C (Butterfach des Kühlschranks) inkubiert.

Eine *blunt-end* Ligation erforderte besondere Reaktionsbedingungen: Der Ansatz enthielt zusätzlich 1-1.5 µM Hexamincobalt-III-chlorid und 10-15% (w/v) PEG 4000. Beide Substanzen haben zwei Effekte auf die Ligation. Einerseits erhöhen sie die Ligationsrate um 1-3 Größenordnungen, dies erlaubt Ligationen bei niedrigen Enzym- und DNA-Konzentrationen. Andererseits beeinflussen sie die Verteilung der Ligationsprodukte; intramolekulare Ligationen werden unterdrückt, die Ligationsprodukte entstehen verstärkt aus intermolekularen Verknüpfungen (Sambrook *et al.*, 1989).

10x *blunt-end* Ligationspuffer: 200 mM Tris-HCl, pH 7.6
50 mM MgCl₂
50 mM DTT
5 mM ATP

<i>blunt-end</i> Ligationsansatz:	9 µl Vektor und Fragment im Verhältnis 1:3
	2 µl PEG 4000
	1 µl 20 µM Hexamincobalt-III-chlorid
	2 µl 10x <i>blunt-end</i> Ligationspuffer
	1 µl T4 DNA-Ligase (1U/µl, Boehringer Mannheim)

Σ 15 µl

Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 14°C für 14-18 h.

2.4. Analyse transgener Pflanzen

Der Nachweis einer erfolgreichen Transformation in auf selektiven Medien wachsenden Pflanzen erfolgte durch PCR. Hierfür wurde die genomische DNA aus den Pflanzenzellen extrahiert und als Matrize für die Amplifikation mit konstrukt-spezifischen Primern verwendet. Für diese Versuche wurde ausschließlich *AmpliTaq*® DNA-Polymerase (Perkin-Elmer) verwendet.

2.4.1. Extraktion pflanzlicher Gesamt-DNA

Die für die vorliegende Arbeit verwendete Methode richtet sich nach dem von Edwards *et al.* (1991) beschriebenen Extraktions-Verfahren. Diese Methode eignet sich zur schnellen Extraktion pflanzlicher Gesamt-DNA und ermöglicht die gleichzeitige Bearbeitung einer großen Probenanzahl. Qualität und Ausbeute der extrahierten DNA sind allerdings niedriger als in entsprechenden kommerziellen Extraktions-Kits. Die Qualität der extrahierten Gesamt-DNA ist jedoch für PCR-Nachweise ausreichend.

Blattmaterial (ca. 1 cm²) der zu untersuchenden Pflanzen (*in vitro* oder Gewächshaus) wurde in einem Mikroreaktionsgefäß (1.5-ml Eppendorf) mit einem Mikropistill zermörsert. Ein vorheriges Einfrieren der Proben bei -20°C erleichterte das Aufschließen des Pflanzengewebes. Nach der Homogenisierung des Materials wurde 400 µl Extraktionspuffer zugegeben [200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% (w/v) SDS]. Anschließend erfolgte eine 30 min. Inkubation bei 65°C im Wasserbad. Nach Abkühlen der Proben im Eisbad wurde 400 µl Chloroform (-20°C) zugegeben und 5 sec. gevortext. Die Probe wurde dann 2 min. bei 13.000 rpm (Heraeus Biofuge 13) zentrifugiert. 300 µl des Überstands wurden abgenommen und mit 300 µl kaltem Isopropanol (+4°C) gemischt.

Eventuell konnte auf den Chloroform-Reinigungsschritt verzichtet werden, wenn eine niedrigere Ausbeute toleriert werden konnte. Anschließend wurde die Probe bei Raumtemperatur 2 min. inkubiert und 5 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das Pellet mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) aufgenommen. Die Probe wurde 30 min. bei 65°C im Wasserbad resuspendiert und danach über Nacht im Kühlschrank (+4°C) gelagert. Danach wurde die Probe 1 min. bei 13.000 rpm zum Abtrennen ungelöster Bestandteile zentrifugiert und 5 µl des Überstands zur quantitativen und qualitativen Kontrolle der Extraktion auf ein Agarosegel aufgetragen. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem "Fluorescent DNA Quantitation Kit" (Bio-Rad) im Fluorometer wurden die aus *O. ecklonis* gewonnenen Proben 1:5 (v/v) verdünnt.

Für PCR-Nachweise des Transgens wurden pauschal 1µl der Gesamt-DNA als Matrize eingesetzt.

2.4.2. Nachweis des *nptII*-Gens

Der Nachweis des *nptII*-Gens, das in der T-DNA aller Transformationsvektoren (außer pBAR-SPL3) als Selektionsmarker vorhanden ist, erfolgte durch PCR mit den Primern NPTII-3 und NPTII-5.

Reaktionsansatz:	0.2 µl 20 mM dNTPs
	0.5 µl Primer NPTII-3 (100 µM)
	0.5 µl Primer NPTII-5 (100 µM)
	3 µl MgCl ₂ (25 mM)
	5 µl 10x PCR-Puffer II (ohne MgCl ₂)
	0.3 µl <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)
	1 µl genomische Pflanzen-DNA
	39.5 µl H ₂ O

Σ 50 µl

Die Amplifikation verlief nach folgendem Schema:

Denaturierung der Probe	94°C	1 min.
Danach 40 Amplifikationszyklen:		
Matrizendenaturierung	94°C	20 sec.
Primeranlagerung	55°C	20 sec.
Elongation	72°C	45 sec.

2.4.3. Nachweis des LMV-Prot Konstrukts

Der Nachweis dieses Konstrukts erfolgte in transformierten *N. benthamiana* (T1- und T2-Generation) und *O. ecklonis*.

Reaktionsansatz:	0.2 µl 20 mM dNTPs
	0.3 µl Primer PCASS (100 µM)
	0.3 µl Primer LMV6260R (100 µM)
	3 µl MgCl ₂ (25 mM)
	5 µl 10x PCR-Puffer II (ohne MgCl ₂)
	0.3 µl <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)
	1 µl genomische Pflanzen-DNA
	39.9 µl H ₂ O

Σ 50 µl

Die Amplifikation verlief nach folgendem Schema:

Denaturierung der Probe	94°C	3 min.
Danach 40 Amplifikationszyklen:		
Matrizendenaturierung	94°C	30 sec.
Primeranlagerung	58°C	30 sec.
Elongation	72°C	1 min.

Anschließend ein verlängerter Elongationsschritt:

72°C	7 min.
------	--------

Um die geeignetesten Bedingungen für die Primeranlagerung zu finden, wurden für beide Pflanzen (*N. benthamiana* und *O. ecklonis*) verschiedene Versuche mit Temperaturen zwischen 53°C und 61°C durchgeführt.

2.4.4. Multiplex-PCR

Für *N. benthamiana* wurde noch eine weitere PCR-Methode zum Nachweis des pGJ-LMV-Prot Konstrukts eingesetzt, die Multiplex-PCR (Mannerlöf & Tenning, 1997). Bei dieser Methode wird neben dem Nachweis des Transgens noch eine interne Kontrolle amplifiziert, hier ein Fragment des Gens für NADH-Dehydrogenase, *nad5* (Ecke *et al.*, 1990). Die Amplifikation des Transgens und der internen Kontrolle ergibt in der Multiplex-PCR nach Auftrennen im Agarosegel zwei Banden. Bei einer untransformierten Pflanze ist nur das Fragment der amplifizierten internen Kontrolle sichtbar.

Reaktionsansatz:	0.4 µl 20 mM dNTPs
	0.2 µl Primer PCASS (100 µM)
	0.2 µl Primer LMV6260R (100 µM)
	0.5 µl Primer NAD5-5 (100 µM)
	0.5 µl Primer NAD5-3 (100 µM)
	3 µl MgCl ₂ (25 mM)
	5 µl 10x PCR-Puffer II (ohne MgCl ₂)
	0.4 µl <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)
	1 µl genomische Pflanzen-DNA
	38.8 µl H ₂ O

Σ 50 µl

Die Amplifikation verlief nach folgendem Schema:

Denaturierung der Probe	94°C	3 min.
Danach 40 Amplifikationszyklen:		
Matrizendenaturierung	94°C	30 sec.
Primeranlagerung	58°C	30 sec.
Elongation	72°C	1 min.
Anschließend ein verlängerter Elongationsschritt:		
	72°C	3 min.

2.4.5. Nachweis der CORE Konstrukte

Der Nachweis dieser Konstrukte erfolgte in regenerierten *O. ecklonis* mit den Primern, die für die Herstellung der Transformationsvektoren verwendet wurden.

Reaktionsansatz:	0.2 µl 20 mM dNTPs
	0.3 µl Primer CORE1 (100 µM)
	0.3 µl Primer CORE2 (100 µM)
	3 µl MgCl ₂ (25 mM)
	5 µl 10x PCR-Puffer II (ohne MgCl ₂)
	0.3 µl <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)
	1 µl genomische Pflanzen-DNA
	39.9 µl H ₂ O

Σ 50 µl

Die Amplifikation verlief nach folgendem Schema:

Denaturierung der Probe	94°C	3 min.
Danach 40 Amplifikationszyklen:		
Matrizendenaturierung	94°C	30 sec.
Primeranlagerung	55°C	30 sec.
Elongation	72°C	1 min.
Anschließend ein verlängerter Elongationsschritt:		
	72°C	3 min.

2.4.6. Nachweis von *Agrobacterium tumefaciens* in regenerierten Pflanzen

Der Nachweis erfolgte mit Primern, die ein Fragment des für *A. tumefaciens* charakteristischen Gens *chvE* amplifizieren.

Reaktionsansatz:	0.2 µl 20 mM dNTPs
	1 µl Primer CHVE-5 (12 µM)
	1 µl Primer CHVE-3 (12 µM)
	3 µl MgCl ₂ (25 mM)
	5 µl 10x PCR-Puffer II (ohne MgCl ₂)
	0.5 µl <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)
	1 µl genomische Pflanzen-DNA
	38.3 µl H ₂ O

Σ 50 µl

Die Amplifikation verlief nach folgendem Schema:

Denaturierung der Probe	94°C	3 min.
Danach 40 Amplifikationszyklen:		
Matrizendenaturierung	94°C	30 sec.
Primeranlagerung	55°C	30 sec.
Elongation	72°C	1 min.

2.4.7. Nachweis des SPL3-Konstrukts

Der Nachweis des SPL3-Konstrukts in *O. ecklonis* Regeneraten erfolgte mit einer Primer-Kombination, die im CaMV 35S Promotor und innerhalb des SPL3-Gens bindet.

Reaktionsansatz:	0.2 µl 20 mM dNTPs
	1 µl Primer SPL3-35S (12 µM)
	1 µl Primer SPL3-241 (12 µM)
	3 µl MgCl ₂ (25 mM)
	5 µl 10x PCR-Puffer II (ohne MgCl ₂)
	0.5 µl <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)
	1 µl genomische Pflanzen-DNA
	38.3 µl H ₂ O

Σ 50 µl

Die Amplifikation verlief nach dem gleichen Schema wie beim Nachweis des Gens *chvE* aus *A.tumefaciens*. Zur Optimierung der PCR wurden jedoch hier verschiedene Temperaturen für die Primeranlagerung verwendet, die zwischen 52°C und 60°C variierten.

2.4.8. NptII-ELISA

Der nptII-enzyme *linked immunosorbent assay* (ELISA) ermöglicht den serologischen Nachweis von exprimiertem NeomycinphosphotransferaseII(nptII)-Protein in Blattrohextrakten transgener Pflanzen. Sämtliche Lösungen und Antikörper wurden dem nptII-ELISA *Kit* der Firma 5 Prime → 3 Prime, Inc. (Boulder, UK) entnommen.

Mit je 200 µl verdünntem, polyklonalem, nptII-spezifischem Antikörper [1:900 -1:1.300 (v/v) in *coating* - Puffer, jeweils nach Herstellerangabe für die entsprechende Charge] wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gefüllt und mit Parafilm verschlossen 2 h bei 37°C inkubiert. Die Antikörperlösung wurde entfernt, pro Vertiefung 400 µl Blockpuffer zugegeben und 30 min. bis über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem und allen anderen Arbeitsschritten wurde die Mikrotiterplatte jeweils 5x mit Waschpuffer gespült. Es folgte die Zugabe von 200 µl Probe bzw. nptII-Standard (200 pg/200 µl und 20 pg/200 µl) oder Leerwert und anschließend eine 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur. Es schlossen sich eine einstündige Inkubation mit dem biotinylierten Antikörper [1:1.500 (v/v), 200 µl/Vertiefung] und eine 30-minütige Inkubation mit der streptavidinkonjugierten alkalischen Phosphatase [1:1.500 (v/v), 200 µl/Vertiefung] jeweils bei Raumtemperatur an.

Durch Zugabe von 200 µl Substratlösung [0.2 % (w/v) p-Nitrophenylphosphat in Diethanolamin-Puffer] wurde die Phosphatase-Reaktion gestartet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurde das gebildete p-Nitrophenol bei 405 nm in einem Photometer (Anthos 2010, Anthos Mikrosysteme, Krefeld) bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms "WinRead V 2.1" (Anthos Labtec, Krefeld).

2.4.9. GUS-Färbung

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

Färbelösung:

- 1 mM X-GlucA (Duchefa, Niederlande)
- 15 mM EDTA
- 0.5 mM Kaliumhexacyanoferrat(II), $K_4Fe(CN)_6$
- 50 mM Phosphat-Puffer (pH 7.0)
- 1% (v/v) Triton X-100

Zum histochemischen Nachweis in Kallus-Gewebe wurden Mikroreaktionsgefäße (0.2-ml) mit 50 μ l Färbelösung befüllt und anschließend das Explantat eingebracht. Zur besseren Penetration der Lösung in das Gewebe wurde in einer *Speed-Vac* für eine Minute Vakuum angelegt. Die Probe wurde anschließend für 3-6 Stunden bei 37°C inkubiert. Um die entstehende Blaufärbung in grünem Pflanzengewebe deutlich sichtbar zu machen, wurde das Explantat mit 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur entfärbt. Zur Beschleunigung dieses Vorgangs kann die Inkubationstemperatur auf 50°C erhöht werden. Größere Blätter oder ganze Pflanzen wurden in entsprechend größeren Gefäßen (2-ml Mikroreaktionsgefäße, 30 ml Glasröhrchen) behandelt. Die Explantate sollten dabei immer ganz von der Färbelösung bedeckt sein. Nach der Entfärbung können die Proben unter Lichtabschluß in 70%igem Ethanol aufbewahrt werden.

2.5. Medien und Puffer

LB-Medium	5 g Hefeextrakt /l
	10 g Pepton (Kasein) /l
	10 g NaCl /l
	evtl. 15 g Agar /l
	pH 7.0 - 7.5
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8
	1 mM Na_2EDTA
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) 1 x	90 mM Tris-HCl pH 8
	90 mM Borsäure
	2 mM Na_2EDTA

MS-Medium (nach Murashige & Skoog, 1962)

Dieses Medium ist ein Standardmedium für die *in vitro*-Kultur von Pflanzen und wurde ursprünglich für die Etablierung von Gewebekulturen aus *Nicotiana tabacum* verwendet. Die unten angegebene Zusammensetzung bezieht sich auf die Modifikation "Micro and Macro elements including Vitamins" (Duchefa, Niederlande; Bestell-Nr.: M 0222).

Chemikalien	Menge in mg/l	Konzentration
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.11 µM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.10 µM
FeNaEDTA	36.70	0.10 mM
H ₃ BO ₃	6.20	0.10 mM
KJ	0.83	5.00 µM
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90	0.10 mM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1.03 µM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60	29.91 µM
CaCl ₂	332.02	2.99 mM
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25 mM
KNO ₃	1900.00	18.79 mM
MgSO ₄	180.54	1.50 mM
NH ₄ NO ₃	1650.00	20.61 mM
Glycin	2.00	26.64 µM
myo-Inositol	100.00	0.56 mM
Nicotinsäure	0.50	4.06 µM
Pyridoxin-HCl	0.50	2.43 µM
Thiamin-HCl	0.10	0.30 µM

Tab. 6 : Zusammensetzung MS-Medium

3. ERGEBNISSE

3.1. Vermehrung von *lettuce mosaic potyvirus* auf *Lactuca sativa*

Zur Erhaltung und Vermehrung des Virus-Materials für weitere Versuche wurde *lettuce mosaic potyvirus* (LMV) - hier Stamm E wegen der höheren Virulenz - auf einem geeigneten Wirt propagiert.



Abb. 4 : Symptomausprägung von LMV-E auf Salat (*Lactuca sativa* cv. Trocadero), 2 Wochen nach mechanischer Inokulation. Links gesunde Kontrolle, rechts Blatt einer inokulierten Pflanze mit virustypischer Mosaikbildung.

Nach der mechanischen Inokulation von Salat (*Lactuca sativa* cv. Trocadero) mit LMV-E waren nach 10-12 Tagen die ersten Symptome einer systemischen Infektion sichtbar. Von 8 gleichzeitig und unter den gleichen Bedingungen inokulierten Salatpflanzen waren jedoch nur auf 6 Symptome sichtbar. Die beiden anderen Pflanzen entwickelten bis zum Ende des Versuchs (nach 8 Wochen) kein Krankheitsbild. Auf den Blättern der systemisch infizierten Pflanzen zeigten sich die für LMV namensgebenden, mosaikartigen Verfärbungen, im weiteren Verlauf wurden die Blätter gelb und starben zum Teil ab. Das Wachstum der infizierten Pflanzen war stark eingeschränkt und 4 der 6 systemisch infizierten Pflanzen starben nach 4-6 Wochen vollständig ab.

Für die Aufbewahrung des Virus wurden Blätter mit starker Symptomausprägung ausgewählt, die noch keine nekrotischen Bereiche aufwiesen, und bei -80°C eingefroren.

3.2. Klonierung der Transformationsvektoren

3.2.1. Klonierung von pGJ-LMV-Prot

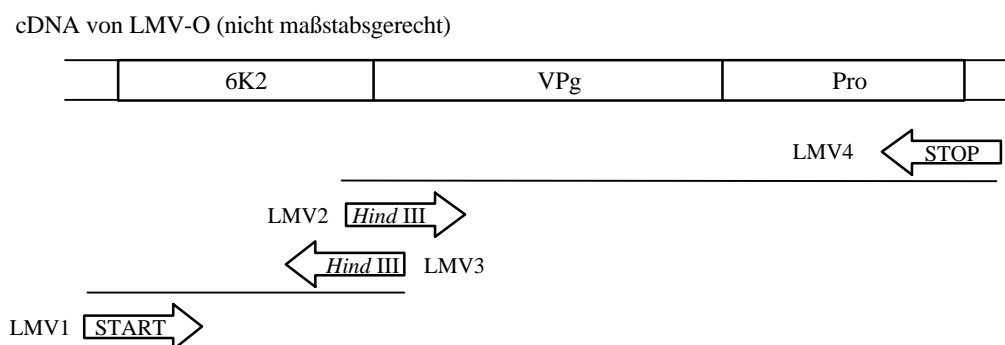


Abb. 5 : Schematische Darstellung der PCR-Strategie. Primer LMV1 dient zur Einfügung des Startkodons, Primer LMV4 zur Einfügung des Stopkodons und Primer LMV2 und LMV3 fügen eine *Hind III* - Schnittstelle an der Position der ursprünglichen Proteinase-Schnittstelle zwischen 6K2 und VPg ein.

Ausgangsmaterial für die Klonierung der Konstrukte mit pathogen-abgeleiteten Nukleotidsequenzen war die cDNA des Stamms LMV-O (*lettuce mosaic potyvirus*). Zur Konstruktion eines Transformationsvektors, der die Expression eines Teils des Polyproteins ermöglichen soll, wurde durch PCR ein Fragment amplifiziert, das die Gene für das 6K2 Protein, sowie für NIa mit seinen beiden Domänen VPg und Pro umfaßt. Da innerhalb der kodierenden Sequenz für das Polyprotein keine Start- und Stopkodons vorhanden sind, mußten diese Translationssignale durch die Primer LMV1 (Startkodon) und LMV4 (Stopkodon) eingefügt werden. Die Proteinase-Schnittstelle HQ/GK zwischen 6K2 und VPg wurde durch die eine *Hind III* - Schnittstelle einfügenden Primer LMV2 und LMV3 zerstört. Dabei wurden die für die Aminosäuresequenz HQGK kodierenden Nukleinsäuren durch für die Aminosäuresequenz KACK kodierende ersetzt. Diese Mutation soll verhindern, daß die Proteinase-Domäne (Pro) von NIa zwischen 6K2 und VPg schneidet. Die durch die Mutation entstehende *Hind III* - Schnittstelle dient sowohl der Zusammenfügung der beiden PCR-Fragmente als auch der Kontrolle des entstehenden Konstrukts im Restriktionsverdau. Die Primer LMV1 und LMV4 tragen jeweils noch *Eco RV*-Schnittstellen, um die Klonierung des Transformationsvektors zu erleichtern.

Legende für die Abb. 6 (nächste Seite):

Ω : Ω -leader Sequenz vom nicht-kodierenden 5'-Ende des viralen Genoms von TMV, LMV1-3: durch Amplifikation mit den Primern LMV1 und LMV3 hergestelltes LMV-Fragment, LMV2-4: durch Amplifikation mit den Primern LMV2 und LMV4 hergestelltes LMV-Fragment.

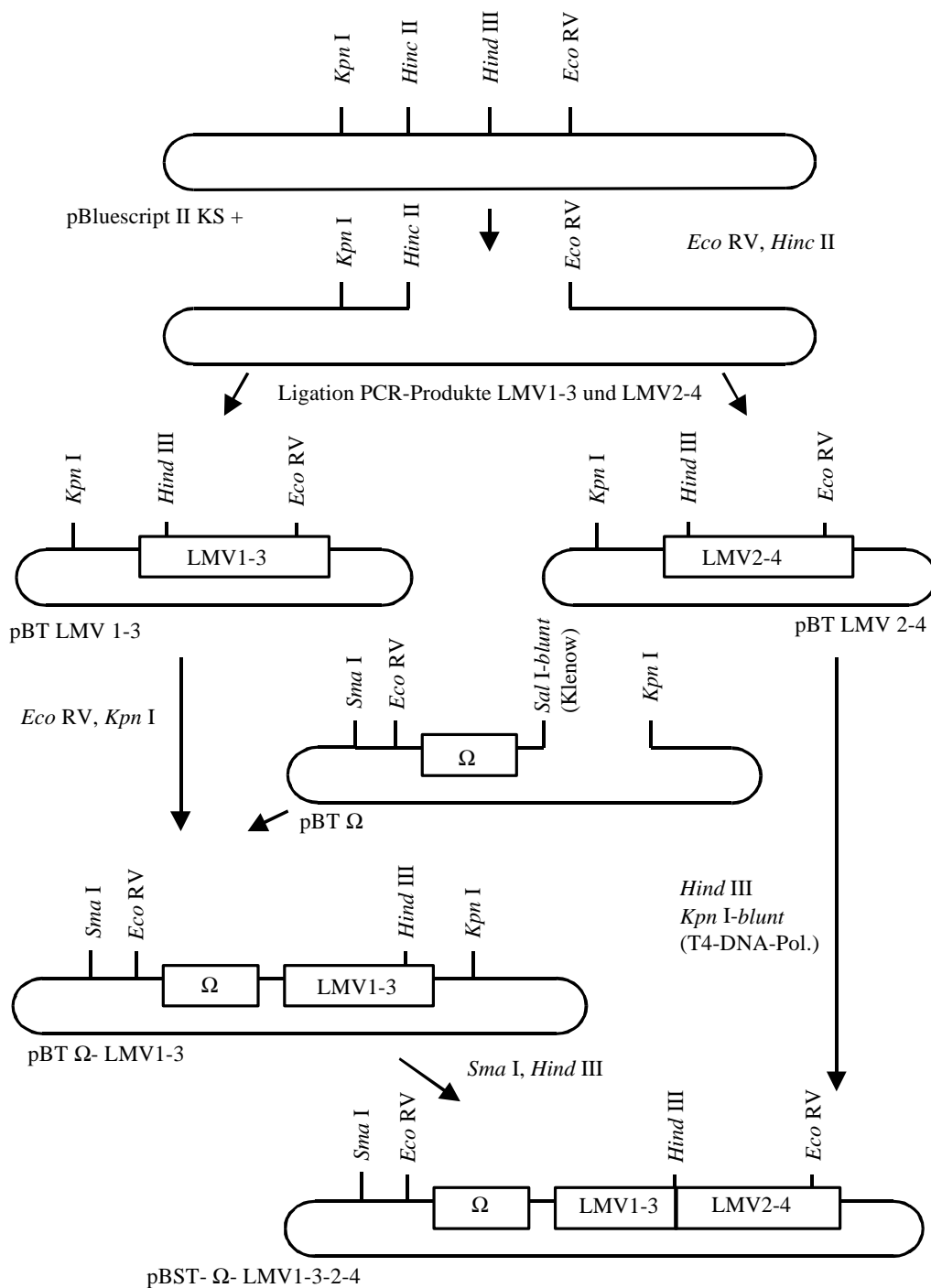


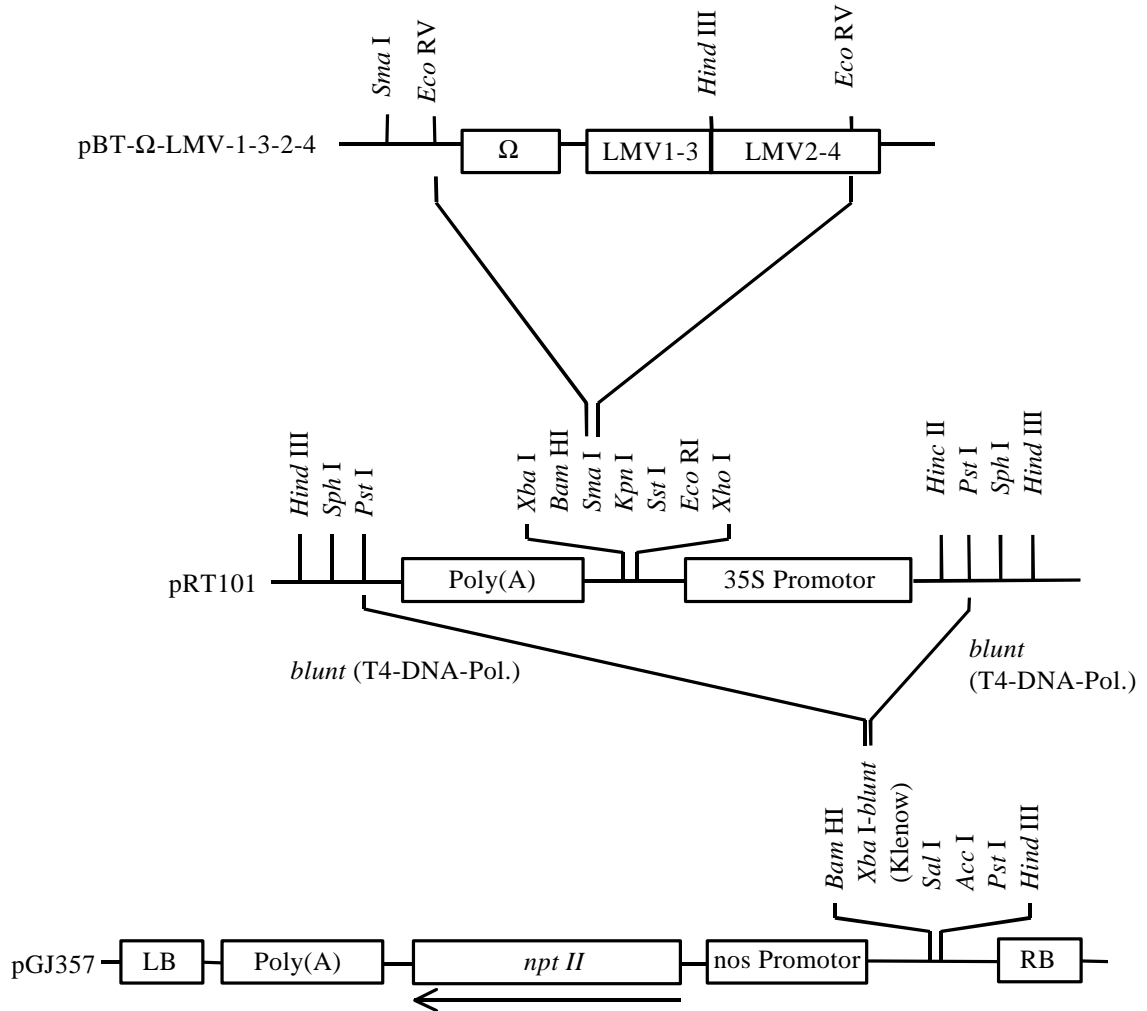
Abb. 6 : Schematische Darstellung der zur Herstellung des 6K2-VPg-Pro-Konstrukts notwendigen Klonierungsschritte. Legende: siehe vorhergehende Seite.

Der ursprüngliche Plan, die beiden PCR-Fragmente direkt nach der Amplifikation mit *Hind* III zu schneiden, die dabei entstehenden kompatiblen Enden zu ligieren und dann in einem Schritt die mutierte LMV-Sequenz in den Vektor pBT Ω zu klonieren, konnte nicht erfolgreich umgesetzt werden. Daher mußten die beiden Fragmente einzeln nach der Amplifikation in entsprechende Vektoren kloniert werden, um dann in mehreren Schritten zum endgültigen Konstrukt zusammengefügt zu werden.

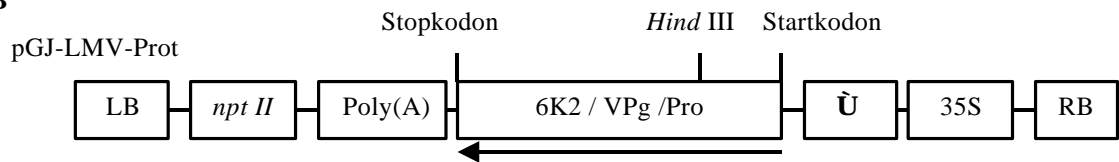
Die Amplifikate der Primer-Kombinationen LMV1+LMV3 und LMV2+LMV4 wurden jeweils in mit *Hinc* II und *Eco* RV linearisierten pBluescript II KS+ eingefügt. Durch die Verwendung von *Eco* RV und *Hinc* II konnte die *Hind* III-Schnittstelle des Vektors eliminiert werden. Aus dem durch die Klonierung des PCR-Produkts der Primer LMV1+LMV3 entstehenden Vektor pBTLMV1-3 wurde das Amplifikat durch die im Primer LMV1 sitzende *Eco* RV-Schnittstelle und *Kpn* I aus dem *polylinker* wieder herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde in den Vektor pBT Ω eingefügt, der durch *Sal* I-Verdau linearisiert und die entstehenden überhängenden 5'-Enden durch Behandlung mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt wurden (*blunt*). Anschließend wurde das linearisierte Plasmid noch mit *Kpn* I geschnitten. In dem durch die Ligation entstehenden Vektor pBT Ω -LMV1-3 befindet sich das erste Fragment der mutierten cDNA von LMV-O in der richtigen Orientierung hinter der Ω -Sequenz. Durch *Sma* I und *Hind* III wurde diese Kombination von Ω -Sequenz und mutiertem LMV cDNA Fragment ausgeschnitten und in das Plasmid pBTLMV2-4 kloniert. Dieses Plasmid wurde zuvor mit *Kpn* I linearisiert, die entstehenden überhängenden 3'-Enden wurden durch die Exonuklease-Aktivität von T4-DNA-Polymerase entfernt, und das Plasmid anschließend noch mit *Hind* III geschnitten. Das durch die Ligation entstandene Plasmid, pBT- Ω -LMV1-3-2-4, enthält die Ω -Sequenz und direkt im Anschluß daran die mutierte cDNA von LMV-O mit der eingefügten *Hind* III-Schnittstelle, Start- und Stopkodon und einer zusätzlichen *Eco* RV-Schnittstelle. Dieses Konstrukt wurde mit *Eco* RV ausgeschnitten und *blunt* in die mit *Sma* I geöffnete Expressions-Kassette aus pRT101 ligiert. Die entsprechenden Sequenzen aus pRT101 waren zuvor in den Transformationsvektor pGJ357 kloniert worden. Dafür waren das polyA-Signal und der 35S Promotor mit *Pst* I ausgeschnitten worden und die überhängenden 3'-Enden durch Behandlung mit T4 DNA-Polymerase entfernt worden. Diese Expressions-Kassette wurde *blunt* in den mit *Xba* I linearisierten Transformationsvektor pGJ357 kloniert, dessen überstehende 5'-Enden zuvor durch Behandlung mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt worden waren.

Der so entstandene Transformationsvektor pGJ-LMV-Prot enthält in seiner T-DNA das Gen *npt* II zur Selektion transgener Pflanzen mit Kanamycin unter der Kontrolle des *nos* Promotors und Polyadenylierungs-Signals. Dazu kommt in gleicher Leserichtung das mutierte LMV-Konstrukt 6K2/VPg/Pro - unter Kontrolle des 35S Promotors und Polyadenylierungs-Signals -, dessen Translation durch die vorgeschaltete Ω -Sequenz aus TMV verstärkt werden soll.

A



B



Startkodon, Stopkodon und die eingeführte *Hind III* - Schnittstelle (zerstörte Protease-Schnittstelle) sind durch PCR eingefügt worden.

Abb. 7 : A: Strategie zur Klonierung des Transformationsvektors pGJ-LMV-Prot
 B: T-DNA des Transformationsvektors pGJ-LMV-Prot
 Legende: siehe nächste Seite.

3.2.2. Klonierung der CORE-Konstrukte

Für die Konstruktion der Transformationsvektoren, die die Transkription eines Teils des CP Gens in der transgenen Pflanze ermöglichen sollen, wurde ebenfalls die cDNA des Stamms LMV-O verwendet. Es wurde ein nicht-translatierbares Fragment des CP Gens amplifiziert, in dem - im Gegensatz zum LMV-Prot Konstrukt - durch die PCR kein Startkodon eingefügt wurde.

Das Amplifikat wurde im Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten, eluiert und in *Eco* RV linearisierten pBluescript II KS+ ligiert. Über die in der PCR eingefügten *Sal* I- und *Xho* I-Schnittstellen konnte das Fragment wieder ausgeschnitten werden und über die *Xho* I-Schnittstelle in die Expressions-Kassette aus pRT101 eingefügt werden. Die entsprechenden Sequenzen aus pRT101 waren zuvor in den Transformationsvektor pGJ357 kloniert worden, wie für den Transformationsvektor pGJ-LMV-Prot beschrieben.

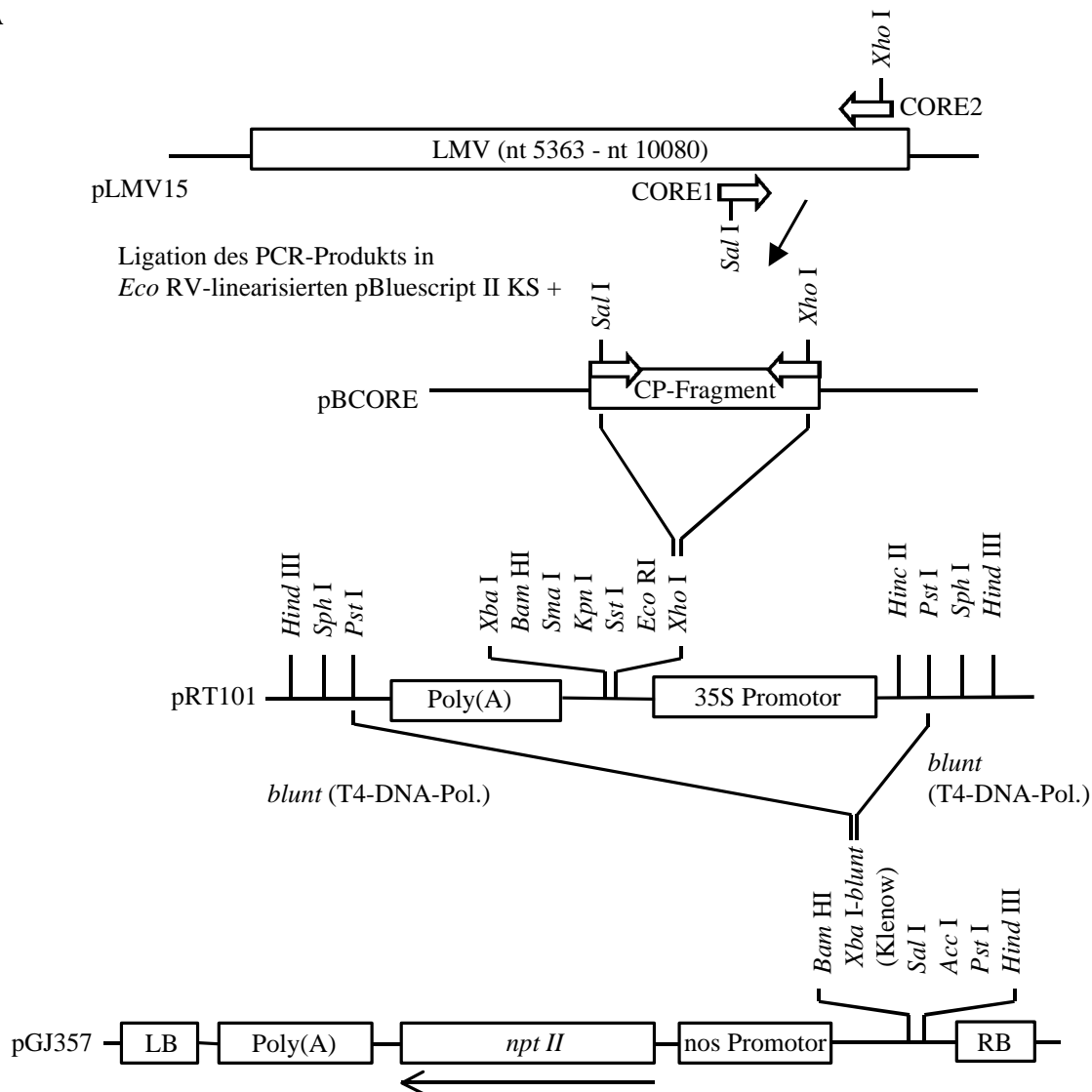
Die Klonierung über die kompatiblen Schnittstellen *Sal* I und *Xho* I in eine *Xho* I-Schnittstelle ermöglichte eine einfache Kontrolle der Orientierung der Ligation, da jeweils an einem Ende des PCR-Fragments die durch Restriktionsverdau detektierbare *Xho* I-Schnittstelle wiederhergestellt wurde.

Die Konstruktion der Tandem-Konstrukte *sense-sense* und *sense-antisense* mißlang mehrfach und wurde schließlich aufgegeben. In diesen Konstrukten sollte hinter das amplifizierte Fragment eine zweite Kopie inseriert werden, einmal in gleicher und einmal in entgegengesetzter Leserichtung.

Legende für die Abb. 7 und 8 :

LB: *left border* der T-DNA, RB: *right border* der T-DNA, *nos*-Promotor: Nopalinsynthetase-Promotor, Poly(A): Polyadenylierungs-Signal, 35S: 35S Promotor aus CaMV, *npt II*: Gen für Neomycinphosphotransferase II

A



B

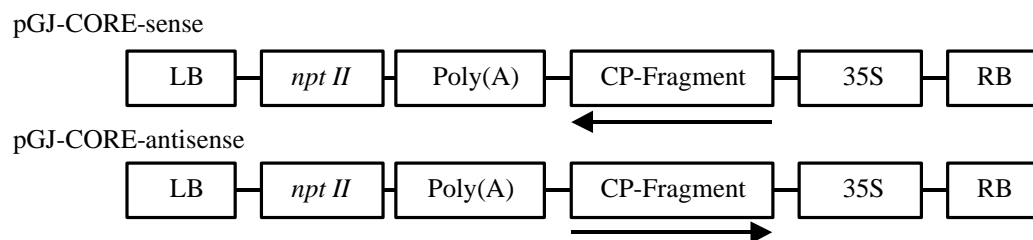


Abb. 8 : A: Strategie zur Klonierung der Transformationsvektors pGJ-CORE-sense und -antisense
 B: T-DNA der Transformationsvektoren pGJ-CORE-sense und pGJ-CORE-antisense
 Legende: siehe vorhergehende Seite.

3.2.3. Klonierung von pNPTII-SPL3

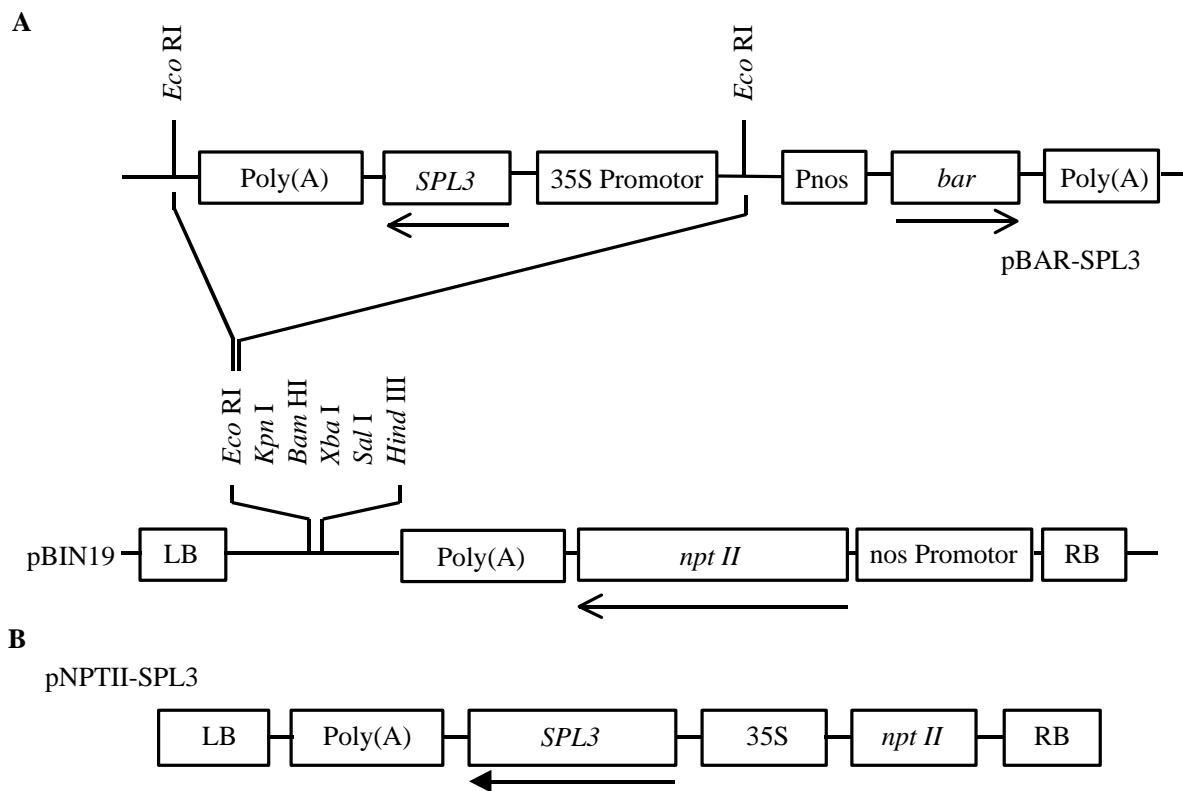


Abb. 9 : A: Strategie zur Klonierung des Transformationsvektors pNPTII-SPL3

B: T-DNA des Transformationsvektors pNPTII-SPL3

Legende:

LB: *left border* der T-DNA, RB: *right border* der T-DNA, *nos*-Promotor: Nopalin-Synthetase-Promotor, Poly(A): Polyadenylierungs-Signal, 35S: 35S Promotor aus CaMV, *npt II*: Gen für Neomycinphosphotransferase II, *bar*: Gen für Phosphinotricin-Acetyl-Transferase

Da sich im Verlauf der Experimente herausstellte, daß das zu Herbizidresistenz (Phosphinotricin, "Basta®") führende *bar*-Gen als Selektionsmarker für *Osteospermum ecklonis* ungeeignet ist, mußte das *SPL3*-Gen in einen Transformationsvektor mit *npt II*-Gen in der T-DNA überführt werden. Hierfür wurde die *SPL3*-Expressionskassette aus pBAR-SPL3 mit *Eco RI* ausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Eco RI* geschnittenen *polylinker* von pBIN19 ligiert. Der dadurch entstandene Transformationsvektor pNPTII-SPL3 enthält in seiner T-DNA das Gen *npt II* und das *SPL3*-Konstrukt in gleicher Leserichtung.

3.3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Plasmid	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stamm		
	GV3101 pMP90	ATHV pEHA101	LBA4404 pAL4404
p222-GUS			X
pROK2275	X	X	
pGUS-INTRON	X		
pBAR-SPL3	X	X	
pBINGFP	X		
pGJ-LMV-Prot		X	
pNPTII-SPL3		X	
pGJ-CORE-sense		X	
pGJ-CORE-antisense		X	

Tab. 6 : In den Transformationsexperimenten verwendete Kombinationen von *Agrobacterium*-Stamm und binärem Vektor

Für die Transformationsexperimente mit *O. ecklonis* und *N. benthamiana* wurden verschiedene Kombinationen von *A. tumefaciens*-Stamm und binärem Vektor verwendet. Bis auf die Kombination LBA4404 pAL4404 mit dem das Reportergen GUS tragenden binären Vektor p222-GUS, der in dieser Zusammenstellung schon bereit stand, wurden alle in der Tab. 4 zusammengefaßten Kombinationen durch Elektroporation selbst hergestellt. Die Transformation von *A. tumefaciens* war in allen Elektroporationsversuchen erfolgreich und resultierte in jedem Fall in einer hohen Ausbeute ($> 10^3$ Transformanten pro Elektroporation). Das in Kap. 2.3.4. beschriebene Verfahren zur Herstellung von salzarmen *Agrobacterium*-Suspensionen in 10% (v/v) sterilem Glycerin erwies sich als sehr zuverlässig. Es kam in keinem Fall zu einem Spannungsüberschlag in der Elektroporationsküvette und auch die Elektroporation bei -80°C gelagerter Bakteriensuspensionen ergab ausreichend hohe Transformationsraten. Die *A. tumefaciens*-Stämme GV3101 pMP90 und ATHV pEHA101 ließen sich mit allen Konstrukten auf Basis der binären Vektoren pBIN19 und pGJ357 erfolgreich transformieren. Ein Unterschied in der Transformationseffizienz war zwischen den beiden Stämmen nicht erkennbar. Es zeigte sich jedoch, daß es für eine erfolgreiche Regeneration transformierter Agrobakterien

unbedingt notwendig ist, das SOC-Medium direkt nach der Elektroporation in die Küvette zu pipettieren und die anschließende Inkubationszeit von 1 h bei 27°C nicht zu unterschreiten.

Der Nachweis der erfolgreichen Elektroporation der Agrobakterien erfolgte zunächst durch Ausplattieren der Bakteriensuspension auf LB-Platten mit selektiven Antibiotika. Darüber hinaus wurden das GUS Gen enthaltende Bakterien (mit Ausnahme des GUS Konstrukts mit Intron) direkt durch Zugabe von X-GlcA einem enzymatischen GUS Test unterzogen. Die Transformation mit Konstrukten, die Teile des LMV Genoms enthalten, wurde durch PCR mit Primern, die auch für die Klonierung verwendet wurden, überprüft.

3.4. Regeneration von *O. ecklonis*

Medium mg IES/mg BAP pro l MS-Medium	<i>Osteospermum ecklonis</i> -Sorten							
	Lila mini	pp26/95	Mira	Gemma	Sirius	Castor	Arctur	Pollux
K 0.5/0	0 % (n=26)	3 % (n=30)	0 % (n=27)	0 % (n=30)	0 % (n=24)	4 % (n=25)	4 % (n=26)	8 % (n=26)
I 0.5/0.5	41 % (n=22)	97 % (n=33)	100 % (n=29)	66 % (n=29)	83 % (n=24)	46 % (n=24)	86 % (n=29)	96 % (n=25)
II 0.5/1	15 % (n=20)	100 % (n=36)	96 % (n=27)	57 % (n=30)	73 % (n=26)	85 % (n=26)	92 % (n=26)	100 % (n=26)
III 0.5/1.5	13 % (n=23)	100 % (n=27)	50 % (n=28)	50 % (n=26)	59 % (n=27)	75 % (n=24)	89 % (n=28)	96 % (n=24)
IV 0.5/2	0 % (n=27)	93 % (n=29)	43 % (n=30)	32 % (n=28)	37 % (n=27)	77 % (n=26)	54 % (n=26)	66 % (n=29)
V 0.5/2.5	0 % (n=27)	97 % (n=29)	31 % (n=32)	21 % (n=29)	41 % (n=27)	56 % (n=25)	33 % (n=27)	40 % (n=25)

Tab. 7 : Regeneration von *O. ecklonis* bei verschiedener Phytohormon-Konzentrationen. Angegeben sind der Anteil (in %) Blattscheiben mit induzierten adventiven Sprossen an der Gesamtzahl (n) aufgelegter Blattscheiben.

In einem Vorversuch für die Transformation von *Osteospermum ecklonis* wurde zunächst das optimale IES/BAP-Konzentrationsverhältnis zur Induzierung adventiver Sprosse aus Wundkallus von

Blattscheiben ermittelt. Von *in vitro* Pflanzen wurden ca. 5 mm x 5 mm große Blattstücke ausgeschnitten, mit wenigen Stichen oder Schnitten perforiert und auf MS-Medium mit unterschiedlichen Phytohormon-Konzentrationen aufgelegt. An den Wundstellen entsteht zunächst Kallus-Gewebe, aus dem später adventive Sprosse entstehen. Die Auswertung des Versuchs erfolgte nach 5 Wochen Inkubation in der Klimakammer.

Es zeigte sich, daß bei allen getesteten Sorten, mit Ausnahme 'Lila mini', bei geeigneter Kombination von IES und BAP eine gute bis sehr gute Induktion der Kallusbildung und der Regeneration adventiver Sprosse erzielt werden konnte. In einigen Fällen zeigten sogar alle aufgelegten Blattscheiben Sproßbildung : 'pp26/95' auf Medium II und Medium III, 'Mira' auf Medium I und 'Pollux' auf Medium II.

Auf Medien, die insgesamt die Bildung adventiver Sprosse sehr gut förderten, wurden häufig 2-4 Sprosse pro Blattscheibe gebildet. Auf Medien mit ungünstigen Phytohormon-Konzentrationen (Regenerationsrate unter 40 %) war gewöhnlich nur ein einziger adventiver Sproß vorhanden.

Aufgrund der Ergebnisse wurde beschlossen, für die folgenden Versuche zur Etablierung eines Transformationsprotokolls die Sorten aus dem *SPRINGSTAR*®-Programm zu verwenden : 'Mira', 'Gemma', 'Sirius', 'Castor', 'Arctur' und 'Pollux'. Diese Sorten befanden sich in der Saison 98/99 im Verkaufsprogramm der Firma Kientzler. Die Sorte 'Lila mini' wurde auf Grund ihrer schlechten Regenerationsfähigkeit von weiteren Versuchen ausgeschlossen. Ebenfalls von weiteren Untersuchungen ausgenommen wurde die Sorte 'pp26/95' wegen ihrer geringen züchterischen Relevanz, obwohl 'pp26/95' von allen getesteten Sorten die im Durchschnitt für alle Medien höchste Regenerationsrate aufwies.

Die Phytohormon-Konzentrationen für die folgenden Versuche richteten sich nach dem Medium II, mit dem für die Sorten des *SPRINGSTAR*®-Programms die im Durchschnitt höchsten Regenerationsraten erzielt wurden : 84 % (im Vergleich zu 80 % bei Medium I und 70 % bei Medium III). Für die weiteren Transformations- und Regenerationsversuche wurden daher 0.5 mg IES und 1 mg BAP pro Liter MS-Medium verwendet.

3.5. Selektionsmarker für *O. ecklonis*

Zunächst wurde getestet, welches Agens zur Selektion transgener Pflanzen für *O. ecklonis* geeignet ist. Es wurden zwei Substanzen getestet, Kanamycin (Antibiotikum) und Phosphinotricin (Herbizid). In einem Vorversuch wurde der Einfluß verschiedener Konzentrationen der Substanzen im Nährmedium auf das Wachstum von Sprossen untersucht.

Sorte	mg PPT/l MS-Medium								
	0	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2	5	20
Sirius	10	10	10	10	8	0	0	0	0
Gemma	10	10	10	9	5	0	0	0	0

Tab. 8 : Wachstum von *O. ecklonis*-Sprossen auf PPT-haltigem MS-Medium. Angegeben ist die Anzahl von Sprossen, bei denen drei Wochen nach Einstecken in das Medium Wachstum sichtbar war. Pro Probe wurden 10 Sprosse eingesteckt.

Bei dem Versuch mit PPT zeigte sich, daß die Pflanzen schon auf sehr geringe Mengen dieser Substanz empfindlich reagieren. Abgeschnittene *in vitro*-Sprosse wurden in PPT-haltiges MS-Medium eingesteckt und nach drei Wochen wurde das Wachstum der Sprosse kontrolliert. Bereits ab 1 mg PPT/l war nicht nur weiteres Wachstum eingestellt, die Sprosse waren auch vollständig abgestorben. Auch bei den Konzentrationen 0.5 und 0.2 mg PPT/l war bereits ein deutlicher Effekt sichtbar. Es kam zwar noch zu weiterem Wachstum, dieses war aber gering im Vergleich zum Wachstum auf PPT-freiem Medium und die von Sprossen angelegten Blätter zeigten bereits braune Verfärbungen. Bei den Konzentrationen 0.1 und 0.05 mg PPT/l konnte keine Veränderung des Wachstums oder der Blattfarbe beobachtet werden.

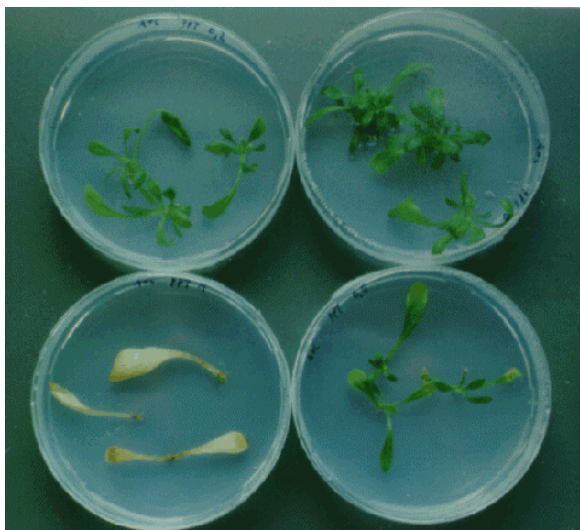


Abb. 10 : Einfluß von PPT auf das Wachstum von *O. ecklonis*-Sprossen

oben rechts : MS-Medium ohne PPT

oben links : MS-Medium mit 0.2 mg PPT/l

unten rechts : MS-Medium mit 0.5 mg PPT/l

unten links : MS-Medium mit 1 mg PPT/l

Für Kanamycin konnte gezeigt werden, daß Konzentrationen über 50 mg/l Medium zum Absterben der Sprosse führten. Niedrigere Konzentrationen erlaubten weiteres Wachstum der Sprosse, aber bereits ab 10 mg Km/l Medium entfärbten sich neugebildete Blättchen. Es wuchsen weiße oder schwach grün längsgestreifte Blättchen, die in ihrer Form keine Besonderheit aufwiesen.

Sorte	mg Km/l MS-Medium				
	0	10	20	50	100
Sirius	10	10	10	2	0
Gemma	10	10	9	3	0

Tab. 9 : Wachstum von *O. ecklonis*-Sprossen auf Km-haltigem MS-Medium. Angegeben ist die Anzahl von Sprossen, bei denen drei Wochen nach Einstecken in das Medium Wachstum sichtbar war. Pro Probe wurden 10 Sprosse eingesteckt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde beschlossen, Km als selektives Agens für transformierte *O. ecklonis* zu verwenden, da die Empfindlichkeit gegenüber PPT zu stark erschien und die Pflanzen auch schon bei sehr geringen Konzentrationen in ihrem Wachstum deutlich gestört wurden. Es wurde davon ausgegangen, daß die Pflanzen bei der Regeneration über adventive Sprosse noch sensibler reagieren.

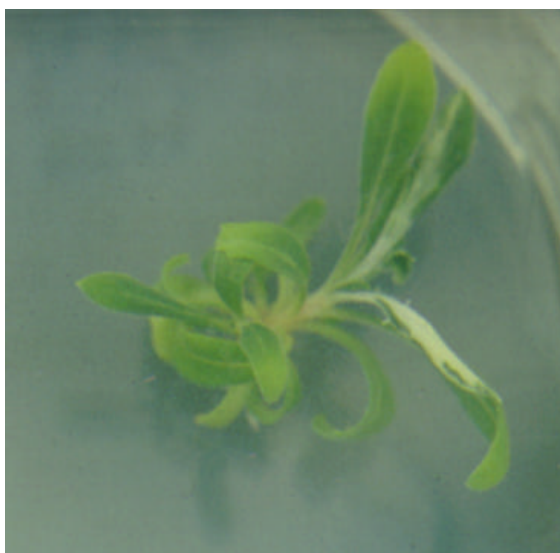


Abb. 11 : Wachstum von *O. ecklonis* 'Gemma' auf Km-haltigem MS-Medium (20 mg/l). Beim rechts wachsenden Sproß bleiben neugebildete Blättchen zum Teil weiß.

3.6. Antibiotika zum Eliminieren von *A. tumefaciens*

Nachdem ein geeignetes selektives Agens für *O. ecklonis* ermittelt worden war, wurde der Einfluß von selektivem Agens (Kanamycin in verschiedenen Konzentrationen) in Kombination mit Antibiotika zur Eliminierung von *A. tumefaciens* auf die Regeneration untersucht. Durch die Zugabe geeigneter Antibiotika müssen die Agrobakterien nach der Kokultur abgetötet werden. Werden die Agrobakterien nur unvollständig eliminiert, kommt es später zu einer Verbreitung überlebender Bakterien im regenerierten Gewebe und dadurch eventuell zum Absterben der Pflanze. Dieser Fall tritt verstärkt dann auf, wenn Regenerate von antibiotikahaltigem auf antibiotikafreies Medium umgesetzt werden.

Es zeigte sich, daß die Regenerationsrate aufgelegter Blattscheiben nur durch die Km-Konzentration im Medium bestimmt wird, die Zugabe von 250 mg Cefotaxim/l oder 500 mg Carbenicillin/l hatte keinen Einfluß auf die Bildung adventiver Sprosse aus Blattscheiben. Die Versuchsergebnisse ergaben, daß die Pflanzenzellen bezüglich Kallusbildung und Anlage adventiver Sprosse empfindlicher gegenüber Km sind, als beim Wachstum eingesteckter Sprosse in Km-haltigem Medium. Während das Weiterwachsen eingesteckter Sprosse erst ab Konzentrationen von 10-20 mg Km/l gehemmt wird, führt bei der Regeneration von Blattscheiben bereits eine Konzentration von 5 mg Km/l zu einer deutlich verringerten Anzahl sproßbildender Blattscheiben. Auch bei diesem Versuch war der Effekt sichtbar, daß auf Km-haltigem Medium zum Teil Sprosse gebildet wurden, die weiß oder fast weiß waren. Ab einer Konzentration von 20 mg Km/l waren fast alle gebildeten Sprosse völlig ausgebleicht.

Die in Abb. 12 gezeigten Werte geben den Anteil (in % der Gesamtanzahl aufgelegter Blattscheiben) Blattscheiben an, aus deren Kallusgewebe adventive Sprosse entstanden waren, ungeachtet des Phänotyps und der Anzahl der Sprosse.

Aufgrund der Ergebnisse wurden zwei Km-Konzentrationen ausgewählt, bei denen die nachfolgenden Transformationsexperimente durchgeführt werden sollten: 20 und 40 mg Km/l. Bei diesen Konzentrationen war die Regeneration der untransformierten Pflanzen deutlich gehemmt und evtl. doch aus nicht transgenen Zellen entstehende Sprosse waren durch ihr bleiches Aussehen klar zu erkennen. Zur Eliminierung von *A. tumefaciens* wurde für die nachfolgenden Transformationsversuche Carbenicillin (500 mg/l) oder Cefotaxim (250 mg/l) verwendet, beide Antibiotika scheinen in diesen Konzentrationen keinen negativen Einfluß auf die Bildung adventiver Sprosse zu haben.

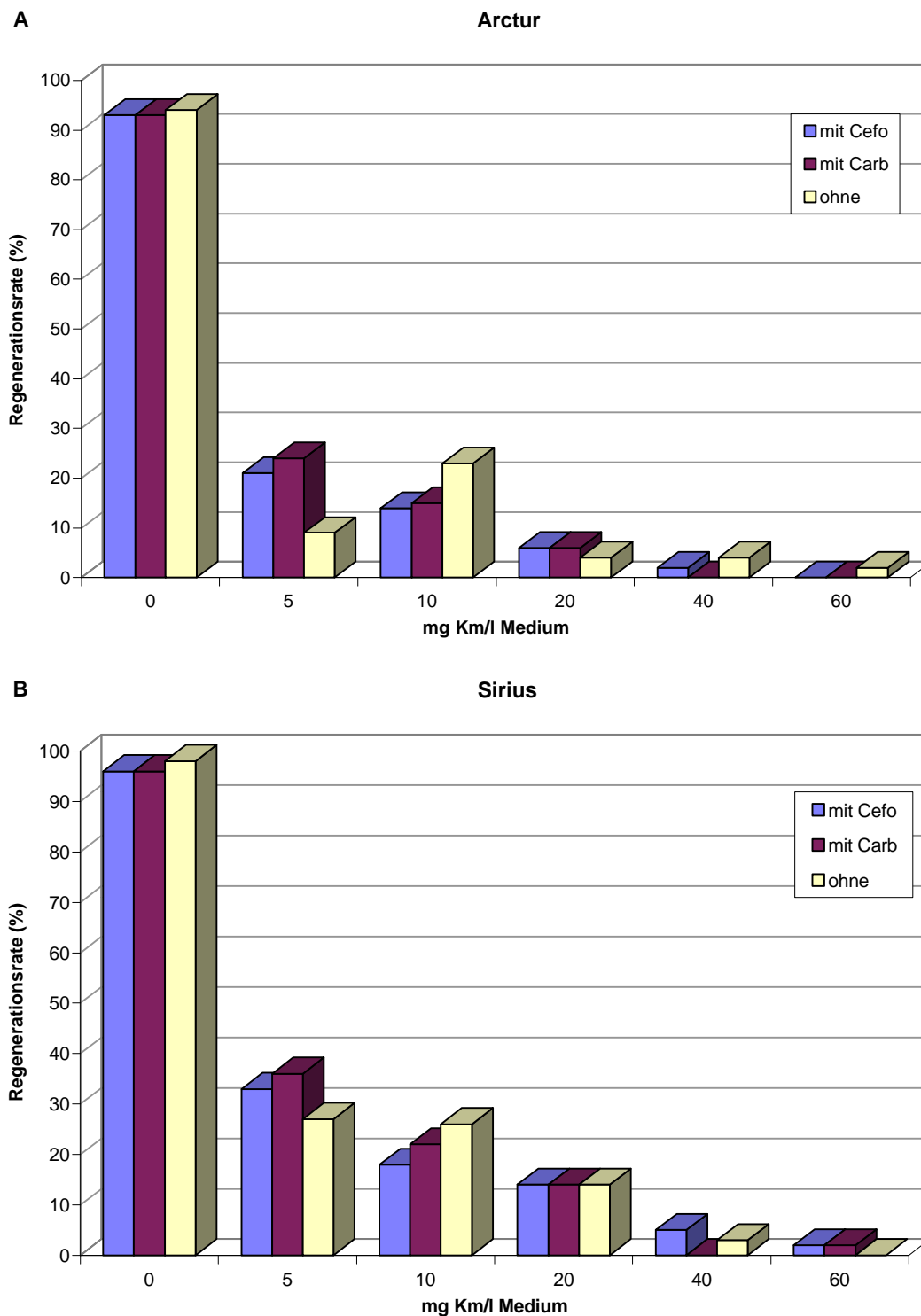


Abb. 12 : Regenerationsrate aufgelegter Blattscheiben (n=Anzahl Blattscheiben) von *O. ecklonis* (A: Sorte 'Arctur', B: Sorte 'Sirius') bei verschiedenen Antibiotikakonzentrationen: 250 mg Cefotaxim/l, 500 mg Carbenicillin/l oder ohne Antibiotikum zum Eliminieren der Agrobakterien in Kombination mit verschiedenen Kanamycin-Konzentrationen.

3.7. Transformation von *O. ecklonis*

<i>A. tumefaciens</i> -Stamm und Transformationsvektor	<i>Osteospermum ecklonis</i> -Sorten					
	Arctur	Castor	Gemma	Mira	Pollux	Sirius
LBA4404 p222-GUS	0/130		0/110	0/50		0/48
GV3101 pROK2275	0/182		19/242	0/86		0/26
ATHV pROK2275	1/244	0/218		11/320		16/285
GV3101 pGUS-INTRON		16/340				
GV3101 pBAR-SPL3	0/60		0/124			
ATHV pBAR-SPL3		0/95		0/138	0/125	
GV3101 pBINGFP	0/238		0/246			
ATHV pGJ-LMV-Prot	3/245	0/175	2/230	1/180		1/160
ATHV pNPTII-SPL3	2/260			4/652		4/315
ATHV pGJ-CORE-sense		4/320			0/144	
ATHV pGJ-CORE-antisense		2/82	0/246	0/160		

Tab. 10 : Transformation von *O. ecklonis*. Angegeben ist die Anzahl an Blattscheiben, die innerhalb 15-16 Wochen grüne Sprosse gebildet haben, und die Gesamtanzahl aufgelegter Blattscheiben.

Für die Transformationsexperimente mit *O. ecklonis* wurden insgesamt 6394 Blattsegmente mit *A. tumefaciens*-Stämmen kokultiviert und anschließend auf selektives MS-Medium aufgelegt. Vergleicht man dazu die Anzahl an Blattscheiben, die innerhalb von 15-16 Wochen nach Beginn der Kokultur grüne Sprosse gebildet haben (74), so ergibt sich eine durchschnittliche Regenerationsrate für alle Versuche von ungefähr 1.2 %. Allerdings schwanken die Werte für einzelne Versuchsglieder (Kombination *O. ecklonis*-Sorte/*A. tumefaciens*-Stamm + Konstrukt) erheblich. Die höchste Regenerationsrate wurde bei der Transformation der Sorte 'Gemma' mit GV3101 pROK2275 erzielt: 7.9 %. Im Gegensatz dazu wurde bei allen anderen getesteten Sorten - 'Arctur', 'Mira' und 'Sirius' - kein einziger Sproß nach Kokultur mit GV3101 pROK2275 regeneriert.

Bei der Sorte 'Pollux' konnte kein einziger grüner Sproß regeneriert werden, obwohl bei den Vorversuchen zur Ermittlung der geeigneten Phytohormon-Konzentration zur Induktion adventiver

Sprosse die Sorte 'Pollux' von allen *SPRINGSTAR*-Sorten auf Medium II die höchste Regenerationsrate zeigte (100 %). Die Sorte 'Sirius' zeigte das stärkste Längenwachstum adventiver Sprosse. Insgesamt zeichnete sich diese Sorte durch schnelle Regeneration, kräftige Kallusbildung und robustes *in vitro*-Wachstum aus.

Die Anzahl der grünen Sprosse entspricht nicht der tatsächlichen Anzahl erfolgreich regenerierter, nachweislich transgener Pflanzen. Das Auszählen der Sprosse erfolgte willkürlich zu dem Zeitpunkt (15-16 Wochen nach Beginn der Kokultur), an dem Blattscheiben ohne erkennbare Kallusbildung aussortiert und autoklaviert wurden. Von den zu diesem Zeitpunkt gebildeten grünen Sprossen bleichten einige noch aus, andere zeigten Kontamination mit Bakterien und starben ab.

Für die Selektion transgener Pflanzen wurden zwei Km-Konzentrationen verwendet, 20 mg/l und 40 mg/l. Bezogen auf die Anzahl grüner Sprosse konnte keine deutliche Differenz zwischen der Regenerationsrate bei den beiden unterschiedlichen Konzentrationen festgestellt werden. Bei 20 mg Km/l wurden allerdings mehr weiße oder chimär weiße Sprosse gebildet.

Trotz der negativen Ergebnisse im Vorversuch wurde für einen Transformationsversuch auch PPT als selektives Agens für ein entsprechendes Konstrukt eingesetzt. Die erfolglosen Regenerationsversuche nach Kokultur mit GV3101 pBAR-SPL3 bestätigten das Ergebnis des Vorversuchs. Weder auf MS-Medium mit 0.5 mg PPT/l, noch auf 1 mg PPT/l bildeten sich adventive Sprosse. Es bildete sich bei beiden Konzentrationen an den Kontaktstellen Blattscheibe/Medium ein braunes, schwammartiges Kallusgewebe, an dem häufig bakterielle Kontaminationen sichtbar waren. Kurz darauf wurde die gesamte Blattscheibe braun und starb ab.

3.8. Transformation von *N. benthamiana*

N. benthamiana wurden nur mit einem einzigen Konstrukt transformiert, pGJ-LMV-Prot in *A. tumefaciens*-Stamm ATHV. Bei diesem Versuch konnten von 140 aufgelegten Blattscheiben auf Km-haltigem (100 mg Km/l) Medium 46 Sprosse (auf 31 Blattscheiben) regeneriert werden. Bezogen auf den Anteil sproßbildender Blattscheiben an der Gesamtanzahl aufgelegter Blattscheiben ergibt sich eine Transformations- und Regenerationsrate von 22.1 %. Nach 5-6 Wochen wurden die 42 Sprosse möglichst tief abgeschnitten und auf neue, phytohormonfreie MS-Platten übertragen. Von den übertragenen 42 Sprossen begannen 35, in dem selektiven Medium Wurzeln zu entwickeln. Davon wurden 9 Sprosse von unabhängigen Blattscheiben erfolgreich von der *in-vitro* Kultur ins Gewächshaus übertragen. Alle in Erdkultur umgesetzten Sprosse hatten in MS-Medium mit 100 mg Km/l Wurzeln gebildet.

3.9. Analyse transgener *Osteospermum ecklonis*

3.9.1. GUS-Färbung

Die ersten Transformationsversuche an *O. ecklonis* wurden mit einem einfach nachzuweisenden Reportergen, dem für das Enzym GUS (β -D-Glucuronidase) kodierenden *uidA*-Gen, durchgeführt. Die erfolgreiche Transformation pflanzlicher Zellen kann durch den Nachweis der enzymatischen Aktivität des exprimierten Transgens nachgewiesen werden. Hierbei wird ein farbloses Substrat (X-GlcA) in einen wasserunlöslichen blauen Farbstoff umgewandelt.



Abb. 13 : GUS-Färbung von ATHV pROK2275-transformierter *O. ecklonis* 'Sirius'. Rechts transgene, nicht-chimäre Pflanze mit Blaufärbung an allen Blättern, links untransformierte Kontrolle.

In einer ersten Überprüfung von Kallusgewebe, das sich 2-3 Wochen nach der Kokultur auf selektivem Medium gebildet hatte, konnte für alle GUS-Konstrukt/*A. tumefaciens*-Kombinationen im histochemischen GUS-Test eine Blaufärbung nachgewiesen werden. Zu diesem frühen Zeitpunkt kann ein falsch-positives Ergebnis des Tests jedoch nicht ausgeschlossen werden, weil nicht nur transformierte Pflanzenzellen, sondern auch überlebende Agrobakterien das entsprechende Enzym exprimieren, da der 35S Promotor auch in *A. tumefaciens* erkannt wird. Um diesen Fehler auszuschließen, wurde im Verlauf der Experimente das Konstrukt pGUS-INTRON eingeführt. Das im *uidA*-Gen enthaltene Intron verhindert eine Expression des Enzyms GUS in Bakterien.

Die in Abb. 7 gezeigte Pflanze ging aus einer Transformation von *O. ecklonis* 'Sirius' mit pROK2275 (in *A. tumefaciens* ATHV) hervor. Der regenerierte adventive Sproß wurde vollständig einem GUS-Test unterzogen und anschließend entfärbt. Die Expression des transgenen *uidA*-Gens in der Pflanze ist durch die deutliche Blaufärbung erkennbar, im Gegensatz zur farblosen untransformierten Kontrolle. Die Blaufärbung der Pflanze in allen Bereichen läßt darauf schließen, daß es sich um ein nicht-chimäres transgenes Regenerat handelt. Es wurden jedoch auch Sprosse getestet, die nach der GUS-Färbung nur in Teilbereichen blaue Farbe zeigten (Daten nicht gezeigt). In diesem Fall kann davon ausgegangen werden, daß der adventive Sproß aus mehreren Ursprungszellen regeneriert wurde und nicht alle Ursprungszellen in der Kokultur mit dem entsprechenden GUS-Konstrukt transformiert worden waren. Beim GUS-Test mit ganzen Pflanzen zeigte sich, daß das kurzzeitige Anlegen eines Vakuums zwar das anschließende Eindringen der Substratlösung in das Gewebe erleichtert, aber insgesamt die Struktur der Pflanze, insbesondere der Blätter, beschädigt. Die so behandelten Pflanzen wurden beim Pipettieren leicht beschädigt. Eine längere Inkubationszeit (6 h) führte ebenfalls zu einer kräftigen Blaufärbung GUS-exprimierender Zellen und wurde daher bevorzugt für den Test ganzer Sprosse verwendet. Wurden jedoch nur kleine, gegen mechanische Beschädigung unempfindliche Explantate getestet, z. B. Kallusproben, dann wurde zur Beschleunigung des Testverfahrens weiterhin ein kurzzeitiges Vakuum (2-3 min.) angelegt.

Die Expression intronloser GUS-Konstrukte in Agrobakterien erschwerte die Unterscheidung zwischen pflanzlicher und bakterieller GUS-Aktivität, besonders in einem frühen Stadium der Regeneration. Zu einem späteren Zeitpunkt, wenn die regenerierten Sprosse ohne sichtbare bakterielle Kontamination auf Medien ohne Carbenicillin bzw. Cefotaxim wuchsen, konnte ausgeschlossen werden, daß eine vollständige Blaufärbung der Pflanze durch GUS-exprimierende Agrobakterien verursacht wurde. Zum Teil zeigten sich aber in getesteten Pflanzen nur vereinzelte blaue Punkte, in diesen Fällen schien eine Kontamination durch Agrobakterien, die eines der GUS-Konstrukte ohne Intron enthielten, wahrscheinlich. Bei der Verwendung des GUS-Konstrukts mit Intron wurde in keinem Fall eine punktuelle Blaufärbung eines getesteten adventiven Sprosses festgestellt.

Im GUS-Test vollständig blau gefärbte Pflanzen wurden sowohl durch Selektion auf 20 mg Km/1 als auch auf 40 mg Km/1 erzeugt.

Das *Green fluorescent protein* (GFP) konnte als nicht-invasives Reportergen für *O. ecklonis* nicht getestet werden, da nach entsprechenden Transformationsversuchen keine adventiven Sprosse regeneriert wurden. Auch bei der Untersuchung von auf selektivem Medium entstandenen Kallusgewebe, 2-3 Wochen nach Kokultur mit GV3101 pBINGFP, konnte im Fluoreszenzmikroskop keine charakteristische Grünfärbung detektiert werden.

3.9.2. Extraktion von pflanzlicher Gesamt-DNA

Die von Edwards *et al.* (1991) beschriebene Methode zur schnellen Extraktion von pflanzlicher Gesamt-DNA wurde auf ihre Anwendbarkeit für *O. ecklonis* überprüft.

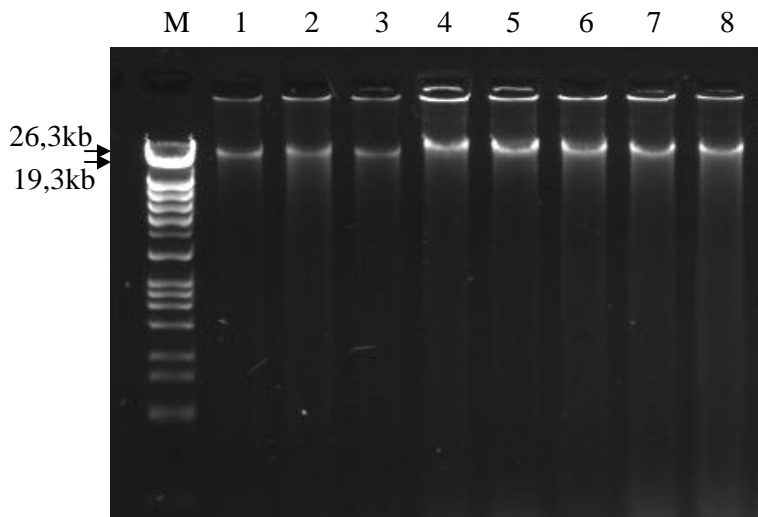


Abb. 14 : Gesamt-DNA aus *O. ecklonis* im Agarosegel.

M = Größenstandard (Lambda DNA/*Eco*130I/*Mlu*I, MBI Fermentas), 1-8 = DNA-Extraktionen (nach Edwards *et al.*, 1991) von 8 *in vitro* *O. ecklonis* 'Mira', aufgetragen jeweils 5 μ l.

Die extrahierte Gesamt-DNA zeigte sich im Agarosegel als singuläre hochmolekulare Bande, deren Laufgeschwindigkeit im Bereich der größten DNA-Fragmente des Markers (26282 bp und 19329 bp) lag. Die Ausbeute der Extraktion (nach Abschätzung der Leuchtintensität im Gel und fluorometrischer Bestimmung) schwankte stärker als bei der Extraktion aus *N. benthamiana* (Daten nicht gezeigt), aber die erzielten Mengen waren für PCR-Nachweise ausreichend. Die fluorometrische Bestimmung der Konzentrationen der extrahierten Gesamt-DNA ergab Werte zwischen 15 ng DNA/ μ l und 46 ng DNA/ μ l. Die Methode wurde erfolgreich sowohl für Gewächshauspflanzen als auch für *in vitro*-Kulturen verwendet.

Die mit diesem Verfahren erzielten Konzentrationen an Gesamt-DNA waren für einen PCR-Nachweis ausreichend, so daß für die nachfolgenden Versuche jeweils 1 μ l als Matrize eingesetzt wurde. Im Gegensatz zu *N. benthamiana* konnte bei der Extraktion aus *O. ecklonis* nicht auf den Chloroform-Reinigungsschritt verzichtet werden. Wurde die entsprechende Stufe des Protokolls übergangen, konnte am Ende der Reinigung keine DNA detektiert werden.

3.9.3. Nachweis des SPL3-Konstrukts in *O. ecklonis*

In regenerierten *O. ecklonis*, die auf selektivem Km-haltigem Medium wuchsen, wurde die Transformation mit dem in pBIN19 umklonierten SPL3-Konstrukt (pNPTII-SPL3) durch PCR nachgewiesen.

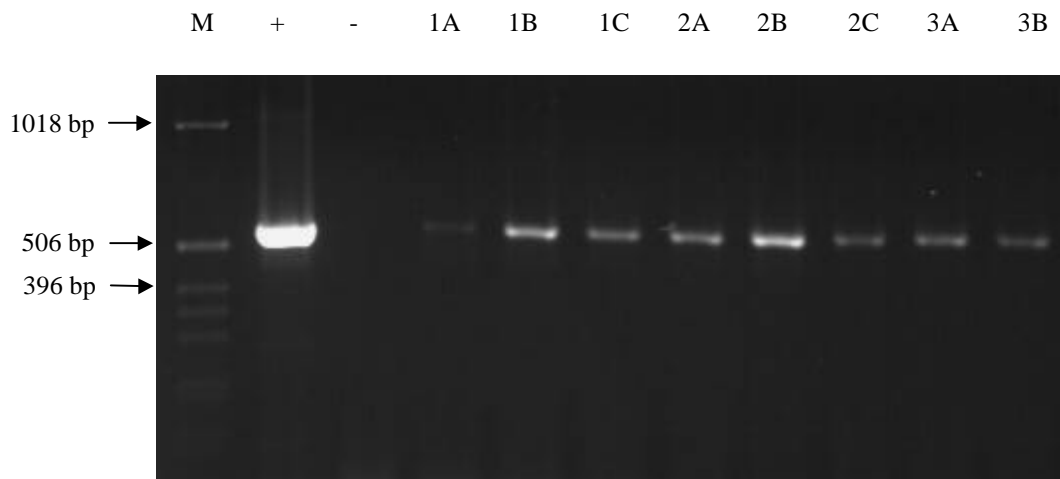


Abb. 15 : Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel zum Nachweis des SPL3-Konstrukts in transgenen *O. ecklonis* 'Sirius'. Die PCR wurde mit den Primern SPL3-35S und SPL3-241, mit pflanzlicher Gesamt-DNA als Matrize, durchgeführt.

M = Größenstandard (1 kb Ladder GibcoBRL); eingesetzte Matrizen : + = Plasmid-DNA (pNPTII-SPL3), - = untransformierte *in vitro*-Pflanze, , 1A-3B = getestete *in vitro*-Pflanzen

Getestet wurden *in vitro*-Pflanzen, die 2 Monate auf MS-Medium mit 40 mg Km/l gewachsen waren und auch nach Umsetzen auf frisches Medium nur grüne Sprosse entwickelt hatten. Die Numerierung der Sprosse erfolgte nach folgendem System: die Ziffer bezeichnet die Blattscheibe, Sprosse 1A und 1B stammen also von der gleichen Blattscheibe, der Buchstabe kennzeichnet die unterschiedlichen Sprosse. Diese Kennzeichnung wurde eingeführt, da pro Blattscheibe z. T. mehrere adventive Sprosse entstanden. Der räumliche Abstand zwischen diesen Regeneraten war zu gering um auszuschließen, daß sie aus dem selben Transformationsereignis hervorgegangen waren. Sprosse mit gleicher Ziffer, aber unterschiedlichem Buchstaben sind daher möglicherweise identisch.

Abb. 15 zeigt die Ergebnisse für regenerierte *O. ecklonis* der Sorte 'Sirius', in allen getesteten Pflanzen konnte das Transgen amplifiziert werden. Die auf dieser Abbildung gezeigten Amplifikate wurden mit einer Temperatur von 55°C für die Primeranlagerung erzeugt, diese Temperatur wurde als geeignetester Wert für den Nachweis des SPL3-Konstrukts in *O. ecklonis* ermittelt.

3.9.4. Nachweis von *Agrobacterium tumefaciens*

Um sicherzustellen, daß die Amplifikation des Transgens in regenerierten *O. ecklonis* kein falsches positives Ergebnis war, das durch die Amplifikation von bakterieller Plasmid-DNA hervorgerufen wurde, mußten die regenerierten Pflanzen auf *A. tumefaciens* überprüft werden. Hierfür wurde die extrahierte Gesamt-DNA aus der Pflanze einem PCR-Test mit agrobakterienspezifischen Primern unterzogen, die ein Fragment des Gens *chvE* amplifizieren. ChvE spielt als Monosaccharid-bindendes Protein eine wichtige Rolle bei der Induktion des Transformationsvorgangs und ist ein für *A. tumefaciens* spezifisches Protein.

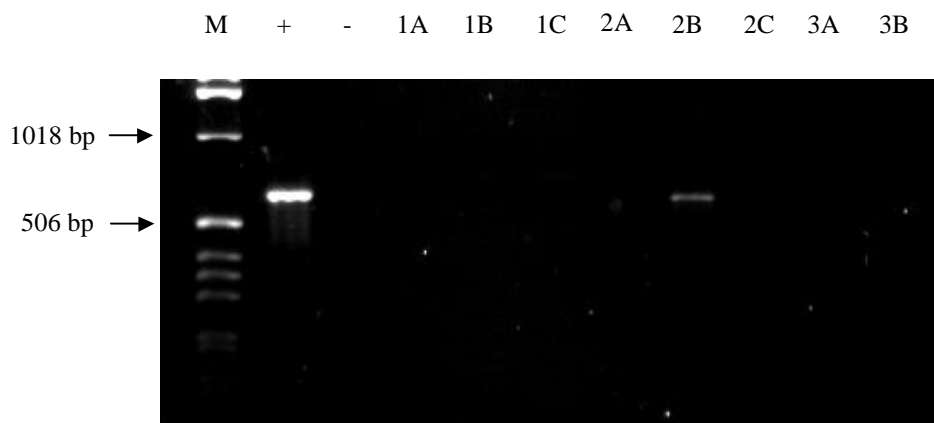


Abb. 16 : Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel zum Nachweis von *A. tumefaciens* in *in vitro*-Pflanzen von *O. ecklonis*. Die PCR wurde mit den Primern CHVE-3 und CHVE-5, mit extrahierter Gesamt-DNA als Matrize, durchgeführt (Primeranlagerung 58°C).

M = Größenstandard (1 kb Ladder GibcoBRL); eingesetzte Matrizen : - = untransformierte *in vitro*-Pflanze, + = 10 ng DNA aus *A. tumefaciens* ATHV, 1A-3B = getestete *in vitro*-Pflanzen

Der PCR-Nachweis mit den Primern CHVE-3 und CHVE-5 ergab nur für wenige regenerierte Pflanzen eine nachweisbare Kontamination mit *A. tumefaciens*. Abb. 16 zeigt den Nachweis des für *A. tumefaciens* typischen *chvE* Gens in den gleichen DNA-Extraktionen, die beim Nachweis des SPL3-Konstrukts positiv getestet wurden (Abb. 15). In der extrahierten Gesamt-DNA aus dem Regenerat 2B wurde ein Fragment amplifiziert, das in seiner Länge dem aus *A. tumefaciens*-DNA amplifizierten Fragment entspricht. Dieses Ergebnis legt nahe, daß die regenerierte Pflanze 2B Agrobakterien enthält. Damit kann nicht ausgeschlossen werden, daß das positive Ergebnis im PCR-Test für das

SPL3-Konstrukt durch Amplifikation bakterieller Plasmid-DNA hervorgerufen wurde. Die Pflanze 2B kann daher nicht sicher als stabil mit dem SPL3-Konstrukt transformiert eingestuft werden.

In der PCR wurden die besten Resultate mit einer Primeranlagerung bei 58°C erzielt. Bei niedrigeren Temperaturen zeigten sich bei Pflanzen der Sorte 'Sirius' unspezifische Banden im Bereich 800 - 100 bp (Daten nicht gezeigt).

3.9.5. Nachweis des LMV-Prot-Konstrukts

Adventive Sprosse, die nach Transformation mit pGJ-LMV-Prot regenerierten, wurden in einer PCR mit den konstruktsspezifischen Primern PCASS und LMV6260R getestet.

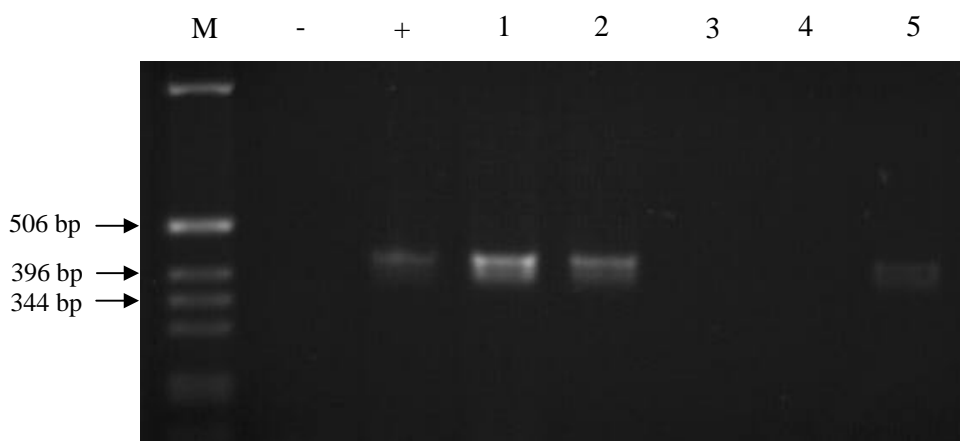


Abb. 17 : Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel zum Nachweis des LMV-Prot-Konstrukts in transgenen *O. ecklonis*. Die PCR wurde mit den Primern PCASS und LMV6260R, mit pflanzlicher Gesamt-DNA als Matrize, durchgeführt (Primeranlagerung bei 58°C).

M = Größenstandard (1 kb Ladder GibcoBRL); eingesetzte Matrizen : - = untransformierte *in vitro*-Pflanze ('Mira'), + = transgene LMV-Prot *N. benthamiana* (Positivkontrolle), 1-5 = getestete *in vitro*-Pflanzen (1 = Arctur 1A, 2 = Arctur 2A, 3 = Gemma 1A, 4 = Mira 1A, 5 = Sirius 1A)

Das LMV-Prot-Konstrukt konnte in regenerierten *in vitro*-Pflanzen unterschiedlicher Sorten durch Amplifikation des entsprechenden Fragments (ca. 410 bp) nachgewiesen werden. In Abb. 17 zeigen die Proben 1 (Arctur 1A) und 2 (Arctur 2A) eine deutliche, Probe 5 (Sirius 1A) eine schwache Bande beim Auftrennen der Amplifikate im Gel. Für den Nachweis des LMV-Prot-Konstrukts in *O. ecklonis* erwies sich 58°C als geeignete Temperatur für die Primeranlagerung (PCASS und LMV6260R). Die im Gel sichtbaren Banden waren bei PCR-Tests mit PCASS und LMV6260R auch bei

Wiederholungen von sehr unterschiedlicher Leuchtintensität, es handelt sich möglicherweise um Doppelbanden. Zum Teil waren die Banden auch bei mehrfacher Testung konsistent schwach (z.B. Sirius 1A in Abb. 17).

Alternativ zu diesem Nachweis wurden PCR-Tests zunächst mit den auch für die Klonierung der Transformationsvektoren verwendeten Primern LMV2 und LMV4 durchgeführt, da diese Primer bereits vorhanden waren. In transgenen Pflanzen sollte mit dieser Kombination ein Fragment von 1266 bp Länge amplifiziert werden. Es gelang jedoch in keinem Fall, auch bei Verwendung verschiedener Temperaturen für die Primeranlagerung (48°C - 62°C) und Verlängerung der Elongationszeit (bis 2 min.), ein Amplifikat der gesuchten Größe im Agarosegel zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist das Fragment zu groß, um von chromosomaler DNA effizient amplifiziert zu werden.

Die Überprüfung der *in vitro*-Pflanzen auf *A. tumefaciens* ergab, daß ähnlich wie für SPL3-Pflanzen nur in wenigen Regeneraten Agrobakterien durch PCR nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse legen nahe, daß der Nachweis des Transgens auf eine transformierte Pflanze zurückzuführen ist und nicht auf die Amplifikation von bakterieller Plasmid-DNA.

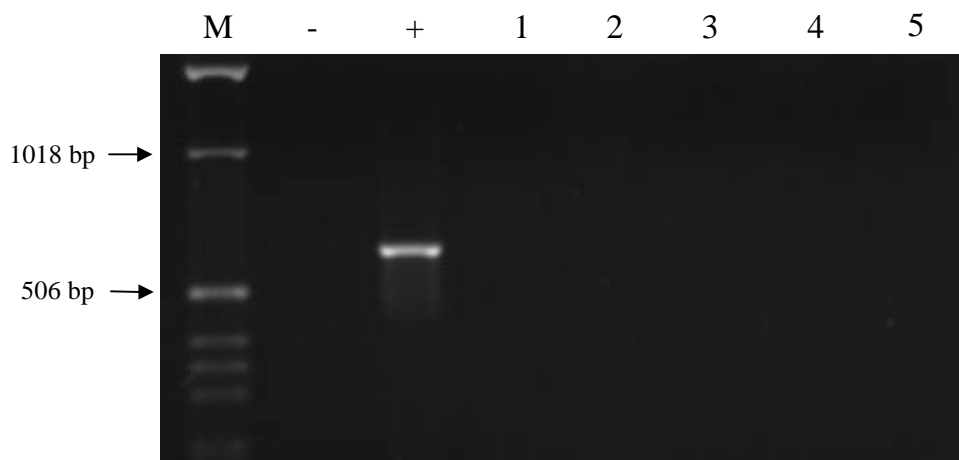


Abb. 18 : Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel zum Nachweis von *A. tumefaciens* in *in vitro*-Pflanzen von *O. ecklonis*. Die PCR wurde mit den Primern CHVE-3 und CHVE-5, mit extrahierter Gesamt-DNA als Matrize, durchgeführt (Primeranlagerung 58°C).

M = Größenstandard (1 kb Ladder GibcoBRL); eingesetzte Matrizen : - = untransformierte *in vitro*-Pflanze ("Mira"), + = 10 ng DNA aus *A. tumefaciens* ATHV, 1-5 = entsprechen den für Abb. 17 beschriebenen Pflanzen

3.9.6. Nachweis der CORE-Konstrukte

Nach Transformationsversuchen mit pGJ-CORE-sense und pGJ-CORE-antisense regenerierte Pflanzen wurden im PCR-Test mit den Primern CORE1 und CORE2 überprüft. Diese Primer waren zur Herstellung beider Transformationsvektoren verwendet worden.

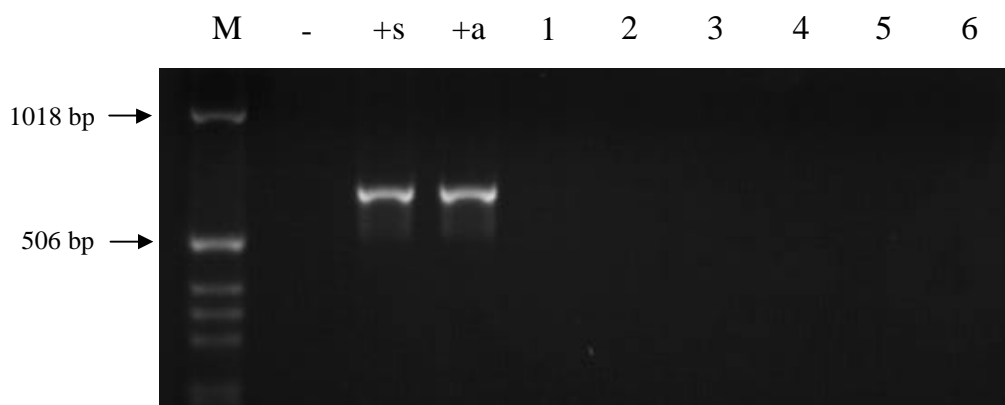


Abb. 19 : Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel zum Nachweis des CORE-Konstrukts in regenerierten *O. ecklonis*. Die PCR wurde mit den Primern CORE1 und CORE2, mit pflanzlicher Gesamt-DNA als Matrize, durchgeführt (Primeranalagerung bei 55°C).

M = Größenstandard (1 kb Ladder GibcoBRL); eingesetzte Matrizen : - = untransformierte *in vitro*-Pflanze ('Castor'), +s = Plasmid-DNA (pGJ-CORE-sense), +a = Plasmid-DNA (pGJ-CORE-antisense), 1-6 = getestete *in vitro*-Pflanzen ('Castor', 1-4 = pGJ-CORE-sense transformiert, 5-6 = pGJ-CORE-antisense transformiert)

Für die CORE-Konstrukte konnte in keinem Regenerat eine erfolgreiche Transformation nachgewiesen werden, obwohl auf selektivem Medium (40 mg Km/l) einige adventive Sprosse entstanden. In keiner der getesteten *in vitro* Pflanzen konnte ein Fragment der entsprechenden Größe (674 bp) amplifiziert werden. Auch der Phänotyp der Pflanzen (schwach grün, langsames Wachstum) deutete darauf hin, daß die regenerierten *O. ecklonis* 'Castor' nicht transgen waren. Nur bei den als Positivkontrollen eingesetzten Plasmiden pGJ-CORE-sense und pGJ-CORE-antisense wurde ein Fragment der gesuchten Größe amplifiziert.

Da in keiner Pflanze das Transgen im PCR-Test nachgewiesen werden konnte, entfiel auch die Überprüfung auf *A. tumefaciens*.

In Tab. 11 sind die Ergebnisse der Untersuchungen regenerierter Sprosse bzw. Pflanzen zusammengefasst, die mit PCR-Tests überprüft wurden. Alle Regenerate wurden zunächst mit konstruktsspezifischen Primern überprüft und bei Nachweis des Transgens auf Kontamination mit *A. tumefaciens* getestet. Dieser Nachweis erfolgte über eine PCR mit Primern, die spezifisch ein Fragment des *chvE*-Gens aus *A. tumefaciens* amplifizieren.

Konstrukt	transformierte Sorte	regenerierte Sprosse	transgene Sprosse
pGJ-LMV-Prot	Arctur	4	2
	Gemma	2	0
	Mira	1	0
	Sirius	1	1
pNPTII-SPL3	Arctur	2	0
	Mira	6	1
	Sirius	10	8
pGJ-CORE-sense	Castor	4	0
pGJ-CORE-antisense	Castor	2	0

Tab. 11 : Analyse transgener *Osteospermum ecklonis*. Die Tabelle faßt die Ergebnisse für die nach Kokultur mit entsprechenden *A. tumefaciens* erfolgreich regenerierten, aus adventiven Sprossen entstandenen Pflanzen zusammen. Angegeben sind die Gesamtanzahl an auf selektiven Medien regenerierten Sprossen (regenerierte Sprosse) und die Anzahl an Sprossen, in denen im PCR-Test das Transgen nachgewiesen wurde und die im Test auf *A. tumefaciens* negativ waren (transgene Sprosse).

Es zeigte sich, daß nur ein Teil der adventiven Sprosse, die sich auf selektivem Medium entwickelt hatten und nach Übertragung auf neue Platten auch weiterhin auf selektivem (für alle in dieser Tabelle aufgeführten Regenerate: 40 mg Km/l) Medium wuchsen, im PCR-Test positiv reagierten.

3.10. Analyse transgener *Nicotiana benthamiana*

3.10.1. Nachweis des LMV-Prot-Konstrukts

Als Modellpflanze wurde zur schnellen Evaluierung der Transformation *N. benthamiana* verwendet, transformierte Pflanzen (T1-Generation) wurden von der *in vitro* Kultur in das Gewächshaus übertragen. Durch Selbstbefruchtung wurden Nachkommen (T2-Generation) der transgenen Pflanzen erzeugt.

N. benthamiana wurde nur mit einem Konstrukt transformiert, pGJ-LMV-Prot, und zum Nachweis einer erfolgreichen Transformation wurde zunächst ein PCR-Test zur Detektion des *nptII*-Gens in der T-DNA durchgeführt. Für diesen Zweck wurden die Primer NPTII-3 und NPTII-5 benutzt. Es wurden 14 Pflanzen mehrfach überprüft, ohne daß ein eindeutiges Ergebnis des PCR-Tests erkennbar war, obwohl die ausgewählten Pflanzen alle in MS-Medium mit 100 mg Km/l Wurzeln gebildet hatten. Das Wachstum von Wurzeln bei einer Km-Konzentration von 100 mg/l wurde als sicheres Zeichen für *nptII*-Aktivität gewertet. Die im Agarosegel sichtbaren Banden waren sehr schwach und die Ergebnisse nicht reproduzierbar (Daten nicht gezeigt). Als weiterer Nachweis einer erfolgreichen Transformation mit pGJ-LMV-Prot wurde eine PCR mit den Primern PCASS und LMV6260R durchgeführt. Zunächst wurden 6 *in vitro*-Pflanzen mit den konstruktsspezifischen Primern getestet, um die Methode zu überprüfen. Als positive Kontrollen dienten Plasmid-DNA des Transformationsvektors pGJ-LMV-Prot (P) und extrahierte Gesamt-DNA der einzigen *in vitro*-Pflanze, die im PCR-Test auf das *nptII*-Gen konsistent positiv war.

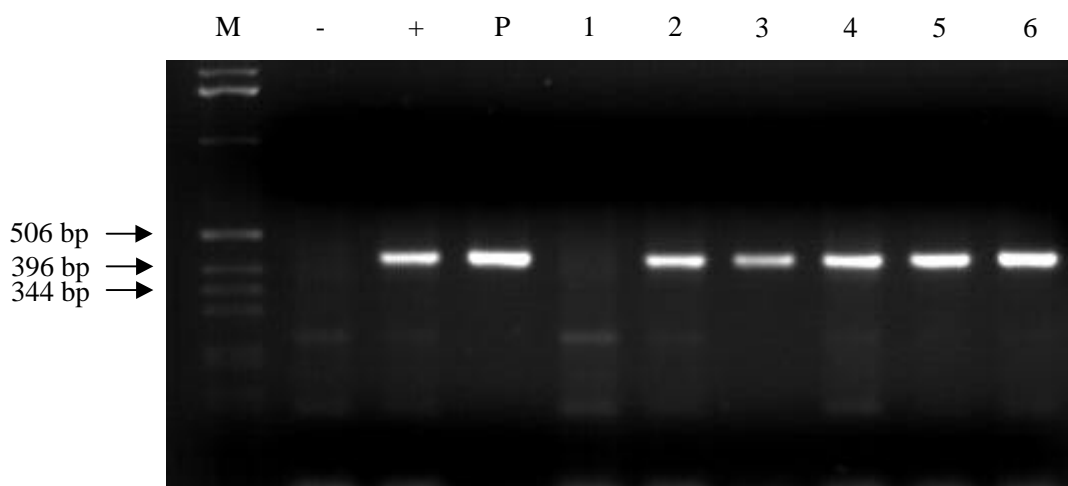


Abb. 20 : Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel zum Nachweis des LMV-Prot-Konstrukts in transgenen *N. benthamiana*. Die PCR wurde mit den Primern PCASS und LMV6260R, mit pflanzlicher Gesamt-DNA als Matrize, durchgeführt (Primeranlagerung bei 57°C).

M = Größenstandard (1 kb Ladder GibcoBRL); eingesetzte Matrizen : - = untransformierte *in vitro*-Pflanze, + = nach *nptII*-Test transgene Pflanze (Positivkontrolle), P = Plasmid-DNA (pGJ-LMV-Prot), 1-6 = getestete *in vitro*-Pflanzen

Von den getesteten 6 *N. benthamiana* (Abb. 20) zeigten die Pflanzen mit der fortlaufenden Numerierung 2-6 ein positives Ergebnis, es wurde ein Produkt der erwarteten Größe (ca. 410 bp) amplifiziert. Das Transgen konnte in der Pflanze "1" nicht nachgewiesen werden.

Es zeigte sich, daß die ideale Temperatur für die Primeranlagerung 57°C war. Bei niedrigeren Temperaturen waren im Gel unspezifische Amplifikationsprodukte sichtbar, und nach Erhöhung der Temperatur wurden die Banden im Agarosegel schwächer.

Insgesamt wurden mit dieser Methode 22 *in vitro*-Pflanzen überprüft, wobei sich für 19 Pflanzen ein positiver PCR-Nachweis ergab.

3.10.2. Multiplex-PCR

Zur Absicherung der Versuchsergebnisse wurde der Nachweis des Transgens in *N. benthamiana* in einer modifizierten Form durchgeführt. Die Multiplex-PCR erlaubt die gleichzeitige Amplifikation eines internen Standards und somit eine Überprüfung der Qualität der extrahierten pflanzlichen Gesamt-DNA. Auf diese Weise können falsch-negative Ergebnisse für den Nachweis des Transgens ausgeschlossen werden.

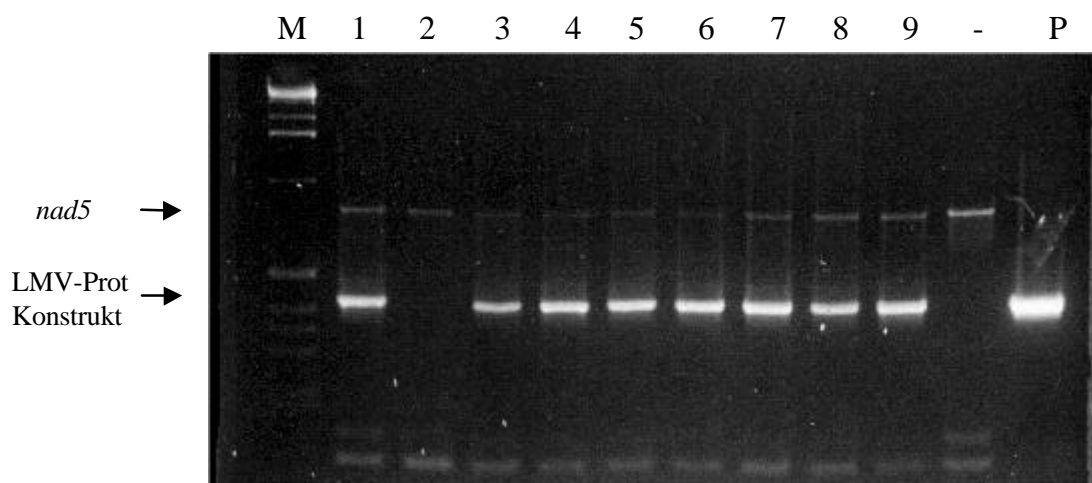


Abb. 21 : Auftrennung der Amplifikate der Multiplex-PCR im Agarosegel. Die Primer NAD5-5 und NAD-3 amplifizieren einen internen Standard (*nad5*) und die Primer PCASS und LMV6260R das nachzuweisende Transgen (LMV-Prot-Konstrukt). Getestet wurden 9 T2-Nachkommen der Pflanze "15". M = Größenstandard (1 kb Ladder GibcoBRL); eingesetzte Matrizen : - = untransformierte *N. benthamiana*, P = Plasmid-DNA (pGJ-LMV-Prot), 1-9 = getestete *in vitro*-Pflanzen "15-1"- "15-9"

Die Primer NAD5-5 und NAD5-3 amplifizieren - nach Kalkulation der Sequenzlänge anhand der mitochondrialen *nad5*-Sequenz aus *Beta vulgaris* (GenBank X55786) - ein Produkt mit einer Länge von 831 bp. Ein Amplifikationsprodukt dieser Größenordnung wurde auch bei der Verwendung von genomischer DNA aus *N. benthamiana* gefunden (Abb. 21 , *nad5*). Das Vorhandensein der

entsprechenden Bande im Agarosegel belegt, daß Quantität und Qualität der eingesetzten pflanzlichen Gesamt-DNA für einen PCR-Nachweis ausreichend sind.

Bei einer Temperatur von 58°C für die Primeranlagerung wurden beide Fragmente (*nad5* und LMV-Prot-Konstrukt) in ausreichender Menge amplifiziert.

Mit der Multiplex-PCR wurde die T2-Nachkommenschaft von 8 der 9 erfolgreich ins Gewächshaus übertragenen Pflanzen "15" bis "23" (fortlaufende Numerierung der *in vitro*-Pflanzen) überprüft. Als einzige bildete die Pflanze "20" keine Samen aus, obwohl Wuchs und Blütenbildung entsprechend der Entwicklung der anderen Pflanzen war. Die Samen der T1-Pflanzen waren abgeerntet und von jeder Pflanze ca. 40-50 Samen ausgesät worden. Von den auskeimenden Samen wurden 9 Nachkommen/T1-Pflanze in neuen Töpfen vereinzelt und im Gewächshaus aufgezogen (Numerierung "15-1", "15-2", "15-3" usw.). Diese Pflanzen (T2-Generation) wurden in der Multiplex-PCR getestet. Die Vermehrung über Samen verhindert die Übertragung von evtl. in der T1-Generation noch vorhandenen Agrobakterien und schließt damit falsch-positive PCR-Ergebnisse durch Amplifikation bakterieller Plasmid-DNA aus.

Pflanze	PCR-Nachweis des LMV-Prot-Konstrukts		nptII-ELISA der T2-Pflanzen
	T1-Pflanze	T2-Pflanzen	
Nr. 15	+	8/9	-
Nr. 16	+	9/9	-
Nr. 17	+	9/9	-
Nr. 18	+	9/9	(+)
Nr. 19	+	9/9	-
Nr. 20	+	keine T2-Nachkommen	keine T2-Nachkommen
Nr. 21	+	9/9	-
Nr. 22	+	9/9	-
Nr. 23	+	9/9	-

Tab. 12: Analyse transgener *N. benthamiana*. Die Tabelle faßt die Ergebnisse für die 9 erfolgreich ins Gewächshaus überführten, mit pGJ-LMV-Prot transformierten *N. benthamiana* zusammen. + = positiver Nachweis, (+) = eingeschränkt positiver Nachweis, - = negativer Nachweis. Für die T2-Pflanzen ist die Anzahl positiv getesteter Pflanzen an der Gesamtanzahl angegeben. Pflanze "20" bildete in der T1-Generation keine Samen.

Der interne Standard (*nad5*-Fragment) konnte in allen getesteten *N. benthamiana*-Proben amplifiziert werden, dies belegt die Qualität und Zuverlässigkeit der von Edwards *et al.* (1991) beschriebenen Methode zur schnellen Extraktion von Gesamt-DNA aus Pflanzen. Bei der Extraktion aus *N.*

benthamiana konnte auf den Chloroform-Reinigungsschritt verzichtet werden, ohne daß eine wesentlich niedrigere Ausbeute erzielt wurde. Der Verzicht auf diesen Schritt ersparte Zeit und die Handhabung (und Entsorgung) eines gesundheitsschädlichen Stoffes konnte vermieden werden.

3.10.3. NptII-ELISA

Der serologische Nachweis von NeomycinphosphotransferaseII-Protein (nptII) in Blattohextrakten möglicher transgener Pflanzen durch *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) erbrachte keine zuverlässigen Daten. Für jede T1-Pflanze wurde ein gemeinsamer Rohextrakt aus 6-8 T2-Pflanzen, die nach dem Auskeimen nicht vereinzelt worden waren, hergestellt. Dieser durch Zentrifugation geklärte Rohextrakt wurde unverdünnt oder 1:10 (v/v) mit Probenpuffer verdünnt eingesetzt. Alle Proben wurden in beiden Verdünnungen jeweils drei Mal getestet.

Die Auswertung der Daten ergab, daß die Werte für die untransformierte Kontrolle ungewöhnlich hoch waren und zudem stark schwankten (jeweils 2 Proben gemittelt: $OD_{405}=0.72$, $OD_{405}=0.95$, $OD_{405}=0.52$). Da die Werte für die getesteten Pflanzen gleich oder unwesentlich höher waren, konnte durch diesen Test keine Aussage zur Expression des Transgens getroffen werden (Daten nicht gezeigt). Für die T2-Nachkommen der Pflanze "18" wurde in jedem Test der höchste OD_{405} -Wert detektiert, in diesem Fall wurden die Daten als eingeschränkt positiver Nachweis interpretiert. Die anhand der entsprechenden Standards berechneten nptII-Konzentrationen lagen für die drei unabhängig getesteten Proben "18" bei 3.5, 4.2 und 5.3 pg nptII/ml Rohextrakt.

Insgesamt erwiesen sich die Ergebnisse des nptII-ELISA *Kits* als nicht reproduzierbar und schwer interpretierbar.

4. DISKUSSION

Im Verlauf der vorgestellten Untersuchungen wurde ein Transformations- und Regenerationsverfahren für züchterisch relevante Sorten von *Osteospermum ecklonis* entwickelt. Zunächst wurde eine Methode zur Regeneration von Pflanzen aus vegetativem Gewebe erstellt, bei der ausgehend von *in vitro* Blattscheiben die Bildung von Kallusgewebe und adventiver Sprosse durch geeignete Phytohormon-Konzentrationen angeregt wurde. Nach der Etablierung dieser Regenerationsmethode wurden durch Kokultur von Blattscheiben mit entsprechenden Stämmen von *Agrobacterium tumefaciens* verschiedene Sorten von *O. ecklonis* mit Konstrukten transformiert, die zur Induktion von Virusresistenz und Blühverfrühung führen sollen. Nach Beendigung der Kokultur wurden auf entsprechenden selektiven Medien transgene Sprosse regeneriert, die histochemisch und durch PCR-Tests charakterisiert wurden.

Es zeigte sich, daß *O. ecklonis* ein sehr hohes Potential zur Regeneration von adventiven Sprossen nach Auflegen von Blattscheiben auf geeignete Medien hat. In mehreren Kombinationen von Sorte und Phytohormon-Konzentrationen gelang die Regeneration adventiver Sprosse von allen aufgelegten Blattscheiben. Auch die Zugabe von Antibiotika zum Eliminieren der Agrobakterien (Cefotaxim und Carbenicillin) in hohen Konzentrationen hatte keine negativen Auswirkungen auf die Regenerationsrate. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die in dieser Arbeit behandelten *O. ecklonis*-Sorten hinsichtlich ihrer *in vitro* Kultur und Regeneration gut zu bearbeiten sind und somit ein lohnenswertes Ziel für die gezielte gentechnische Veränderung sind. Da *O. ecklonis* offensichtlich über keine inhärente Resistenz gegen Kanamycin verfügt, konnte ein entsprechendes Resistenzgen als Selektionsmarker verwendet werden. Durch die weitverbreitete Benutzung dieser Resistenz als selektiver Marker konnte auf eine große Auswahl an entsprechenden, gut verfügbaren Transformationsvektoren (z.B. pBIN19) zurückgegriffen werden. Trotz der hohen Regenerationsrate ist die Transformationsrate, bezogen auf nachweislich im histochemischen GUS-Test oder PCR-Test transgene Sprosse, gering. Für die GUS-Konstrukte (Reportergene) ergibt sich, bezogen auf alle Experimente, eine Transformationsrate von ca. 1%, für das SPL3-Konstrukt (Blühverfrühung) ebenfalls ca. 1% und für die LMV-Konstrukte (Virusresistenz) unter 1%. Im Gegensatz dazu liegt die Transformationsrate für *N. benthamiana* erheblich höher. Der genaue Anteil transgener Pflanzen konnte nicht festgestellt werden, da nur mit einem Teil der Regenerate weitergearbeitet wurde. Die Transformationsrate (Anzahl transgener Sprosse/Anzahl Blattscheiben) liegt bei *N. benthamiana* in jedem Fall über 6%, ein Mehrfaches über den für *O. ecklonis* erzielten Werten.

Mittlerweile wurden auch von einer anderen Arbeitsgruppe Transformationen von *O. ecklonis* durchgeführt (Giovannini *et al.*, 1999). Es handelt sich um agrobakterienvermittelte Transformation

mit Konstrukten zur Erzeugung veränderter phänotypischer Eigenschaften. In dieser Arbeit wurden transgene *O. ecklonis* erzeugt, in welche die *rol*-Gene aus *Agrobacterium rhizogenes* durch Kokultur mit entsprechend transformierten *A. tumefaciens* übertragen worden waren. Die *rol*-Gene (*root loci A, B, C* und *D*) stammten aus der T-DNA von *A. rhizogenes*. Durch Deletionsversuche und Insertion von Transposons wurden diese vier Gene identifiziert, die Einfluß auf die Morphologie der Wurzelbildung transformierter, agrobakterieninfizierter Pflanzen (zuerst gezeigt für *Kalanchoe diargremontiana*) haben (White *et al.*, 1985).

Für zwei Gene, *rolB* und *rolC*, konnte die biochemische Wirkungsweise auf Pflanzenwachstum und -entwicklung nachgewiesen werden. Das Gen *rolB* kodiert eine Indol- β -Glukosidase, die vermutlich IES(Indol-3-Essigsäure)- β -Glukoside hydrolysiert und dadurch die Konzentration an aktiver IES erhöht (Estruch *et al.*, 1991b). Die Expression des *rolC*-Gens führt ebenfalls zu β -Glukosidase-Aktivität, in diesem Fall werden aber Cytokinin- β -Glukoside hydrolysiert und so die Konzentration von aktiven Cytokinen erhöht (Estruch *et al.*, 1991a). Diese Proteine würden demnach die intrazellulären Konzentrationen von zwei der wichtigsten Phytohormone in der Pflanze beeinflussen.

Transgene *Atropa belladonna*, in denen *rolA* unter der Kontrolle des 35S Promotors stand, zeigten eine deutlich erhöhte Anzahl an Blüten und eine verringerte apikale Dominanz (Kurioka *et al.*, 1992). Für das Protein *rolA* konnte die Wirkungsweise bisher nicht gezeigt werden, in einem auf der Nukleinsäuresequenz beruhenden Modell für die Proteinstruktur wurde eine DNA-bindende Domäne vorhergesagt (Ridgen *et al.*, 1999). Als physiologische Auswirkungen wurden in *rolA*-transgenen *Nicotiana benthamiana* deutliche reduzierte Konzentrationen an Gibberellinsäure gefunden (Dehio *et al.*, 1993). Die verringerte Verfügbarkeit dieses Phytohormons könnte den beobachteten Phänotyp - stark gestauchtes Wachstum - erklären. Auch bei transgenen *N. benthamiana*, die ein *rolA::GUS* Fusionsprotein exprimierten, zeigte sich stark gestauchtes Wachstum (Vilaine *et al.*, 1998).

Bei *rolD*-transgenen *N. benthamiana* wurde Blühverfrühung und eine erhöhte Anzahl an Blüten beobachtet (Mauro *et al.*, 1996). Die Funktionsweise des *rolD*-Proteins konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Eine unterschiedliche Beeinflussung der Wuchsform wurde in *rolD*-transgenen Kulturpflanzen, Endivie und Karotte, gefunden (Limami *et al.*, 1998). Diese Pflanzen zeigten extrem gestauchtes Wachstum, ähnlich *rolA*-transgenen *N. benthamiana* (Dehio *et al.*, 1993).

Die Veröffentlichung von Giovannini *et al.* (1999) beschreibt erstmalig die Transformation von *O. ecklonis*. Wie in unserem Versuchsaufbau wurden Blattscheiben von *in vitro* Pflanzen mit entsprechend transformierten *A. tumefaciens* kokultiviert und anschließend auf selektivem Km-haltigem Medium transgene adventive Sprosse regeneriert. Es wurden transgene Pflanzen erzeugt, die verschiedene Kombinationen von *rol*-Genen enthielten: *rolA* und *rolB* (*rolAB*); *rolA*, *rolB* und *rolC* (*rolABC*); *rolC* unter der Kontrolle des 35S Promotors (*35SrolC*). Die Transformation von *O. ecklonis* erfolgte durch die Kokultur mit *A. tumefaciens* GV3101 pMP90RK, einem Stamm, der auch bei unseren Untersuchungen erfolgreich zur Transformation von GUS-Konstrukten eingesetzt wurde,

allerdings mit einem abweichenden Helfer-Plasmid (pMP90). Die Dauer der Kokultur betrug wie bei unseren Experimenten zwei Tage, danach wurden die Blattscheiben jedoch auf MS-Medium mit einer höheren Km-Konzentration (100 mg/l) übertragen. Die Zeit vom Ende der Kokultur bis zum Entstehen adventiver Sprosse wird von Giovannini *et al.* (1999) mit nur 30 bis 60 Tagen angegeben, trotz der erheblich höheren Km-Konzentration während der Selektion (im Vergleich: 20-40 mg Km/l bei unseren Versuchen). Möglicherweise spielt hier der unterschiedliche Genotyp der verwendeten Pflanzen eine Rolle, Giovannini *et al.* arbeiteten ausschließlich mit der Sorte *O. ecklonis* DM005 aus der Sammlung des Istituto Sperimentale per la Floricoltura, San Remo, Italien. Stark abweichende Transformationsraten von verschiedenen Sorten wurden bereits für andere Arten beschrieben, z.B. *Brassica napus* (Damgaard *et al.*, 1997). Die Eliminierung der Agrobakterien erfolgte durch Zugabe von 100 mg Cefotaxim/l Medium, in unseren Versuchen wurden 250 mg/l verwendet. Das in der hier vorliegenden Arbeit erfolgreich eingesetzte Carbenicillin (500mg/l) wurde von Giovannini *et al.* nicht angewandt, da das Helfer-Plasmid pMP90RK ein entsprechendes Resistenzgen trägt.

Die von Giovannini *et al.* regenerierten Pflanzen zeigten ein breites Spektrum an phänotypischen Veränderungen: höhere Verzweigungsrate, dickere und dunklere Blätter bei *rolABC* Pflanzen; verkürzte Zweiglänge bei *rolAB* und *rolABC* Pflanzen; Aufhellung der Blätter, Blühverfrühung und erhöhte Blütenanzahl bei *35srolC* Pflanzen. Im Gegensatz zu dieser vielfältigen phänotypischen Veränderung transgener *O. ecklonis* erwarten wir, daß durch die von uns durchgeführte Transformation mit dem Gen des mutmaßlichen Transkriptionsfaktors SPL3 eine gezieltere Beeinflussung der Pflanzenentwicklung möglich ist. Es wird erwartet, daß die konstitutive Expression des SPL3 Gens in *O. ecklonis* zu einer deutlich früheren Induktion der Blütenbildung führt, wie dies bereits in *Arabidopsis thaliana* gezeigt wurde (Cardon *et al.*, 1997). Induktion von Blühverfrühung würde zu einer kürzeren Kulturzeit im Gewächshaus und damit zu einer erhöhten Produktivität und Kostenreduzierung führen. Die Forschungsarbeiten von Giovannini *et al.* belegen, daß auch von anderer Seite *O. ecklonis* als interessantes Ziel für gentechnische Veränderungen, besonders im Hinblick auf phänotypische Verbesserungen (Blühverfrühung, höhere Blütenanzahl) gesehen wird. Giovannini *et al.* betonen, daß die Vielfalt der vorhandenen Sorten von *O. ecklonis* eine breite Grundlage für die weitere gentechnische Verbesserung erwünschter Sorteneigenschaften bietet.

Die *O. ecklonis* Pflanzen, die im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit regeneriert wurden, befinden sich noch in einem Entwicklungsstadium, in dem eine eingehende Charakterisierung hinsichtlich der erwünschten Veränderungen, Virusresistenz und Blühverfrühung, noch nicht möglich ist.

Da *N. benthamiana* wesentlich schneller als *O. ecklonis* wächst und über Samen einfach vermehrt werden kann, werden momentan Resistenztests mit LMV-Prot transgenen Pflanzen im Gewächshaus durchgeführt. Allerdings stehen die Ergebnisse dieser Tests noch aus.

Für *O. ecklonis*, die mit den CORE-Konstrukten transformiert wurden, wird erwartet, daß die Transkription untranslatierbarer Fragmente des CP-Gens von LMV (*lettuce mosaic potyvirus*) zu

RNA-vermittelter Resistenz gegen dieses Virus führt. Diese Prognose stützt sich auf die Ergebnisse, die für andere Potyviren bereits vorliegen, z.B. für TEV (*tobacco etch potyvirus*). Lindbo & Dougherty (1992a, 1992b) konnten nachweisen, daß in transgenen *N. benthamiana*, die mit untranslatierbaren CP-Gen Konstrukten aus TEV transformiert worden waren, die Virusreplikation unterdrückt wurde. Auch bei einem weiteren Potyvirus, PVY (*potato virus Y potyvirus*), wurde in transgenen Pflanzen durch die Transkription untranslatierbarer CP-mRNA die Replikation und Ausbreitung des Virus verhindert (Smith *et al.*, 1994).

Auch für transgene *O. ecklonis*, die mit dem LMV-Prot-Konstrukt transformiert wurden, wird eine Resistenz gegenüber LMV erwartet. Es konnte bereits für ein anderes Potyvirus, TEV, gezeigt werden, daß die Expression des ORF für 6K2/VPg zu virusresistenten Pflanzen führt (Swaney *et al.*, 1995). Resistente Linien konnten sowohl mit translatierbaren, als auch mit untranslatierbaren Versionen dieser 6K2/VPg cDNA erzeugt werden. Neben dieser erwarteten Resistenz soll in den LMV-Prot transgenen *O. ecklonis* und *N. benthamiana* auch die möglichen Auswirkungen der Mutation der Proteinaseschnittstelle zwischen 6K2 und VPg untersucht werden. Da für die 6K Proteine (6K1 und 6K2) aufgrund ihrer hydrophoben Domänen und Untersuchungen mit fluoreszierenden 6K-Fusionsproteinen aus TEV eine Funktion als Membrananker im endoplasmatischen Retikulum vorgeschlagen wurde (Schaad *et al.*, 1997), könnte eine Zerstörung der Proteinaseschnittstelle zur dauerhaften Verankerung des Proteins 6K2/VPg/Pro an der Membran des ER, dem mutmaßlichen Replikationsort, führen. Schaad *et al.* (1996) konnten für TEV zeigen, daß die Proteinase-Domäne von VPg/Pro (NIa) die interne Schnittstelle zwischen VPg und Pro aufgrund eines suboptimalen Sequenzkontexts nur ineffizient schneidet. In Mutanten mit einem optimierten Kontext der Aminosäuresequenz wurde die Proteolyse effizienter vollzogen. Allerdings zeigten diese Mutanten Defekte in der Amplifikation der genomischen RNA. Schaad *et al.* zogen daraus den Schluß, daß die langsame interne Prozessierung des Proteins NIa eine regulatorische Funktion für die Virusreplikation hat. Bei Komplementationsversuchen mit transgenen *N. benthamiana*-Zellen, die das nicht mutierte NIa in verschiedenen Polyproteinen exprimierten, konnte keine *in trans* Komplementation des mutierten NIa festgestellt werden. Die Replikation der viralen genomischen RNA wurde bei Mutanten mit optimiertem Sequenzkontext weiterhin unterdrückt. Für die Virusreplikation scheint die Funktion des NIa *in cis* notwendig zu sein. In einer weiteren Untersuchung an TEV wurde gezeigt, daß eine Interaktion zwischen der RNA-Polymerase (NIb) und der Proteinase-Domäne von NIa Voraussetzung für die Virusreplikation ist (Daros *et al.*, 1999).

Die Proteinase-Domäne von NIa und die Regulation ihrer Aktivität scheinen bei der Replikation der viralen genomischen RNA eine wichtige Rolle zu spielen.

Im Bezug auf das LMV-Prot-Konstrukt wäre denkbar, daß in transgenen *O. ecklonis* die stabile Verankerung des Proteins 6K2/VPg/Pro in der Membran und die damit erhöhte Verfügbarkeit der Proteinase-Domäne die Replikation inokulierter Viren beeinflusst. Die Untersuchungen von Schaad *et*

al. (1996) belegen, daß NIa *in cis* für die Replikation notwendig ist, somit wäre die Anwesenheit mutierter NIa Proteine *in trans* irrelevant. Es wäre jedoch möglich, daß die von der transgenen Pflanze exprimierte Proteinase zur beschleunigten Prozessierung des Polyproteins von LMV beiträgt. Eine effizientere Proteolyse zwischen VPg und Proteinase-Domäne könnte entsprechend den Untersuchungen für TEV (Schaad *et al.*, 1996) zur Unterdrückung der Virusreplikation führen.

Es ist daher beabsichtigt, transgene *O. ecklonis* nicht nur hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber LMV-Infektionen zu evaluieren, sondern nach Möglichkeit auch die zellbiologischen Auswirkungen der Expression des mutierten NIa Proteins zu untersuchen. In elektronenoptischen Untersuchungen mit entsprechenden, goldmarkierten Antikörpern soll festgestellt werden, ob die Zerstörung der Proteinaseschnittstelle zur dauerhaften Verankerung von NIa in der Membran führt.

Für die Erklärung von RNA-vermittelter Virusresistenz, die nicht auf der Expression entsprechender Proteine beruht, gibt es mittlerweile gut belegte Modelle. Aufgrund dieser Annahmen wird erwartet, daß die Transformation mit den nicht translatierbaren CORE-Konstrukten zu LMV-resistenten *O. ecklonis* führt. Die Induktion von Virusresistenz durch die Transformation von Pflanzen mit untranslatierbaren virus-abgeleiteten Konstrukten wurde fast zeitgleich für drei verschiedene Viren beschrieben, *tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV; de Haan *et al.*, 1992), *tobacco etch potyvirus* (TEV; Lindbo & Dougherty, 1992a) und *potato virus Y potyvirus* (PVY; van der Vlugt *et al.*, 1992). Ein in allen drei Systemen beobachteter Phänotyp war extreme Resistenz, d. h. völliges Ausbleiben von Symptomen und Virusreplikation. In den Untersuchungen zum Potyvirus TEV, in denen mit einem untranslatierbaren CP-Gen gearbeitet wurde (Lindbo & Dougherty, 1992a), konnten auch einige transgene Pflanzenlinien beobachtet werden, die den *recovery*-Phänotyp zeigten. Nach Inokulation mit TEV kam es zunächst zu einer systemischen Infektion mit entsprechenden Symptomen, aber diese Symptome wurden in neu gebildeten Blättern immer schwächer. Schließlich wurden Blätter neu gebildet, in denen kein Virus mehr nachweisbar war und die bei erneuter Inokulation extrem resistent waren, d.h. keinerlei Symptome zeigten. In diesem durch *recovery*-Phänotyp gekennzeichneten Pflanzengewebe wurde festgestellt, daß die Menge der transgenen mRNA um das 5- bis 8-fache niedriger war als in transgenen Pflanzen, die niemals mit TEV inokuliert worden waren. Man konnte jedoch feststellen, daß im Gewebe des *recovery*-Phänotyps die Transkriptionsrate der transgenen mRNA unverändert zur Kontrolle war. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vorgeschlagen, daß es einen Mechanismus für einen sequenzspezifischen RNA Abbau gibt, welcher sowohl die mRNA des Transgens als auch die sich replizierende virale RNA betrifft (Dougherty *et al.*, 1994). Dies würde erklären, warum nur die transgene mRNA abgebaut wird, und die übrigen mRNAs davon unbeeinflusst bleiben. Es konnte gezeigt werden, daß die Induktion der RNA-vermittelten Resistenz von der Länge des Transgens abhängt. In transgenen Pflanzen, die mit kurzen untranslatierbaren Fragmenten (110 bis 235 Nukleotide) des Nukleoprotein-Gens von TSWV transformiert worden waren, wurde keine

Resistenz beobachtet. Nach Fusion der untranslatierbaren Fragmente mit dem Gen für GFP wurde jedoch in transformierten Pflanzen Virusresistenz beobachtet (Pang *et al.*, 1997). Die größere Länge des transgenen Transkripts war zur Induktion der RNA-vermittelten Resistenz notwendig, für die Erkennung und *trans*-Inaktivierung des inokulierten Virus waren jedoch selbst Fragmente von 110 Nukleotiden ausreichend. In einem ähnlichen Versuchsaufbau, in dem Fusionsprodukte aus GFP-Gen und Fragmenten des Nukleoprotein-Gens von TSWV verwendet wurden, konnte bis zu einer Länge von 59 Nukleotiden aus dem Nukleoprotein-Gen keine Virusresistenz in transgenen Pflanzen gefunden werden (Jan *et al.*, 2000). Für die Konstruktion der CORE-Konstrukte wurde ein Fragment des CP-Gens mit 658 Nukleotiden Länge verwendet, es wird daher erwartet, daß die Länge des Transkripts zur Induktion RNA-vermittelter Virusresistenz ausreichend ist.

Die molekularen Mechanismen, die hinter der RNA-vermittelten Resistenz stehen, scheinen auch für das homologie-abhängige *gene silencing* verantwortlich zu sein, ein Prozeß, der die Expression von Transgenen und homologen Sequenzen beeinflusst (van den Boogaart *et al.*, 1998). Die Stabilität der Expression des Transgens ist ein wichtiger Aspekt in der Entwicklung und Herstellung transgener Pflanzen für kommerzielle Anwendungen. Homologie-abhängiges *gene silencing* ist ein Phänomen, bei dem die Präsenz eines oder mehrerer Transgene zur Inaktivierung eines oder aller Transgene führt (Matzke & Matzke, 1995; Meyer & Saedler, 1996; Stam *et al.* 1997b). Diese unbeabsichtigte Inaktivierung der Expression ist ein großes Problem für biotechnologische Anwendungen bei Pflanzen. Eine Umfrage unter 30 Biotechnologie-Unternehmen ergab, daß fast alle bereits mit *gene silencing* verbundene Probleme erfahren hatten (Finnegan & Elroy, 1994). *Gene silencing* erfolgt entweder auf Transkriptionsebene (keine Transkription) oder auf post-transkriptionaler Ebene (nach erfolgter, unbeeinflusster Transkription wird die mRNA verstärkt abgebaut). Beide Formen der Inaktivierung, PTGS (post-transkriptionales *gene silencing*) und TGS (transkriptionales *gene silencing*), sind homologie-abhängig. Eine ausgeprägte Sequenzhomologie zwischen Transgen und Endogen im Promotorbereich führt zu TGS, während Sequenzhomologie im transkribierten Bereich zu PTGS führt (Ding, 2000). Im Fall des post-transkriptionalen *gene silencing* (PTGS) spricht man von Kosuppression, wenn sowohl die Expression transgener, als auch die endogener Gene betroffen ist. Dieses Phänomen wurde erstmals bei dem Versuch beobachtet, in Petunien das Gen für Chalcon-Synthetase (*chsA*) überzuexprimieren (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). Dieses Enzym spielt eine entscheidende Rolle bei der Flavonoid-Synthese, dem verantwortlichen Prozeß für die Blütenfärbung. Beide Gruppen stellten fest, daß in einem kleinen Anteil der transformierten Pflanzen die Blüten weiß, anstatt des erwarteten dunkellila waren. Zusätzlich zu diesen völlig weißen Pflanzen wurde ein intermediärer Phänotyp gefunden, bei dem einige Breiche der Blüte weiß und andere lila waren. Obwohl die Menge der *chsA* mRNA in den weißen Bereichen deutlich vermindert war, wurde keine Verringerung der Transkriptionsrate der transgenen und der endogenen mRNA gefunden. Diese Ergebnisse legten einen post-transkriptionalen Mechanismus nahe (van Blokland *et al.*, 1994).

Außerdem entwickelten einige Pflanzen mit weißen Blüten Seitentriebe mit entweder lila Blüten oder solchen mit weißen und lila Bereichen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß der Zustand des *gene silencing* reversibel ist.

Offensichtlich ist es für die Kosuppression nicht notwendig, daß das Transgen im Nukleus der Zelle lokalisiert ist. Kumagai *et al.* (1995) klonierten ein Fragment des Gens für Phytoen-Desaturase (PDS), ein für die Carotinoidsynthese notwendiges Enzym, unter der Kontrolle eines subgenomischen Tobamovirus-Promotors in einen infektiösen Klon von *tobacco mosaic tobamovirus* (TMV). Unter einem infektiösen Klon eines RNA-Virus versteht man die vollständige genomische cDNA, die unter der Kontrolle entsprechender Promotoren *in vitro* oder nach Inokulation der Pflanze *in vivo* transkribiert werden kann. Die transkribierte RNA wird in der Zelle repliziert und es kommt zu einem Infektionsverlauf, wie er auch nach Inokulation mit vollständigen Virionen auftritt. Nach Inokulation von *N. benthamiana* mit dem modifizierten infektiösen TMV-Klon entwickelten sich zunächst die für eine TMV-Infektion typischen Symptome: mosaikartige Verfärbungen der Blätter. Ein bis zwei Wochen nach der Inokulation wurden Blätter analysiert und es konnte keine mRNA der endogenen Phytoen-Desaturase (PDS) gefunden werden. Die Suppression der endogenen PDS zeigte sich phänotypisch durch ein Ausbleichen der Blätter, das durch den Mangel des Enzyms PDS verursacht wurde. In diesen Blättern wurden auch erhöhte Konzentrationen an Phytoen gefunden, da die weiterführenden Biosynthesewege blockiert waren. Diese Versuche mit einem episomalen viralen RNA-Vektor belegen, daß ein im Cytoplasma generiertes Transkript die endogene Expression homologer Sequenzen zu unterdrücken vermag. Außerdem konnte gezeigt werden, daß eine DNA-DNA Interaktion für die Induktion der Kosuppression nicht notwendig ist.

Auch für die Kosuppression ist es notwendig, daß die transgene Sequenz eine gewisse Länge überschreitet. Chimäre Konstrukte, die neben dem Gen *uidA* (β -D-Glucuronidase, GUS) Fragmente des Gens *Nii1* (Nitrit-Reduktase) enthielten, konnten nach Transformation von *N. benthamiana* keine Kosuppression des endogenen Enzyms *Nii1* auslösen (Crete & Vaucheret, 1999). Im Gegensatz dazu kam es nach Transformation mit dem vollständigen Gen *Nii1* unter der Kontrolle des doppelten 35S Promotors bei 25% der regenerierten *N. benthamiana* zur Kosuppression des Endogens (Vaucheret *et al.*, 1995). In den chimären Konstrukten *Nii1-uidA*, *uidA-Nii1* und *Nii1-uidA-Nii1* wurden jeweils 186 bp des 5'-Endes und/oder 241 bp des 3'-Endes der *Nii1*-cDNA verwendet (Crete & Vaucheret, 1999). Nach Transformation von *N. benthamiana* mit diesen Konstrukten konnte in den transgenen Pflanzen in keinem Fall eine Kosuppression des Endogens beobachtet werden. Nach Transformation der Konstrukte in transgene Pflanzen, die bereits eine vollständige Kopie des *Nii1*-Gens unter Kontrolle des 35S Promotors enthielten und Kosuppression zeigten, fand man keine Kosuppression des chimären *Nii1-uidA* Transgens. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß die 5'- und 3'-Enden der *Nii1*-cDNA nicht ausreichend sind, um Kosuppression zu induzieren und auch kein Ziel für den homologie-abhängigen Abbau der RNA sind.

Pfropfungsversuche zeigten, daß die Induktion zur Kosuppression oder post-transkriptionalem *gene-silencing* (PTGS) von einer induzierten Unterlage auf einen zuvor nicht induzierten Steckling übertragen werden kann (Palauqui *et al.*, 1997). Transgene, nicht kosupprimierte *N. benthamiana* Stecklinge wurden auf Unterlagen gepropft, die das gleiche Transgen (Gene für Nitrat-Reduktase *Nia* oder Nitrit-Reduktase *Nii1*) enthielten und bereits Kosuppression zeigten. In allen getesteten Pflanzen wurde nach dem Aufpropfen in den Stecklingen Kosuppression induziert. Die gleichen Ergebnisse zeigten sich bei Versuchen mit transgenen Unterlagen, in denen post-transkriptionales *gene-silencing* des Gens *uidA* beobachtet wurde. Nach dem Aufpropfen eines *uidA*-transgenen Stecklings wurde auch in diesem eine Induktion von PTGS beobachtet. Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluß gezogen, daß es ein transgen-spezifisches diffusionsfähiges Signalelement für PTGS gibt.

Dieses systemisch erworbene *silencing* (SAS, *systemic acquired silencing*) kann nicht nur durch Pfropfen erreicht werden, sondern auch durch lokal begrenztes Einbringen homologer DNA. Nach der Partikel-Bombardierung 35S-*Nia*-transgener *N. benthamiana* mit homologen Konstrukten kam es zunächst zu lokal begrenzter Kosuppression und anschließend bei einem Teil der Pflanzen zu systemisch erworbenen *silencing* (SAS) (Palauqui & Balzergue, 1999). Selbst ein Beschuß der Pflanzen mit promotorlosen Konstrukten führte zu SAS. Wurden die entsprechenden Blätter zwei Tage nach der Partikel-Bombardierung entfernt, kam es dennoch zu SAS. Die Autoren ziehen den Schluß, daß das entsprechende Signal schnell produziert und verbreitet wird, und daß es zu einer weiteren Amplifikation dieses Signals kommt (Palauqui & Balzergue, 1999).

Einige Gemeinsamkeiten sprechen dafür, daß Kosuppression und RNA-vermittelte Resistenz auf den gleichen Mechanismen beruhen. Beide benötigen Sequenzhomologie zwischen Transgen und Endogen bzw. zwischen Transgen und eindringendem Virus und in beiden Fällen kommt es zu einer post-transkriptionalen Inaktivierung. Ein gemeinsamer Mechanismus erscheint daher wahrscheinlich (van den Boogaart *et al.*, 1998). Belege für diese Vermutung ergaben sich aus Untersuchungen an transgenen *N. benthamiana*, die mit dem Gen für RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp, *RNA-dependent RNA-polymerase*) aus *potato x potexvirus* (PVX) transformiert worden waren (Mueller *et al.*, 1995). Regenerierte Pflanzen zeigten entweder extreme Resistenz gegenüber Infektion mit PVX, verbunden mit niedrigen Konzentrationen an RdRp mRNA und RdRp Protein, oder Virusanfälligkeit und höhere Konzentrationen der transgenen mRNA und des entsprechenden Proteins. Durch Kreuzung von resistenten und anfälligen Linien wurden Nachkommen erzeugt, in denen nur niedrige Konzentrationen von RdRp mRNA gefunden wurden und die resistent gegenüber Infektion mit PVX waren. Dieses Phänomen wurde auf die Fähigkeit des Transgens der resistenten Linie zurückgeführt, das Transgen der anfälligen Linie *in trans* zu inaktivieren (Mueller *et al.*, 1995). Die Transkription virusspezifischer mRNA führt demnach sowohl zu Kosuppression als auch zu Virusresistenz. Der Zusammenhang zwischen PTGS und RNA-vermittelter Resistenz konnte auch in einem anderen System gezeigt werden. In einen infektiösen Klon von PVX wurde das *uidA*-Gen (GUS) unter der

Kontrolle eines doppelten PVX CP-Promotors kloniert (English *et al.*, 1996). Mit dem Transkript dieses Konstrukts wurden *uidA*-transgene *N. benthamiana* inokuliert, die post-transkriptionale Inaktivierung des Transgens zeigten (Hobbs *et al.*, 1990). Auf den inokulierten transgenen Pflanzen waren, im Gegensatz zur untransformierten Kontrolle, keine Symptome sichtbar. Es konnte keine Virusreplikation nachgewiesen werden. Die Virusresistenz wurde auf Sequenzhomologie zwischen rekombinantem Virus und Transgen zurückgeführt (English *et al.*, 1996). Nach Inokulation von *N. benthamiana* mit einem infektiösen PVX Klon, der Fragmente des Gens für Phytoen-Desaturase (PDS) enthielt, kam es zur Kosuppression des Endogens (Ruiz *et al.*, 1998). Die Inaktivierung des Endogens wurde eher durch Exons als durch Introns der PDS-RNA hervorgerufen, dies wurde als Beleg für einen cytoplasmatischen Mechanismus gesehen.

Zusätzlich zu den bisher aufgeführten RNA-Viren und entsprechenden infektiösen Klonen konnte Kosuppression auch nach Infektion mit rekombinanten DNA-Viren nachgewiesen werden (Kjemtrup *et al.*, 1998). Ein Geminivirus (TGMV, *tomato golden mosaic geminivirus*) wurde als Vektor für folgende Gene verwendet: eine Magnesium-Chelatase (*su*), einem für die Bildung von Chlorophyll notwendigem Enzym und das Gen für Luciferase (*luc*). Verschiedene Fragmente dieser Gene wurden anstelle des CP-ORFs inseriert und die Konstrukte wurden mittels Partikel-Bombardierung in *N. benthamiana* eingebracht. Nach Inokulation der Pflanze mit TGMV-Vektoren, die *su*-Fragmente enthielten, wurden zunächst lokal begrenzte und später systemische gelbe Verfärbungen festgestellt, hervorgerufen durch die Kosuppression der Magnesium-Chelatase. In *luc*-transgenen *N. benthamiana* wurde nach Inokulation mit dem TGMV-Vektor, in den ein 623 bp Fragment des *luc*-Gens kloniert worden war, eine Inaktivierung des Transgens detektiert. Da Geminiviren sich im Nukleus replizieren und dabei eine Vielzahl an DNA-Episomen bilden, folgerten die Autoren, daß auch homologe episomale DNA-Sequenzen zur Inaktivierung chromosomaler Gene befähigt sind (Kjemtrup *et al.*, 1998). Dieses Ergebnis wurde durch die Arbeiten von Atkinson *et al.* (1998) bestätigt, die ebenfalls ein Geminivirus (TYDV, *tobacco yellow dwarf geminivirus*) als Vektor benutzten. Nach Insertion des Gens für Chalcon-Synthetase (*chsA*) unter der Kontrolle des 35S Promotors in TYDV wurden Petunien-Hybriden inokuliert. Bei infizierten Pflanzen konnte die Bildung weißer Flecken auf den Blüten beobachtet werden, was auf eine Inaktivierung der endogenen *chsA* durch Kosuppression schließen läßt (Atkinson *et al.*, 1998).

Die molekularen Mechanismen des PTGS konnten bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Eine der wichtigsten Fragen ist, durch welches Signal der experimentell belegte post-transkriptionale sequenzspezifische Abbau der mRNA gesteuert wird. Ein Modell zur Erklärung dieses Phänomens beruht auf der Annahme eines Schwellenwerts (*threshold-level*) für die RNA-Konzentration (Meins & Kunz, 1994; Baulcombe, 1996; Prins & Goldbach, 1996). Bei diesem Modell wird angenommen, daß die Pflanze durch einen bestimmten Mechanismus die Transkriptionsrate des Transgens detektiert und,

falls die Menge der mRNA einen kritischen Punkt überschreitet, ein sequenzspezifischer Abbau der mRNA eingeleitet wird.

Diese Überlegungen stützen sich auf Arbeiten von Lindbo *et al.* (1993), die *N. benthamiana* mit dem vollständigen, translatierbaren CP-Gen aus *tobacco etch potyvirus* (TEV) und untranslatierbaren, am 5'-Ende deletierten Fragmenten dieses Gens transformierten. Transgene Pflanzen zeigten nach Inokulation mit TEV zunächst Symptome, erholten sich aber und waren gegen weitere Infektionen resistent. Diese Virusresistenz war streng virusspezifisch, TEV-resistente Pflanzen ließen sich mit einem nah verwandten Virus, *potato Y potyvirus* (PVY) systemisch infizieren. Bei der Analyse dieser mit CP-Konstrukten aus TEV transformierten Pflanzen konnten Goodwin *et al.* (1996) zeigen, daß das Resistenzverhalten der transgenen Pflanzen von der Kopienzahl der ins Genom integrierten Transgene abhängt. Für diese Versuche wurde eine transgene *N. benthamiana*-Linie verwendet, die aus drei unterschiedlichen Integrationsereignissen drei Kopien des untranslatierbaren Fragments des CP-Gens aus TEV erhalten hatte. Durch Kreuzung der Nachkommen wurden Pflanzen hergestellt, die keine, ein, zwei oder drei transgene Inserts unter homozygoten und heterozygoten Bedingungen enthielten. Die Analyse der Pflanzen führte zu der Beobachtung, daß bei drei oder mehr Kopien des Transgens eine extreme Resistenz gegenüber TEV erzielt wurde, es kam nach Inokulation zu keinerlei Symptomen. Eine oder zwei Kopien führten zum *recovery*-Phänotyp, d.h. nach anfänglicher Symptomausprägung kam es zur Erholung und anschließender Resistenz. Die Autoren erklären diese Ergebnisse mit der unterschiedlichen Transkriptionsrate der transgenen CP-Fragmente. Drei oder mehr Kopien führen zu einer RNA-Konzentration, die über dem kritischen Schwellenwert liegt und der Mechanismus des post-transkriptionalen Abbaus der mRNA wird gestartet. Von diesem RNA-Abbau ist auch die genomische RNA eindringender Viren betroffen und es kommt zu keiner Virusreplikation. Die Transkription von nur einem oder zwei Transgenen hingegen ist nicht ausreichend, um den Schwellenwert zu überschreiten. Die genomische RNA des sich replizierenden Virus hebt jedoch die RNA-Konzentration über den kritischen Wert, und der sequenzspezifische Abbau beginnt. Das würde erklären, warum nach anfänglicher Virusreplikation in der Pflanze ein resistentes Stadium erreicht wird. Es wird vorgeschlagen, daß eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die bereits im Cytoplasma von Pflanzen nachgewiesen wurde (Fraenkel-Conrat, 1986), nach Erreichen des Schwellenwerts kurze, sequenzhomologe *antisense* RNA-Moleküle synthetisiert. Diese *antisense*-RNA könnte an die transgene oder virale Ziel-RNA binden und dabei eine Duplex-RNA-Struktur bilden, die von doppelstrangspezifischen RNasen erkannt und abgebaut wird. Normalerweise scheint in Pflanzenzellen keine RNA in Duplex-Struktur vorzuliegen, denn die transgene Expression von doppelstrangspezifischen RNasen, Pac 1 aus Hefe (Sano *et al.*, 1997) und RNase L aus Säugern (Ogawa *et al.*, 1996), hatte keine Einfluß auf Wachstum und Entwicklung der Pflanzen. Das Modell der Produktion von kurzer sequenzspezifischer *antisense*-RNA wird durch den Nachweis entsprechender Moleküle unterstützt. Hamilton & Baulcombe (1999) konnten in Pflanzen, die

entweder transgen-induziertes oder virus-induziertes PTGS aufwiesen, zur Ziel-RNA komplementäre *antisense*-RNA mit einer Länge von 25 Nukleotiden detektieren. In Kontrollpflanzen ohne Induktion des PTGS wurden diese RNA-Moleküle nicht gefunden. Niedermolekulare RNA wurde aus den Pflanzen extrahiert, im Gel aufgetrennt und mit entsprechenden *sense*- oder *antisense*-Transkripten hybridisiert. Die für PTGS-induzierte Pflanzen charakteristischen, 25-nt RNA-Moleküle hybridisierten ausschließlich mit der *antisense*-spezifischen Sonde. Die genaue Rolle der 25-nt RNA konnte jedoch nicht bestimmt werden. Auch ist unklar, ob die *antisense*-RNA nur mit einer Länge von 25 Nukleotiden synthetisiert wird, oder ob die gefundenen Fragmente das Produkt eines Abbaus längerer *antisense*-RNA Moleküle sind. Die Autoren halten es jedoch für möglich, daß die 25-nt RNAs die gesuchten Signalstoffe sind, die eine systemische Induktion von PTGS auslösen (Hamilton & Baulcombe, 1999). Ihre Länge wäre für die Übertragung sequenzspezifischer Information ausreichend und ihre Größe würde ein Passieren der Plasmodesmata ermöglichen.

In transgenen und nichttransgenen Pflanzen sind Viren sowohl Auslöser als auch Zielobjekt eines Schutzmechanismus, der auf dem Prinzip des PTGS beruht. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß einige Viren sogenannte Pathogenitäts-Faktoren kodieren, die in der Lage sind, diesen pflanzlichen Schutz zu unterdrücken. Brigneti *et al.* (1998) wiesen nach, daß die Proteine HC-Pro aus PVY und 2b aus *cucumber mosaic cucumovirus* (CMV) virale Suppressoren von PTGS sind. Für diese Untersuchungen wurden GFP-transgene *N. benthamianas* verwendet, die PTGS des Transgens zeigten. Nach Infektion mit PVY oder CMV wurde das PTGS unterdrückt und das GFP-Transgen wurde wieder exprimiert. In Pflanzen, die mit PVX infiziert wurden, blieb das PTGS bestehen. In einem PVX-Vektor wurden daher verschiedene Proteine aus PVY und CMV in der Pflanze exprimiert und es zeigte sich, daß die Proteine HC-Pro und 2b Auslöser der Suppression des PTGS sind (Brigneti *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen an GUS-transgenem Tabak mit induziertem PTGS bestätigt. Das P1/HC-Pro Protein aus TEV (*tobacco etch potyvirus*) war in der Lage PTGS zu unterdrücken (Kasschau & Carrington, 1998). Für das 2b Protein aus CMV konnte in Fraktionierungs-Experimenten nachgewiesen werden, daß es nach Infektion der Pflanzenzelle im Zellkern lokalisiert ist (Mayers *et al.*, 2000). Die Lokalisierung im Zellkern ist offenbar für die erfolgreiche Unterdrückung des PTGS notwendig (Lucy *et al.*, 2000). Die Mutation der Argininreichen Sequenz, die als Signal für den Transport in den Zellkern notwendig ist, führt zu einer Lokalisierung des 2b Proteins im Cytoplasma. Diese Anreicherung im Cytoplasma scheint zu bewirken, daß PTGS nicht mehr unterdrückt werden kann (Lucy *et al.*, 2000). Vermutlich sind viele virale Pathogenitäts-Faktoren, deren Expression für eine erfolgreiche Virusinfektion notwendig sind, Suppressoren des PTGS. Voinnet *et al.* (1999) überprüften bereits charakterisierte Proteine aus verschiedenen Virus-Gattungen, die für eine systemische Infektion der Pflanze notwendig sind. Es konnte nachgewiesen werden, daß einige dieser Pathogenitäts-Faktoren - neben HC-Pro und 2b z.B. auch AC2 aus *african cassava mosaic geminivirus*, P1 aus *rice yellow mottle sobemovirus* und 19K

aus *tomato bushy stunt tombusvirus* - die Fähigkeit zur Suppression des PTGS in GFP-transgenen *N. benthamiana* haben. Die Ergebnisse zeigen jedoch, daß die Mechanismen der Suppression sehr unterschiedlich sind und sogar innerhalb einer Gattung variieren. Einige Proteine verursachen eine Unterdrückung des PTGS in allen Teilen der Pflanze, andere nur in neugebildeten Blättern oder nur in den Mittelvenen neugebildeter Blätter. Daraus ziehen die Autoren den Schluß, daß die viruskodierte Suppressoren des PTGS unterschiedliche Funktionsweisen haben und mit unterschiedlichen Pflanzenproteinen interagieren. Aus diesen Differenzen wird gefolgert, daß die Entwicklung der viralen und pflanzlichen Komponenten dieses Abwehrmechanismus ein koevolutionärer Vorgang ist (Voinnet *et al.*, 1999).

Das Phänomen des PTGS in transgenen Pflanzen beruht daher möglicherweise auf einem antiviralen Mechanismus. Der Abbau transgener Transkripte könnte dadurch erklärt werden, daß sie von der Pflanze fälschlicherweise als virale RNA erkannt werden. Dieser sequenzspezifische RNA-Abbau ermöglicht die Induktion von spezifischer Virusresistenz in transgenen Pflanzen, daher erwarten wir, daß die Transformation von *O. ecklonis* mit LMV-abgeleiteten Konstrukten zur Resistenz gegenüber diesem Virus führt und damit den wichtigsten virösen Schaderreger für diese Kultur kontrollierbar macht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Osteospermum ecklonis (Kapmargerite) ist eine erfolgreiche Beet- und Balkonpflanze, deren wirtschaftliche Bedeutung in den letzten Jahren europaweit zugenommen hat. Das Salat Mosaik Virus (*lettuce mosaic potyvirus*, LMV) wird als der wichtigste viröse Schaderreger bei der Produktion von *O. ecklonis* angesehen und verursacht erhebliche wirtschaftliche Ausfälle. Ziel dieser Arbeit war es daher, züchterisch relevante Sorten von *O. ecklonis* mit gentechnischen Methoden resistent gegen LMV zu machen.

Für die Etablierung einer Transformationsmethode der kommerziell relevanten Sorten von *O. ecklonis* wurde zunächst ein geeignetes Protokoll für die Regeneration aus vegetativem Gewebe entwickelt. Durch Auflegen von Blattscheiben auf Medien mit entsprechenden Phytohormon-Konzentrationen konnte Kallusbildung und die Regeneration adventiver Sprosse induziert werden. Nach der Etablierung einer Regenerationsmethode wurde mit der Transformation von Markergenen durch Kocultivierung mit *Agrobacterium tumefaciens* begonnen. Hierzu wurden Konstrukte verwendet, die das Gen für β -D-Glucuronidase (GUS) enthielten und deren Expression in transgenen Pflanzen histochemisch nachgewiesen werden konnte. Insbesondere das GUS-Konstrukt mit Intron, bei dem es zu keiner bakteriellen GUS-Expression kommt, wurde erfolgreich für den Nachweis der Transformation von *O. ecklonis* verwendet. Von den getesteten Selektionsmarkern erwies sich Kanamycinresistenz am geeignetsten. Es konnten von verschiedenen *O. ecklonis* Sorten GUS-transgene, nicht-chimäre Pflanzen regeneriert werden, die im histochemischen Nachweis in allen Bereichen GUS-Aktivität zeigten.

Zur Erzeugung transgener Pflanzen mit dem Ziel der LMV-Resistenz wurden zwei Varianten von pathogen-abgeleiteten Konstrukten verwendet. Das erste Konstrukt enthält die kodierende Sequenz der NIa Proteinase (VPg und Pro) aus LMV-E und dazu die kodierende Sequenz des Proteins 6K2, des mutmaßlichen Membranankers der NIa Proteinase. Durch PCR-Mutation wurde die Proteinase-Schnittstelle zwischen 6K2 und VPg zerstört und durch eine *Hind* III-Schnittstelle ersetzt. Außerdem wurden durch PCR Start- und Stopcodon eingeführt. Neben *O. ecklonis* wurde auch die Modellpflanze *Nicotiana benthamiana* mit diesem Konstrukt transformiert. Die anderen LMV-abgeleiteten Konstrukte enthalten nicht translatierbare Fragmente des *coat protein* (CP) Gens in *sense* und *antisense* Orientierung.

Außerdem wurde *O. ecklonis* noch mit einem Konstrukt zur möglichen Induktion von Blühverfrühung transformiert, in dem das *SPL3* Gen aus *Arabidopsis thaliana* unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht. *SPL3* ist ein mutmaßlicher Transkriptionsfaktor, der an der Regulierung der Blüteninduktion beteiligt ist, und dessen konstitutive Expression in transgenen *A. thaliana* zu Blühverfrühung führt.

Nach der erfolgreichen Etablierung des Transformations- und Regenerationsprotokolls mit Hilfe von Reporter-genen wurden Transformationsversuche mit den LMV-abgeleiteten Konstrukten und mit dem SPL3-Konstrukt durchgeführt.

Regenerierte *O. ecklonis*, die auf selektivem Medium aus adventiven Sprossen entstanden, wurden durch PCR mit konstrukt-spezifischen Primern auf Anwesenheit des Transgens überprüft. Parallel dazu wurde mit Primern, die ein Fragment eines für *A. tumefaciens* spezifischen Gens amplifizieren, ein PCR-Test durchgeführt, um die Regenerate auf Kontamination mit *A. tumefaciens* zu überprüfen.

Für die CP-Gen Konstrukte konnte bisher in keinem Regenerat das Transgen nachgewiesen werden, das Konstrukt mit mutierter Proteinase-Schnittstelle wurde in drei Pflanzen nachgewiesen, in denen keine Kontamination mit *A. tumefaciens* detektiert wurde. Das SPL3-Konstrukt wurde in acht regenerierten Pflanzen ohne *A. tumefaciens*-Kontamination nachgewiesen.

Nach der erfolgreichen Regeneration transgener *in vitro* *O. ecklonis* stehen die Übertragung in Gewächshauskultur und Testung auf Virusresistenz und Blühverfrühung noch aus.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Alting-Mees, M. and Short, J. (1989) pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res.* 17(22), 9494.
- Atkinson, R.G., Bielecki, L.R.F., Gleave, A.P., Janssen, B.J. and Morris, B.A.M. (1998) Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in petunia using a geminivirus-based episomal vector. *Plant J.* 15(5), 593-604.
- Atreya, P.L., Lopez-Moya, J.J., Chu, M., Atreya, C.D. and Pirone, T.P. (1995) Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *J. Gen. Virol.* 76, 265-270.
- Atreya, C.D., Atreya, P.L., Thornbury, D.W. and Pirone, T.P. (1992) Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology* 191, 106-111.
- Atreya, C.D. and Pirone, T.P. (1993) Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11919-11923.
- Atreya, C.D., Raccah, B. and Pirone, T.P. (1990) A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmission of a potyvirus. *Virology* 178, 161-165.
- Atreya, P.L., Atreya, C.D. and Pirone, T.P. (1991) Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7887-7891.
- Audy, P., Palukaitis, P., Slack, S.A. and Zaitlin, M. (1994) Replicase-mediated resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7(1), 15-22.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc., New York, USA.
- Bannerot, H., Boulidard, L., Marrou, J. and Duteil, M. (1969) Etude de l'hérédité de la tolérance au virus de la mosaïque de la laitue chez la variété Gallega de Invernio. *Annales de Phytopathologie* 1, 219-226.
- Baulcombe, D.C. (1996) Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* 8(10), 1833-1844.
- Baulcombe, D.C., Lloyd, J., Manoussopoulos, I.N., Roberts, I.M. and Harrison, B.D. (1993) Signal for potyvirus-dependent aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and the effect of its transfer to potato virus X. *J. Gen. Virol.* 74, 1245-1253.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. and Masterson, R. (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* 20, 1195-1197.
- Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12(22), 8711-8721.
- Blanc, S., Lopez-Moya, J.J., Wang, R., Garcia-Lampasona, S., Thornbury, D.W. and Pirone, T.P. (1997) A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* 231, 141-147.
- Brandenburg, E. (1928) Über Mosaikkrankheiten an Compositen. *Forschungen auf dem Gebiet der Pflanzenkrankheiten* 5, 39-72.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. and Baulcombe, D.C. (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* 17(22), 6739-6746.
- Cardon, G.H., Höhmann, S., Nettekoven, K., Saedler, H. and Huijser, P. (1997) Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: a novel gene involved in the floral transition. *Plant J.* 12(2), 367-377.
- Carrington, J.C., Freed, D.D. and Sanders, T.S. (1989) Autoproteolytic processing of potyvirus proteinase HC-Pro in *Escherichia coli* and in vitro. *J. Virol.* 63, 4459-4463.
- Carrington, J.C., Jensen, P.E. and Schaad, M.C. (1998) Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J.* 14, 393-400.

- Crete, P. and Vaucheret, H. (1999) Expression and sequence requirements for nitrite reductase co-suppression. *Plant Mol. Biol.* 41(1), 105-114.
- Damgaard, O., Hollund Jensen, L. and Rasmussen, O. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brassica napus* winter cultivars. *Transgenic Research* 6, 279-288.
- Daros, J.A., Schaad, M.C. and Carrington, J.C. (1999) Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. *J. Virol.* 73(10), 8732-8740.
- de Haan, P., Gielen, J.J.L., Prins, M., Wijkamp, I.G., van Schepen, A., Peters, D., van Grinsven, M.Q.J.M. and Goldbach, R. (1992) Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants. *Bio/Technology* 10, 1133-1137.
- Dehio, C., Grossmann, K., Schell, J. and Schmulling, T. (1993) Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Mol. Biol.* 23(6), 1199-1210.
- Dickson, R.C. and Laird, E.F. (1959) California desert and costal populations of flying aphids and the spread of lettuce mosaic virus. *J. Econ. Entomol.* 52, 440-443.
- Dinant, S. and Lot, H. (1992) Lettuce mosaic virus. *Plant Pathology* 41, 528-542.
- Ding, S.W. (2000) RNA silencing. *Curr. Opin. Biotech.* 11, 152-156.
- Dougherty, W.G. and Hiebert, E. (1980) Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation and cylindrical inclusion protein as a product of the potyvirus genome. *Virology* 104, 174-182.
- Dougherty, W.G., Lindbo, J.A., Smith, H.A., Parks, T.D., Swaney, S. and Proebsting, W.M. (1994) RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: Exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7, 544-552.
- Dougherty, W.G. and Parks, T.D. (1991) Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology* 183, 449-456.
- Ecke, W., Schmitz, U. and Michaelis, G. (1990) The mitochondrial *nad5* gene of sugar beet (*Beta vulgaris*) encoding a subunit of the respiratory NADH dehydrogenase. *Curr. Genet.* 18(2), 133-139.
- Eckes, P., Rosahl, S., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986) Isolation and characterisation of a light-inducible, organ-specific gene from potato and the analysis of its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots. *Mol. Gen. Genet.* 199, 216-224.
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acid Res.* 19(6), 1349.
- Edwardson, J.R. (1974) Some properties of the potato virus Y-group. *Florida Agricultural Experimental Station Monograph Series* 4, 225-231.
- English, J.J., Mueller, E. and Baulcombe, D.C. (1996) Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 8, 179-188.
- Estruch, J.J., Chriqui, D., Grossmann, K., Schell, J. and Spena, A. (1991a) The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. *EMBO J.* 10, 2889-2895.
- Estruch, J.J., Schell, J. and Spena, A. (1991b) The protein encoded by the *rolB* plant oncogene hydrolyses indole glucosides. *EMBO J.* 10, 3125-3128.
- Feldhoff, A. (1998) Immunologische und molekularbiologische Techniken zum Nachweis und zur Charakterisierung von Pflanzenviren im Zierpflanzenbau sowie der Einsatz dieser Techniken und Thermoerapie *in vitro* zur Viruskontrolle. Dissertation., Universität Mainz.
- Finnegan, J. and McElroy, D. (1994) Transgene inactivation: Plants fight back! *Bio/Technology* 12, 883-888.
- Fraenkel-Conrat, H. (1986) RNA directed RNA polymerases of plants. *Crit. Rev. Plant Sci. USA* 4, 213-226.
- Gallie, D.R. (1998) A tale of two termini: A functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* 216, 1-11.
- Gallie, D.R., Sleat, D.E., Watts, J.W., Turner, P.C. and Wilson, T.M.A. (1987) The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* 15, 3257-3273.

- George, E.F. (1993) Plant Propagation by Tissue Culture. 2nd ed. Exegetics Limited, Edington, England.
- Giovannini, A., Zottini, M., Morreale, G., Spena, A. and Allavena, A. (1999) Ornamental traits modification by *rol* genes in *Osteospermum ecklonis* transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 35, 70-75.
- Goelet, P., Lomonosoff, G.P., Butler, P.J.G., Akam, M.E., Gait, M.J. and Karn, J. (1982) Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5818-5822.
- Golemboski, D.B., Lomonosoff, G.P. and Zaitlin, M. (1990) Plants transformed with tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(16), 6311-6315.
- Goodwin, J., Chapman, K., Swaney, S., Parks, T.D., Wernsman, E.A. and Dougherty, W.G. (1996) Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. Plant Cell 8, 95-105.
- Granier, F., Durand-Tardif, M., Casse-Delbart, F., Lecoq, H. and Robaglia, C. (1993) Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. J. Gen. Virol. 74, 2737-2742.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z. and Maliga, P. (1994) The small, versatile *pPZP* family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. Plant Mol. Biol. 25, 989-994.
- Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 286, 950-952.
- Hamilton, R.I. (1980) Defenses triggered by previous invaders: Viruses. In: J.G. Horsfall and E.B. Cowling (Eds), Plant disease, pp. 279-303. Academic Press, New York, USA.
- Harrison, B.D. and Robinson, D.J. (1988) Molecular variation in vector borne plant viruses: epidemiological significance. Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B 321, 447-462.
- Hobbs, S.L.A., Kpodar, P. and DeLong, C.M.O. (1990) The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. Plant Mol. Biol. 15, 851-864.
- Hong, Y. and Hunt, A.G. (1996) RNA polymerase activity catalyzed by potyvirus encoded RNA-dependent RNA polymerase. Virology 226, 146-151.
- Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, M.D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. J. Bacteriol. 168, 1291-1301.
- Horvath, J. (1980) Viruses of lettuce: II. Host range of lettuce mosaic virus and cucumber mosaic virus. Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae 29, 333-352.
- Huijser, P., Klein, J., Lonig, W.E., Meijer, H., Saedler, H. and Sommer, H. (1992) Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *SQUAMOSA* in *Antirrhinum majus*. EMBO J. 11(4), 1239-1249.
- Jagger, I.C. (1921) A transmissible mosaic disease of lettuce. Journal of Agricultural Research 20, 737-741.
- Jan, F.J., Fagoaga, C., Pang, S.Z. and Gonsalves, D. (2000) A minimum length of N gene sequence in transgenic plants is required for RNA-mediated tospovirus resistance. J. Gen. Virology 81, 235-242.
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M. and Hirsh, D. (1986) beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83(22), 8447-8451.
- Jen, G.C. and Chilton, M.D. (1986) Activity of T-DNA borders in plant cell transformation by mini-T plasmids. J. Bacteriol. 166, 491-499.
- Johansen, I.E., Edwards, M.C. and Hampton, R.O. (1994) Seed transmission of viruses: Current perspectives. Annu. rev. Phytopathol. 32, 363-386.
- Jones, A.L., Johansen, I.E., Bean, S.J., Bach, I. and Maule, A.J. (1998) Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene. J. Gen. Virol. 79, 3129-3137.
- Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of post-transcriptional gene silencing. Cell 95(4), 461-470.

- Kjemtrup, S., Sampson, K.S., Peele, C.G., Nguyen, L.V., Conkling, M.A., Thompson, W.F. and Robertson, D. (1998) Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. *Plant J.* 14(1), 91-100.
- Klein, J., H., S. and Huijser, P. (1996) A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*. *Mol. Gen. Genet.* 250(1), 7-16.
- Klein, P.G., Klein, R.R., Rodriguez-Cerezo, E., Hunt, A.G. and Shaw, J.G. (1994) Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* 204, 759-769.
- Koncz, C. and Schell, J. (1986) The promotor of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204, 383-396.
- Kumagai, M.H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. and Grill, L.K. (1995) Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1679-1683.
- Kurioka, Y., Suzuki, Y. and Kamada, H. (1992) Promotion of flowering and morphological alterations in *Atropa belladonna* transformed with a CaMV 35S-rolC chimeric gene of the Ri plasmid. *Plant Cell Rep.* 12, 1-6.
- Lain, S., Martin, M.T., Riechmann, J.L. and Garcia, J.A. (1991) Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *J. Virol.* 65, 1-6.
- Lapidot, M., Gafny, R., Ding, B., Wolf, S., Lucas, W.J. and Beachy, R.N. (1993) A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant J.* 4, 959-970.
- Lawson, R.H. and Hearon, S.S. (1971) The association of pinwheel inclusions with plasmodesmata. *Virology* 44, 454-456.
- Lesemann, D.-E. (1988) Cytopathology. In: R.G. Milne (Ed), *The Plant Viruses*, Vol. 4 The Filamentous Plant Viruses., pp. 179-235. Plenum Press, New York, London.
- Limami, M.A., Sun, L.Y., Douat, C., Helgeson, J. and Tepfer, D. (1998) Natural genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. Annual flowering in two biennials, belgian endive and carrot. *Plant Physiol.* 118(2), 543-550.
- Lindbo, J.A. and Dougherty, W.G. (1992a) Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189, 725-733.
- Lindbo, J.A. and Dougherty, W.G. (1992b) Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5(2), 144-153.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M. and Dougherty, W.G. (1993) Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5, 1749-1759.
- Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X. and Ding, S.W. (2000) Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.* 19, 1672-1680.
- Maiti, I.B., Murphy, J.F., Shaw, J.G. and Hunt, A.G. (1993) Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(13), 6110-6114.
- Mandel, M.A. and Yanofsky, M.F. (1995) A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature* 377(6549), 522-524.
- Mannerlöf, M. and Tenning, P. (1997) Screening of Transgenic Plants by Multiplex PCR. *Plant Mol. Biol. Repr.* 15(1), 38-45.
- Matthews, R.E.F. (1991) *Plant virology*, 3rd ed., pp. 200-202. Academic Press, London.
- Matzke, M.A. and Matzke, A.J.M. (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiol.* 107, 679-685.
- Mauro, M.L., Trovato, M., Paolis, A.D., Gallelli, A., Costantino, P. and Altamura, M.M. (1996) The plant oncogene *rolD* stimulates flowering in transgenic tobacco plants. *Dev. Biol.* 180(2), 693-700.

- Mavankal, G. and Rhoads, R.E. (1991) In vitro cleavage at or near the N-terminus of the helper component protein in the tobacco vein mottling virus polyprotein. *Virology* 185, 721-731.
- Mayers, C.N., Palukaitis, P. and Carr, J.P. (2000) Subcellular distribution analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein. *J. Gen. Virology* 81, 219-226.
- McClintock, K., Lamarre, A., Parsons, V., Laliberté, J.-F. and Fortin, M.G. (1998) Identification of a 37 kDa plant protein that interacts with the turnip mosaic potyvirus capsid protein using anti-idiotypic-antibodies. *Plant Mol. Biol.* 37(2), 197-204.
- Meins, F.J. and Kunz, C. (1994) Gene silencing in transgenic plants: A heuristic autoregulation model. *Curr. Top. Immunol. Microbiol.* 197, 105-120.
- Meyer, P. and Saedler, H. (1996) Homology-dependent gene silencing in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 23-48.
- Moreno, M., Bernal, J.J., Jiménez, I. and Rodríguez-Cerezo, E. (1998) Resistance in plants transformed with the P1 or P3 gene of tobacco vein mottling potyvirus. *J. Gen. Virol.* 79, 2819-2827.
- Mueller, E., Gilbert, J., Davenport, G., Brigneti, G. and Baulcombe, D.C. (1995) Homology-dependent resistance: Transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *Plant J.* 7, 1001-1013.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.
- OEPP/EPPO. (1991) Recommendations made by EPPO Council. General scheme for the production of certified pathogen tested vegetatively propagated ornamental plants. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 21, 757.
- Ogawa, T., Hori, T. and Ishida, I. (1996) Virus-induced cell death in plants expressing the mammalian 2',5' oligoadenylate system. *Nat. Biotechnol.* 14(11), 1566-1569.
- Opgenorth, D.C., White, J.B., Oliver, B. and Greathead, A.S. (1991) Freeway daisy (*Osteospermum fruticosum*) as a host for lettuce mosaic virus. *Plant Disease* 75, 751.
- Osbourn, J.K., Watts, J.W., Beachy, R.N. and Wilson, T.M. (1989) Evidence that nucleocapsid disassembly and a later step in virus replication are inhibited in transgenic tobacco protoplasts expressing TMV coat protein. *Virology* 172(1), 370-383.
- Palauqui, J.C. and Balzergue, S. (1999) Activation of systemic acquired silencing by localised introduction of DNA. *Curr. Biol.* 9(2), 59-66.
- Palauqui, J.-C., Elmayan, T., Pollien, J.-M. and Vaucheret, J. (1997) Systemic acquired silencing: Transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* 16, 4738-4745.
- Pang, S.-Z., Jan, F.-J. and Gonsalves, D. (1997) Nontarget DNA sequences reduce the transgene length necessary for RNA-mediated tospovirus resistance in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8261-8266.
- Peng, Y.-H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y. and Raccach, B. (1998) Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: Effects on aphid transmission and binding to purified virions. *J. Gen. Virol.* 2, 81-87.
- Pink, D.A.C., Kostova, D. and Walkey, D.G.A. (1992) Differentiation of pathotypes of lettuce mosaic virus. *Plant Pathology* 41, 5-12.
- Pirone, T.P. and Blanc, S. (1996) Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 227-247.
- Powell-Abel, P., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T. and Beachy, R.N. (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232, 738-743.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *gene* 111(2), 229-233.
- Prins, M. and Goldbach, R. (1996) RNA-mediated virus resistance in transgenic plants. *Arch. Virol.* 141(12), 2259-2276.

- Prins, M., Kikkert, M., Ismayadi, C., de Graauw, W., de Haan, P. and Goldbach, R. (1997) Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants expressing NS_M gene sequences. *Plant Mol. Biol.* 33(2), 235-243.
- Reichel, C., Mathur, J., Eckes, P., Langenkemper, K., Koncz, C., Schell, J., Reiss, B. and Maas, C. (1996) Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(12), 5888-5893.
- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T. and Maule, A.J. (1999) New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12(5), 367-376.
- Revers, F., Yang, S.J., Walter, J., Souche, S., Lot, H., Le Gall, O., Candresse, T. and Dunez, J. (1997) Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of lettuce mosaic virus differing in their biological properties. *Virus Research* 47, 167-177.
- Riechmann, J.L., Lain, S. and Garcia, J.A. (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* 73, 1-16.
- Rigden, D.J. and Carneiro, M. (1999) A structural model for the rolA protein and its interaction with DNA. *Proteins* 37(4), 697-708.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10(6), 937-946.
- Ryder, E.J. (1964) Transmission of common lettuce mosaic virus through the gametes of the lettuce plant. *Plant Dis. Reporter* 48, 522-523.
- Ryder, E.J. (1970) Inheritance of resistance to common lettuce mosaic. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 98, 610-614.
- Salomon, R. (1989) A possible mechanism for exclusion of plant viruses from embryonic and meristem cultures. *Res. Virol.* 140, 453-460.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanford, J.C. and Johnston, S.A. (1985) The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J. Theor. Biol.* 113, 395-405.
- Sano, T., Nagayama, A., Ogawa, T., Ishida, I. and Okada, Y. (1997) Transgenic potato expressing a double-stranded RNA-specific ribonuclease is resistant to potato spindle tuber viroid. *Nat. Biotechnol.* 15(12), 1290-1294.
- Schaad, M.C., Haldemann-Cahill, R., Cronin, S. and Carrington, J.C. (1996) Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J. Virol.* 70(10), 7039-7048.
- Schaad, M.C., Jensen, P.E. and Carrington, J.C. (1997) Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: Role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J.* 16, 4049-4059.
- Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H. and Galbraith, D.W. (1995) Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J.* 8(5), 777-784.
- Shigekawa, K. and Dower, W.J. (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques* 6(8), 742-751.
- Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Aoki, S. and Machida, Y. (1993) Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar-binding protein of *Agrobacterium*. *J. Biol. Chem.* 268(35), 26552-26558.
- Shukla, D.D., Ward, C.W. and Brunt, A.A. (1994) Genome structure, variation and function, *The Potyviridae*, pp. 74-110. CAB Int., Wallington, UK.
- Smith, H.A., Swaney, S.L., Parks, T.D., Wernsman, E.A. and Dougherty, W.G. (1994) Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: Expression, regulation and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* 6, 1441-1453.
- Stam, M., de Bruin, R., Kenter, S., van den Hoorn, R.A.L., van Blokland, R., Mol, J.N.M. and Kooter, J.M. (1997a) Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. *Plant J.* 12, 63-82.

- Stam, M., Mol, J.N.M. and Kooter, J.M. (1997b) The silence of genes in transgenic plants. *Ann. Bot.* 79, 3-12.
- Swaney, S., Powers, H., Goodwin, J., Silva Rosales, L. and Dougherty, W.G. (1995) RNA-mediated resistance with nonstructural genes from the tobacco etch virus genome. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, 1004-1011.
- Tenllado, F., García-Luque, I., Serra, M.T. and Díaz-Ruíz, J.R. (1996) Resistance to pepper mild mottle tobamovirus conferred by the 54-kDa gene sequence in transgenic plants does not require expression of the wild-type 54-kDa protein. *Virology* 219(1), 330-335.
- Thornbury, D.W., Hellmann, G.M., Rhoads, R.E. and Pirone, T.P. (1985) Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology* 144, 260-267.
- Thornbury, D.W., Patterson, C.A., Dessens, J.T. and Pirone, T.P. (1990) Comparative sequence of the helper component (HC) region of potato virus Y and a HC-defective strain, potato virus C. *Virology* 178, 573-578.
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J. and Steinbiss, H.-H. (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucl. Acids Res.* 15, 5890.
- van Blokland, R., van der Geest, N., Mol, J.N.M. and Kooter, J.I.I. (1994) Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J.* 6, 861-877.
- van den Boogaart, T., Lomonosoff, G.P. and Davies, J.W. (1998) Can we explain RNA-mediated virus resistance by homology-dependent gene silencing? *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11(7), 717-723.
- van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J. and Stuitje, A.R. (1990) Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291-299.
- van der Vlugt, R.A.A., Ruiter, R.K. and Goldbach, R. (1992) Evidence for sense RNA-mediated resistance to PVY^N in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Mol. Biol.* 20, 631-639.
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. and Rocha-Sosa, M. (1990) Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* 220, 245-250.
- Vardi, E., Sela, I., Edelbaum, O., Livneh, O., Kuznetsova, L. and Stram, Y. (1993) Plants transformed with a cistron of a potato virus Y protease (NIa) are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(16), 7513-7517.
- Vaucheret, H., Palauqui, J.C., Elmayan, T. and Moffatt, B. (1995) Molecular and genetic analysis of nitrite reductase co-suppression in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 248(3), 311-317.
- Vieira, J. and Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19(3), 259-268.
- Vilaine, F., Rembur, J., Chriqui, D. and Tepfer, M. (1998) Modified development in transgenic tobacco plants expressing a rolA::GUS translational fusion and subcellular localization of the fusion protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11(9), 855-859.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M. and Baulcombe, D.C. (1999) Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(24), 14147-14152.
- von der Pahlen, A. and Crnko, J. (1965) El virus del mosaico de la lechuga (*Marmor lactucae* Holmes) en Mendoza y Buenos Aires. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 2, 25-31.
- Weigel, D. and Nilsson, O. (1995) A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377(6549), 495-500.
- White, F.F., Taylor, B.H., Huffmann, G.A., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1985) Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriology* 164, 33-44.

-
- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M.G. and Laliberté, J.-F. (1997) Interaction of the viral genome linked protein of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* 234(1), 84-92.
- Wittner, A., Palkovics, L. and Balazs, E. (1998) *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the plum pox virus helicase gene are resistant to virus infection. *Virus Res.* 53(1), 97-103.
- Yang, S.J., Revers, F., Souche, S., Lot, H., Le Gall, O., Candresse, T. and Dunez, J. (1998) Construction of full-length cDNA clones of lettuce mosaic virus (LMV) and the effects of intron-insertion on their viability in *Escherichia coli* and on their infectivity to plants. *Arch. Virol.* 143(12), 2443-2451.
- Zaitlin, M. and Hull, R. (1987) Plant virus-host interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 291-315.
- Zerbini, F.M., Koike, S.T. and Gilbertson, R.L. (1995) Biological and molecular characterization of lettuce mosaic potyvirus isolates from the Salinas Valley of California. *Phytopathology* 85, 746-752.

7. Anhang

7.1. Sequenz der cDNA von *lettuce mosaic potyvirus*

lettuce mosaic potyvirus (Stamm O): GenBank X97704

```

1 AAAATAAAAC AACCCAACAC AACTCAAGAA AATTCATACA AACAAACAAA TTCGCATTTT
61 CAAGCAATTC ACTTTCAAGC ATTCACAACA TTTTCAACCA CAAATGGCAA CTCTAGACAA
121 CTGCACTCAA GTACACCACA TGTTGCTTA CAATCGCGAA CACGGAACAA ACTACACGAG
181 GAACCATTTT AGAAGATACT TAGCAGCCCA GCGGATAGGC TTCTATTATG ATTGGGACGA
241 TGATGTCTAT GAATGTCCAA CGTGTGAAGC TATATAACCAT TCTTTGGACG ACATAAAGAA
301 CTGGCACGAG TCGGACCCAC CAGCATTCGA CCTTAACGAT TTCATAACTG ATGCTAGGCT
361 GAAATCAGCA CCAGTTCCAG ATCTCGGACC GGTGATCATT GAGATCCCAA AAGCGGAGGA
421 AAAACAAGAG CTTAACTTCT TCGCTGCAAC CCCGGCACCT GAAGTGTAC AATGGAAATG
481 CAGAGGGTTG CAATTTGGTT CATTTACTGA ACTTGAAACA TCTGAACCAG TTGCCTCGGC
541 ACCAGAGCCT AAGTGTGAAG AGCCGGCTAG GACCATCGCA AAGCCAGAGG AGTCAGTCGA
601 ACAAGAGACC CGTGAGATG GAAAAAGACT CCTTCAGGCG CAGATGGAAG TCGACAAAGC
661 CGAACAAGAT CTTGCATTTC CTTGCCTGAA CGCTAGCCTA AAACCTAGGT TGGAGGGCAG
721 AACTACTGCA ACTATTGCAA GCGCAGGGA CGGATGTTTG GTTTATAAAA CCAAACCAAG
781 CTGGTCGCAG AGGAGGAGAG CAAAGAAGAC CCTTAAGGTT GACACCCTAG CTTGCGAAAA
841 CCCATACATT CCAGCAATTG TTGACAAGAT CTCAATTGCA GGAGGCTCAT CAGCTAGTGT
901 GATGCATGAA CAACAGAAAC CTAAACTCT GCACACTACA CCATCAAGAA AGGTGGCCAC
961 GCATTATAAA CGGACGGTGA TGAACCAACA GACTCATG GCCTTTATAA ATCAAGTTGG
1021 CACGATTCTA CTAAACGCAG AGAAAGAGTT TGAAGTGGTA GGCTGCAGAA AACAAAAAGT
1081 AACTGGCAAG GGAAGTAGAC ATAATGGTGT GAGGCTGGTA AAGCTTAAAA CTGCACATGA
1141 GGAAGGACAT CGGAGAAGAG TAGATATACG CATCCCCAAT GGCTGCGCC CAATTGTTAT
1201 GCGTATTTCA GCTAGAGGCG GTTGGCACAG AACATGGACA GACTCAGAAC TATCCCCAGG
1261 ATCAAGCGGT TACGTATTGA ACTCGTCAA AATCATAGGA AAATTTGGTT TAAGGCGACA
1321 CAGTATATTC GTTGTTAGGG GTAGGGTAGA TGGTGAAGTT ATAGATTCGC AAAGTAAGGT
1381 CACACACTCC ATCACGCACC GTATGGTTCA ATACAGCGAC GTCGCACGAA ACTTCTGGAA
1441 CGGATACTCA ACTTGTTTCA TGCACAACAC CCCAAAGGAC ATACTCCATA CCTGCACATC
1501 AGATTTTGAT GTTAAAGAAT GTGGCACTGT CGCAGCACTT TTAACTCAA CACTGTTTCA

```

1561 ATTTGGGAAA ATCACCTGTG AAAAATGCGC AATCGAGTAC AAAAATCTAA CGCGAGATGA
1621 GCTTGCCACG CGTGTTAATA AGGAGATTGA TGGAACCATA ATCAGTATTC AAACCTCAGCA
1681 TCCACGCTTC GTGCATGTAC TCAATTTTCT CAGGTTAATT AAACAAGTGC TCAATGCTAA
1741 GAATGGGAAC TTTGGAGCAT TTCAAGAGAC GGAGAGGATA ATTGGGGATC GAATGGATGC
1801 ACCTTTCTCA CACGTAAATA AGTTGAATGC TATCGTCATT AAAGGTAATC AAGCAACGTC
1861 TGATGAGATG GCACAAGCAT CGAACCATGT CCTCGAAATC GCGCGATATC TCAAAAACCG
1921 GACTGAGAAC ATCCAAAAGG GCTCACTAAA GTCATTGAGG AACAAGATCT CCGGTAAGGC
1981 AACTTAAAT CCGAGCCTTA TGTGTGACAA TCAACTTGAT AAGAACGGCG GGTTTGAATG
2041 GGGGCAGCGA AGTTACCATG CAAAAGGTT TTTCGACGGG TACTTTGAAA CCATCGACCC
2101 ATCCGATGGC TATAGCAAAT ACACCATAAG ACGCAATCCA AATGGACATC GAAAGTTGGC
2161 AATTGGTAAT TTGATCGTCT CTACGAACTT TGAATCACAT AGAAGAAGCA TGATTGGAGA
2221 ATCGATTGAA GACCCTGGTC TACTAACCA GTGCGTGAGC AAAGAGGGAG ATACTTTCAT
2281 ATATCCATGC TGCTGTGTAA CAGATGAATA TGGTAAACCA ACATTATCTG AGATTAAAAT
2341 GCCACAAAG CATCATCTAG TCCTAGGAAA TGCCGGTGAC CCCAAATATG TGGATTTACC
2401 AAAGGAAGCG GAAGGAAAGA TGTTTCGTAAC AAAAGACGGA TATTGTTACA TAAACATCTT
2461 CTTGGCTATG CTTGTGACG TCCAGAGGA TCAAGCTAAA GATTTACGGA AGATGGCAGC
2521 CGAGATAGCA GTGAAACAGC TCGGGGAGTG GCCCTCAATG ATGGATGTGG CGACGGCTTG
2581 TAATATATTA GCTACATTTT ATCCAGACAC CCGAAGATCG GAGTTACCTC GAATCTTAGT
2641 CGATCACGCA ACGAAAACAT TCCATGTAAT TGAATCATAT GGTTCATCA CGACTGGATT
2701 CCATATTCTG AAAGCCAACA CCGTGACACA ACTCGTCAAG TTCGCGCATG AGTCACTAGA
2761 ATCTGAGATG CAACACTACA GAGTAGGGGG GGAACCAGAT AAAGCACCCA GGAAACCAGC
2821 TGGTAGTGTC CCAACTCTAG GAATTTGAGA CCTCAGGGAC CTTGGAGTGG AATTAGAAAA
2881 CGAAGAGCAC TCAATCCGGC CAAATCTCCA AAGGTTGATC AAGGCGATTT ATAGACCCCG
2941 AATGATGCGC AGCCTCTTAA CAGAGGAACC ATACTTGTTA ATCCTAAGTA TTGTGTCCCC
3001 TGGCGTTCTG ATGGCACTCT ACAACAGTGG TTCCTTGAG CGGACAATGC ATGAGTTCTT
3061 GCAAACCTGAT CAGAGACTGA GCGCCACCGC CCAAATCCTA AAACATCTAG CAAAGAAAGT
3121 TTCCTCGCA AAGACACTTA CAATCCAGAA TGCTATCTTG GAGGGTGGAG CAGGATCACT
3181 GAATGAGATT CTTGACGCGC CTGCGGGACG ATCCTTATCG TACAGACTGG CAAAGCAGAC
3241 GGTGGAGGTT ATGATGGCCC GGAGCGACAT GGATAAGGAA CTGGTGGACG TTGGATTTAG
3301 CGTTCTTAGG GACCAGAAGA ATGAACTCAT AGAAAAAAGT TATCTCATGG ATTTGGAGGA

3361 TTCGTGGCAC GCACTACCAT TGTGTGGAAA ATTATCAGCA ATGCGAGCCT CGCGGCGATG
3421 GCGGGATACT TCTACTCCAG AAGTAATCCC AACAGGCGCC GCAGATTTGA AAGGCAGATA
3481 CAGTATCTCG GTTGGATCTG TTTCCAAAAG CGCGATCTTG CACCTAAAGG GAATTTGCTC
3541 AGGCGCAGTA AAGAGAGTTA GAGACAAGTG GGTCCGAGTG CAAGTGCAAG GCGTAAAATG
3601 GTTAGCTAAA TCAGTGCACT ACATGATACC AGAACTAACG AACATATTGA ACGTTGGAAC
3661 TCTCCTCCTA ACACTGATAT CGCTAGGCGT AGCATTCCGG AACCTGACTG GCCAGTTTAA
3721 AGAGATGAAG CATAAAGAGA CGCTGGCAAA GGAGGAGGAA CTACGTAAGC GCATACGCAC
3781 CTACAATAGC ACTTATTACG AAATCCACGG AAAGCACGCT GATGCCAAAC AAATCACTAA
3841 GTTCATAACA CACCATGATC CAAACTACT AGAAGTAGTT GAATTTTACG AAGGTCCTGA
3901 AGAAGAAGAA GTAGAGCATC AAGCAAAGCG AGAGGATCAA GCTAATCTCG AACGCATTAT
3961 CGCTTTCACA GCTTTGGTGA TGATGATGTT TGACAGCGAG AGAAGTGATT GCGTGTACAG
4021 GAGTTTATCA AAGCTCAAAT CATTAGTATC TACGTGCGAG GATGATGTAC GCCATCAGAG
4081 CGTTGATGAG ATCATTGACC TATTTGATGA GAAGAAAGAA ACTATAGATT TCGAGATTGA
4141 AGGAAAAGAA CTTTACTCTT CTCGCGTGGT GGATTCGACA TTCAGTAAGT GGTGGGACAA
4201 CCAATTGGTA CGAGGCAACA CGATGGCACA CTACAGAACA GAGGGGCACT TCATGACGTT
4261 CACTCGTGAA ACAGCTGCGA GCGTGGCAGC CGAAATAGCA CATAACGAGT ATAGAGATAT
4321 CCTCTTGCAA GGTGGTGTGCG GCTCCGGTAA GTCCACAGGT CTCCATTTT ATTACACAG
4381 GAAAGGAGGT GTGCTACTCA TCGAACCAAC TCGTCCGTTA GCTCAAACG TATACAAGCA
4441 GCTTGGAAGT AGTCCTTTTC ACCTGTCACC AAATTTGCGC ATGCGAGGTT CTTGCAAGTT
4501 TGGATCTAGT CAGGTAAGT TGGCCACGAG TGGTTATGCC TTACATTTCA TAGCGAACAA
4561 TGCGCAAAGT CTTAAGGCAT ATGACTTTAT CATTTTCGAT GAATGTCACG TATTAGACGC
4621 CAGTGCAATG GCGTTTAGAT GCTTGCTGCA GGAGTTCGAG TATCAAGGGA AGATCATAAA
4681 GGTATCAGCT ACGCCACCGG GAAGGAAGCT TGACTTCAA CCAATGCACA TGGTCGATAT
4741 TGCTACAGAA AATGAACTAT CGATACAGCA ATTCGTCCAA GGTC AAGGAA CTGGAGTGAA
4801 CTGTGATGCA ACAAAGAAAG GAGACAACAT CTTGGTCTAC GTCTCAAGTT ACAACGAAGT
4861 AGACATGTTG AGCAAAATGT TAAACGACAA AGGTTACAAA GTGACAAAGG TTGATGGTAG
4921 GACGATGAAG TTAGGGAGTG TGGAAGTAGA AACAGTAGGC ACCCCGCAGC GGAAACACTT
4981 TGTAGTGGCA ACCAACATCA TAGAAAATGG CGTTTACTG GATGTCGATG TTGTGGTGGA
5041 TTTCGGACAG AAGGTAGTCC CCATTCTTGA TAGCGAGCAC CGAATGATTC GGTATACAAA
5101 GAAAAGTATT ACATATGGTG AGCGCATCCA AAGAGTGGGA AGGGTTGGGC GAAACAAAGC

5161 TGGTTCTGCC ATCCGGATAG GAAGCACTGA GATGGGGACG GAAGAAATAC CAGCATCAAT
 5221 CGCAACAGAA GCAGCCTTTT TGTGTTTCAC ATACGGACTT CCTGTCATGA CAAGCAACGT
 5281 GAGCACAAGT GTACTTGGCA ATTGCACAGT AAGACAAGCA CGGACGATGC AAAAGTTTGA
 5341 GCTGTCCCCC TCCTTTATGG TTGACTTGGT ACACCACGAC GGTACAATAC ACCCAGCAAT
 5401 TAACAGCCTC CTGAGACAGT TCAAGTTGAA GGAATCAGAC ATCAAATAA GCACGCTGGC
 5461 AATACCGAAT GCAGTGACCA CATTCTGGAA AAGCGCTCGA GAGTACAACCT CCTTAGGTGC
 5521 CCGCACAACA ATTGATGACG CAGCTAAAAT ACCATTTATG ATCAAGGACG TTCCAGAACA
 5581 CTTGCAGGAA AAGCTTTGGG AGACAATCCA GCAGTATAAG GGTGATGCGG GTTTTGGGAG
 5641 ATGTACATCA GCTAATGCGT GCAAAATAGC ATACACACTC TCTGTGAGTC CCTTCATGAT
 5701 CCCAGCAACA ATCAACAAGA TTGATGCCCT GATGGCCGAA GAACGACAAA AGATGGAATA
 5761 CTTCCAAACA GTCACAGCTA ACACATGTAC AATCTCAAAC TTCTCCATTA GTAGTATTGG
 5821 TGACATGATC AGGTCGAGAT ACTCAACAAA CCATTCTAGA GAGAACCCTGC AAAAACTACA
 5881 AGCAGTCAGA GACACAATCA TCAACTTCGA GTGCCAGGCT GGAAGTGGTG ACGGGGGTTC
 5941 CTTGCACATG GAGACAGCAC AGAAATTGGC AGAGGAGTAT GGGTGCATCG ATGTCATTTA
 6001 TCACCAATCG AAAGAAGCTC TCAGTAAACG ACTCGGTCTC AAAGGCAGAT GGAATCAGAG
 AACAATGTCTG AAAGAAGCTC TC 3'
 6061 CCTGATATGC AAAGATTTAT TGGTCTTCTG CGGCGTAGCC ATTGGCGGCA CATGGATGAT
 3' GACT ACGTCAAGCT TTTCGAACGT T 5' LMV3
 6121 GTTTCAGAGC TTCAAGGACG GGATGGCTGA TGCAGTTCGA CACCAAGGCA AAGGTAAACG
 LMV2 5' TCGA AAAGCTTGCA AAGGTAAACG
 6181 GCAAAGACAG AAGCTCCGTT ATCGACAAGC AAGGGACAAC AAGGTAGGCA TTGAAGTTTA
G 3'
 3' ACCACTGCTA CGCTGCTACC 5' LMV6260R
 6241 TGGTGACGAT GCGACGATGG AACACTATTT TGGAGCTGCG TATACGGAGA AAGGGAAGAA
 6301 ATCCGGAAAA ACGAAAGGAA TGGGAACGAA AAATCGAAGA TTTGTAAATA TGTATGGATA
 6361 CAACCCAGAA GATTTCTCAT TCATCCGATT TCTGGACCCG CTCACAGGGA AAACAATGGA
 6421 CGAACAAGTA TTTTCTGACA TAAGTCTCGT CCAAGATGCC TTTAGTAAGG AAAGACTCAA
 6481 ACTCCTATCC GAAGGAGAAA TCGAATCGGA GCACATGCGA AACGGAATTA GAGCTTATCT
 6541 TGTCAGAAGT CTTACCACAG CAGCACTCGA GATAGACATG ACCCCTCACA ACTCTTGCCA
 6601 GCTCGGAGCC AAGACAAACA ACATAGCAGG ATATGTGCGAC AGAGAATATG AATTGCGTCA
 6661 GACTGGAGAA GCTAGGGTTG TTGCTCCAGC ACTGATCCCA AAGGACAATC CAATTACGGA
 6721 CGAAGACATC CCTGTAAAGC ACGAAAGCAA AACACTGTTC AGGGGCTTAA GAGATTACAA
 6781 CCCTATAGCA GCAGCAATAT GCTTGCTTAC CAACGAATCG GATGGAATGA AAGAGACAAT
 6841 GTATGGCATT GGTTTTGGTA ACACAATTAT TACAAACCAA CACCTATTCA GCGCAACAA

6901 TGGCGTATTG AGGGTTCAAT CGAGACATGG TGAATACGTG CTTCCGAATA CAACGCAGCT
6961 CAAAGTACTT CCTTGTGAAG GAAGGGACAT AATGGTTATC ATTCTCACAC CAGACTTCCC
7021 TCCGTTTCCA CAAAAGCTGA AATTCGGTCC ACCGATCAAA GGAGAGAAGA TTTGCCTCGT
7081 TGGATCCTTA TTCCAGGATA AGAGCATCAC CAGCACCGTA TCTGAGACGA GCGTGACAAC
7141 ACCAGTGGAC AACAGCTTCT TGTGGAAACA CTGGATCACT ACAAAGATG GCCATTGCGG
7201 ACTTCCACTA GTATCATCAA ATGATGGATA CATAGTCGGA ATCCACAGTG CTACGAGTTC
7261 ACGACAAACA CAGAACTATC ATGCAGCGAT GCCCGAAGAT TTTCATCAAA CACATCTTAT
7321 AGATCCAGCT TCAAAATCGT GGGTGAACA TTGGAAATAC AATCCAGATA ACATGGTTTG
7381 GGGGGCATA AATCTCATCA ATAGTACCCC AAGAGAACCC TTCAAATAA ACAAATTAGT
7441 GACAGACTTA TTCGGAGACG CAGTACAGTT TCAATCCAAA CAAGACGAAT GGTGGCAAG
3' CCTCTGC GTCATGTCAA AGTTATTCTA TAG 5' LMV4
7501 TCAATTGAAA GGCAACTTGA AAGCAGTGGG GAAGAGCACA AGCCAACTCG TAACAAAGCA
7561 CACAGTCAAG GGTAAGTGCA TGATGTTTGA GCTATACCTG CAAACACACG AAGAGGAAAA
7621 GGAGTTCTTC AAACCACTGA TGGGAGCCTA CCAGAAGAGC CGCTTGAACA GAGAAGCATT
7681 CACAAAAGAC ATCATGAAAT ACTCCACACC GATAACAGTG GGCATCGTCG ATTGCGACAC
7741 GTTTTTGAAA GCCGAAGAAG GAGTCATAAA ACGCTTAGAG AGACTTGGAT TCAGTGGTTG
7801 CGAATACGTT ACAGATGAAG AGGCAATCTT TCAAGCCCTG AATATGAAAG CGGCTGTTGG
7861 TGCACTATAT AGTGGAAGA AGAGGGATTA CTTGAGGGC TACGGTCCAG AAGAAAAAGA
7921 GAATATCTTG AGAGAAAGCT GCAAACGACT ATATACAGGT AAGTTTGGAG TTTGGAATGG
7981 GTCACTCAAG TCGGAACTGA GACCTATGGA AAAAGTCATG GCCAATAAGA CACGTGTCTT
8041 TACGGCAGCG CCGCTCGACA CTCTGCTTGC TGGAAAAGTC TCGTGTGATG ACTTTAACAA
8101 CTACTTCTAC AGCAAAAACA TCGAAGCACC TTGGACAGTT GGTATGACGA AGTTTTATGG
8161 TGGTTGGAAT GAGCTCCTCA CGAAGTTACC AGATGGCTGG GTTTATTGCG ATGCAGATGG
8221 ATCACAATTT GATAGTTCTT TGTCACCATT TCTCATCAAC TCAGTGCTCA GAATACGTTT
8281 AAAATTCATG GAGGATTGGG ATCTTGGTGA ACAGATGCTC AAAAATCTGT ACACAGAAAT
8341 TGTATACACA GCGATCCTCA CTCCAGATTC AACCATAGTG AAGAAGTTCA AGGGAAATAA
8401 CAGCGGACAG CCATCCACGG TAGTAGACAA CACATTGATG GTTGTGTTGG CTATGACATA
8461 CACGCTGCAC AAGTTAGGCT TTGAAGATGA GGAACAAGAC TCTATGTGCA AGTACTTCGT
8521 CAATGGAGAC GACCTGATCA TCGCGATAAA ACCAGAACAC GAATCATTAC TGGATCAGTT
8581 CCAACATTGT TTCAAAGTT TGGGCCTAAA TTACGATTTT AACTCACGAA CGAGGAAGAA
8641 GGAAGAATTG TGTTTCATGT CACATTGCGG CATCAAGAAA GACGGAATTT TCATTCCAAA

8701 ACTCGAACCA GAGCGCATTG TGTCAATCCT AGAGTGGGAT AGGTCAGACC AGCCAGTGCA
 8761 TCGCTTAGAG GCCATATGTG CAGCAATGAT CGAATCATGG GGTTACGACA AATTAACCCA
 8821 TGAAATTCGA AAATTCTACA AGTGGTGCCT GGAACAAGCA CCATATGCTG ATTTGGCGAA
 8881 AGCGGGAAAA GCACCGTACA TAGCAGAGTG TGCTCTTAAA CGATTATACA CCAGCAAGGA
 8941 AGCCAGCGAA GCGGAGTTAG AAAAATACAT GGAAGCTATA CGCAGTCTTG TCAATGATGA
 9001 AGATGACGAT GATATGGATG AGGTCTATCA TCAAGTAGAC GCAAAGCTTG ATGCAGGCCA
 9061 AGGCAGTAAA ACTGATGATA AGCAAAAGAA CTCAGCGGAT CCAAAGGATA ATATCATCAC
 9121 AGAGAAAGGA AGTGGTTCTG GGCAGATGAA GAAGGATGAC GACATCAACG CAGGGCTACA
 CORE1 3' G TCGACTAATA GAAGGATGAC GACATCAAC 5'
 9181 TGGTAAACAC ACCATACCTC GTACAAAGGC AATCACACAG AAAATGAAGT TACCAATGAT
 9241 CCGAGGTAAA GTGGCTTTAA ACCTTGATCA TTTGCTGGAG TACGAACCAA ACCAGAGAGA
 9301 CATATCGAAC ACACGTGCAA CCCAGAAACA GTACGAGTCA TGGTACGACG GGGTTAAGAA
 9361 TGACTIONGAT GTGGATGATA GTGGCATGCA ATTAATTCTG AACGGATTGA TGGTTTGGTG
 9421 TATAGAAAAC GGGACATCCC CGAATATAAA TGGAACATGG GTGATGATGG ATGGTGAAGA
 9481 ACAAGTAGAA TATGCTCTAA AACCCATCAT CGAACACGCG AAACCCACGT TTCGCCAGAT
 9541 AATGGCCCAC TTCAGTGACG CAGCCGAGGC GTACATTGAG ATGAGAAACA AGAAGAAACC
 9601 GTATATGCCA CGATACGGAC GGCTACGAGG CTTGAACGAT ATGGGGCTAG CTCGCTATGC
 9661 TTTCGACTTC TACGAAACAA CATCAGCGAC CCCAAATCGG GCAAGAGAGG CGCACAATCA
 9721 AATGAAGGCA GCTGCTCTAG TGGGAACACA GAACAGACTG TTTGGAATGG ATGGAGGCGG
 3' CTTCTCTTGT GCCTCTCCGA GCTC 5' CORE2
 9781 TTCAACCCAG GAAGAGAAACA CGGAGAGGCA CACAGCCGCA GATGTAAATC AGAATATGCA
 9841 TACTCTCTTA GGCGTGAGAG GGTGCACTA AAGGCGTGTG TTGGCATTTA AAGACTGTAG
 9901 TATAAATCTA TAATATAGTG AGTGTTTAC TCCTTTTATG TTTATGTATG CACTTATTTG
 9961 TCCGTTAGTA TTCTCTCCCT GTACTTCGCT CGTGAGGGCG TAGGTTTACG TGAGGGCTTT
 10021 TCTAGTTTCC GCTGTGAGGT TTTACCTCGA AGGTTGCTAG TCTGGTTTTT AGTCGGAGAC

Anhang 1 : cDNA der genomischen RNA von *lettuce mosaic potyvirus* (Stamm O) - GenBank X97704 - und die Bindungsstellen der Primer LMV1, LMV2, LMV3, LMV4, CORE1, CORE2 und LMV6260R (identische Sequenzen unterstrichen).