

Aus dem Institut für Obst, Gemüse und Weinbau
Universität Hohenheim
Fachgebiet Weinbau
PD Dr. Götz M. Reustle

**Entwicklung von „screening“-Methoden zur Analyse von PTGS-basierter
Resistenz gegen Nepoviren in Pflanzen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Agrarwissenschaften

vorgelegt

der Fakultät Agrarwissenschaften

von

Patrick Winterhagen

aus Neustadt an der Weinstraße

2006

Die vorliegende Arbeit wurde am 26.07.2006 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung:	08.08.2006
1. Prodekan:	Prof. Dr. K. Stahr
Berichterstatter / 1. Prüfer:	PD Dr. G. M. Reustle
Mitberichterstatter / 2. Prüfer:	Prof. Dr. R. Blaich
Berichter / 3. Prüfer:	Prof. Dr. H. Buchenauer

Druck und Bindung:
Buchbinderei Boschert, Blöckenstraße 1, 67434 Neustadt / Diedesfeld, www.Boschert-NW.de

Was wir wissen ist ein Tropfen,
was wir nicht wissen, ein Ozean.

Isaac Newton (1643-1727)

Dank

Frau Dr. G. Krczal danke ich für die Möglichkeit, dieses spannende Thema in Form einer Doktorarbeit bearbeiten zu dürfen.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. G. M. Reustle bedanken, der viel Zeit und Mühe investierte und mir eine hervorragende Betreuung gewährte. Er war stets bereit, auf fachliche Fragen einzugehen und mich zu unterstützen.

Meinen Dank möchte ich Herrn Dr. P. Dunoyer (Straßburg, Frankreich) aussprechen, bei dem ich die Möglichkeit hatte die Methode zur siRNA-Analyse zu erlernen. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Y.-C. Jeun (Jeju, Korea) bedanken, der mir die Techniken für die Elektronenmikroskopie zeigte. Bei dem Team aus der Phytomedizin des Dienstleistungszentrums Rheinland-Pfalz möchte ich mich für die Überlassung der Initialpopulation für die Nematodenzucht bedanken.

Für die wertvolle Unterstützung beim Klonieren der Konstrukte und beim Anfertigen der Southern Blots danke ich Frau C. Dubois. Mein Dank gilt auch Herrn T. Manthey, Frau P. Paschiller, Frau C. Kehrer und Frau A. Baßler für die zuverlässige Betreuung der *in vitro* Kulturen. Ebenso sei Herrn H. Herrmann für die Pflege der Pflanzen im Gewächshaus gedankt.

Für hilfreiche fachliche Diskussionen möchte ich mich außerdem bei Frau Dr. G. Krczal, Herrn Dr. G. Buchholz, Herrn Dr. P. Cobanov, Herrn Dr. M. Höfer, Herrn Dr. M. Wassenegger und Herrn Dr. T. Wetzel bedanken.

Dem gesamten Team von AlPlanta möchte ich für das tolle Arbeitsklima danken.

Ganz besonders danke ich Frau I. Wiedler für ihren Zuspruch und ihre Geduld an den zahlreichen Abenden, die ich im Labor und vor dem Computer verbrachte.

Für die Unterstützung in jeder Hinsicht während der gesamten Promotion möchte ich meinen Eltern herzlichst danken.

Abkürzungen und Einheiten

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
AGO	Argonaute
AK	Antikörper
Amp	Ampicilin
ANOVA	"analysis of variance"
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperdisulfat
ArMV	Arabis mosaic virus
AS	Acetosyringon
ASR Protein	"ABA [abscisic acid]-, stress-, and ripening-induced protein"
ATP	Adenosintri-phosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
BAR	PPT-Acetyltransferase
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	"bovine serum albumin"
Carb	Carbenicilin
cDNA	"copy DNA"
CP	"coat protein" (= virales Hüllprotein)
CPMR	"coat protein mediated resistance"
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DCL	"Dicer-like"
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DI	"defective interfering"
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dpi	"day post infiltration / inoculation"
ds	"double strand"
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure 2Na-2H ₂ O
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GFkV	Grapevine fleck virus
GFLV	Grapevine fanleaf virus
GFP	"green fluorescent protein"
h	Stunde
HMW	"high molecular weight"
hp	"hairpin"
IC-RT-PCR	"immuno capture RT-PCR"
IPS	Impulse pro Sekunde
ITS	"internal transcribed spacer"
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
LB-Medium	Luria-Bertrani-Medium
LMW	"low molecular weight"
LS-Medium	Linsmaier-Skoog-Medium
M	Mol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

mg	Miligramm
min	Minute
mL	Mililiter
mM	Milimol
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MP	"movement protein"
MPc	"MP core"
MPd	"MP deleted"
mRNA	"messenger RNA"
MS-Medium	Murashige-Skoog-Medium
NAA	1-Naphtalenessigsäure
NaAc	Natriumacetat
NAD	NADH-Dehydrogenase
NCR	"non coding region"
NN-Medium	Nitsch-Nitsch-Medium
nos	Nopalinsynthase
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	"open reading frame"
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	pH-Wert
PPT	Phosphinotricin
PTGS	"post-transcriptional gene silencing"
PVP	Polyvinylpyrrolidinon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidinon
qRT-PCR	"quantitative realtime PCR"
RDR	"RNA-directed-RNA-polymerase"
RdRp	"RNA-dependend RNA polymerase"
RISC	"RNA induced silencing complex"
RNA	Ribonukleinsäure
RpRSVg	Raspberry ringspot virus, "grapevine"-Isolat
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
sat	Satelliten
scFv	"single chain variable fragment"
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	"small interfering RNA"
Spc	Spectinomycin
ss	"single-strand"
Str	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBSV	Tomato bushy stunt virus
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N ⁺ , N ⁺ -Tetramethylethylendiamin
Tm	Annealingtemperatur für Primer
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	ultraviolett
vol	Volumen
VPg	"viral protein genome-linked"
WT	Wildtyp
XC	Xylencyanol
xg	x Erdbeschleunigung

INHALT

1	EINLEITUNG	- 5 -
1.1	Reisigkrankheit im Weinbau und Virusübertragung	- 6 -
1.2	Resistenz gegen phytoparasitische Nematoden	- 8 -
1.3	Strategien für Virusresistenz in Reben	- 9 -
1.4	Regulation der Expression durch „gene silencing“ als universelles Kontrollsystem	- 10 -
1.5	Virusinfektion und PTGS	- 11 -
1.6	Virusinfektion in Kombination mit „defective interfering“-RNA	- 14 -
1.7	Induktion von Virusresistenz durch transgenvermitteltes PTGS	- 16 -
1.8	Zielsetzung	- 17 -
2	MATERIAL UND METHODEN	- 18 -
2.1	Material und Bezugsquellen	- 18 -
2.2	Gewebekultur und Transformation von Pflanzen	- 19 -
2.2.1	Transgene <i>Nicotiana benthamiana</i>	- 19 -
2.2.2	Transgene Reben	- 20 -

2.3	Molekularbiologische Methoden	- 20 -
2.3.1	Klonierung der virusresistenz-induzierenden Konstrukte	- 20 -
2.3.2	Klonierung des GFP-Sensorkonstrukts	- 21 -
2.3.3	DNA-Extraktion	- 23 -
2.3.4	RNA-Extraktion	- 26 -
2.3.5	Enzyme Linked Immuno Sorbent Essay (ELISA)	- 29 -
2.3.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	- 30 -
2.3.7	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	- 30 -
2.3.8	Immunocapture-RT-PCR (IC-RT-PCR)	- 31 -
2.3.9	quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)	- 31 -
2.3.10	Northern Blot	- 32 -
2.3.11	Southern Blot	- 34 -
2.3.12	Hybridisierung mit radioaktivmarkierter Sonde (Northern Blot)	- 34 -
2.3.13	Hybridisierung mit dem DIG-Labeling System (Southern Blot)	- 35 -
2.3.14	Virusisolation aus Blattmaterial	- 36 -
2.4	Infiltration der Sensorkonstrukte	- 37 -
2.4.1	Agrobakterien-Infiltration	- 37 -
2.5	Virusinokulation	- 38 -
2.5.1	Inokulation von <i>Nicotiana benthamiana</i> und <i>Chenopodium quinoa</i>	- 38 -
2.5.2	<i>Xiphinema index</i> -Kultur im Gewächshaus	- 38 -
2.5.3	<i>In vitro</i> Dualkultur mit <i>Xiphinema index</i> und Reben	- 39 -
2.6	Transmissionselektronenmikroskopie	- 39 -
2.6.1	Virusnachweis im Odontophor von <i>Xiphinema index</i>	- 39 -
3	ERGEBNISSE	- 41 -
3.1	Thermodynamische Analyse der virusresistenz-induzierenden Konstrukte	- 41 -
3.1.1	DI-Konstrukte	- 42 -
3.1.2	IR-Konstrukte	- 43 -
3.2	Transgene <i>Nicotiana benthamiana</i> als Modellsystem	- 44 -
3.2.1	Biologische und molekulare Charakterisierung	- 44 -
3.2.2	Agrobakterien-Infiltration mit GFP-Expressionsmodell	- 50 -
3.2.3	Agrobakterien-Infiltration und Challenge-Inokulation	- 56 -

3.2.4	Bestimmung der Kopienzahl des Transgens mittels Southern Blot	- 63 -
3.3	Transgene Reben	- 64 -
3.3.1	Molekulargenetische Charakterisierung	- 64 -
3.3.2	Agrobakterien-Infiltration und GFP-Expression	- 70 -
3.4	Virusinfektion von Reben	- 72 -
3.4.1	Entwicklung einer Dualkultur	- 72 -
3.4.2	<i>In vitro</i> Dualkultur	- 74 -
3.4.3	Infektionsversuche mit der <i>in vitro</i> Dualkultur	- 77 -
3.4.4	Virusinfektion durch mechanische Inokulation	- 79 -
3.4.5	Virusinokulation durch Pfropfung	- 80 -
4	DISKUSSION	- 82 -
4.1	Resistenz gegen Nepoviren durch transgen-induziertes PTGS	- 82 -
4.2	Charakterisierung transgener <i>Nicotiana benthamiana</i>	- 83 -
4.3	Charakterisierung transgener Reben	- 91 -
4.4	Virusinokulation durch Nematoden in der <i>in vitro</i> Dualkultur	- 94 -
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	- 96 -
5	ZUSAMMENFASSUNG	- 98 -
6	SUMMARY	- 100 -
7	LITERATUR	- 102 -
8	ANHANG	- 112 -

1 Einleitung

Die Rebe gehört zu den ältesten Kulturpflanzen und stellt einen wichtigen Wirtschaftsfaktor dar. Die weltweite Rebfläche umfasst etwa 10 Millionen Hektar, wobei der Anbau für Wein dominiert und nur ca. 17% auf den Anbau von Tafeltrauben und Rosinen entfallen. Etwa 60% der Weltrebfläche sind in Europa lokalisiert, wodurch die wirtschaftliche Bedeutung des Weinbaus auf diesem Kontinent deutlich wird. In Deutschland liegen 13 Weinanbaugebiete mit einer Gesamtfläche von 100.000 Hektar, die hochklassige und charakteristische Weine liefern.

Rebanlagen sind intensiv bewirtschaftete Monokulturen und werden durch unterschiedliche Pathogene wie Pilze und tierische Schädlinge bedroht, denen mit entsprechenden Pflanzenschutzmaßnahmen begegnet wird. So stehen für Pilzkrankheiten zahlreiche Fungizide mit breiter oder spezifischer Wirkung zur Verfügung (Henningsen, 2003, Pearson & Riegel, 1983). Auch die Züchtung pilzresistenter Sorten wird aktuell intensiv verfolgt (Cindric *et al.*, 2003). Einem bedeutenden Schadinsekt des Weinbaus, der Reblaus, konnte durch Pfropfen der Edelreife auf resistente bzw. tolerante Unterlagen Einhalt geboten werden (Granett *et al.*, 1987, Lider, 1957). Der Befall durch Traubenwickler verursacht Eintrittspforten für Pilzkrankheiten, die neben den direkten Ertragsverlusten durch das Insekt zu zusätzlichen Ausfällen führen. Konventionelle Maßnahmen mit Insektiziden und Fungiziden, aber auch vorbeugende Methoden, wie das Ausbringen von Sexualpheromon, werden zur Schädlingskontrolle angewandt (Louis *et al.*, 2002).

Eine großes Problem bilden verschiedene Viruskrankheiten, weil hierfür im Gegensatz zur Bekämpfung von Pilzen und tierischen Schädlingen keine Pflanzenschutzmaßnahmen zur Verfügung stehen. Verschiedene Virosen können Ertragsverluste und mindere Qualität der Trauben zur Folge haben und die vorzeitige Rodung der Anlage erfordern. Da eine

Bekämpfung der Virusinfektion nicht möglich ist, wird versucht die Ausbreitung der Virose durch zertifiziertes, virusfreies Pflanzgut zu kontrollieren. Diese phytosanitären Maßnahmen sind sehr aufwändig und kostspielig und können eine mögliche Reinfektion von Neuanlagen nicht unterbinden. Die Virusübertragung von infizierten auf gesunde Reben kann sehr effizient durch tierische Vektoren erfolgen, wobei die Möglichkeiten zur Eindämmung insbesondere bodenbürtiger Vektoren begrenzt sind.

1.1 Reisigkrankheit im Weinbau und Virusübertragung

Die als Reisigkrankheit bezeichnete Virose hat im Weinbau weltweit die größte Bedeutung und verursacht ernsthafte wirtschaftliche Einbußen (Andret-Link *et al.*, 2004a). Je nach Rebsorte können Ertragsverluste von bis zu 90% auftreten, ebenso ist eine verminderte Qualität die Regel (Mannini, 2003). Die Symptome befallener Reben sind vielgestaltig, und sie variieren zudem bei verschiedenen Rebsorten. Merkmale sind formveränderte Blätter mit Panaschüren bis hin zu Nekrosen. Bei Trieben treten gehäuft gestauchte Internodien und unvollständige Verholzung auf. Die Trauben neigen zu starker Verrieselung und zeichnen sich durch Kleinbeerigkeit aus (Abb. 1, A) (Bovey *et al.*, 1980, Raski *et al.*, 1983).

Verschiedene Nepoviren aus der Familie der Comoviridae sind die Auslöser der Reisigkrankheit (Abb. 1, B). Virusinfektion mit Grapevine fanleaf virus (GFLV) fällt insbesondere durch Kümmerwuchs auf und kann bei Mischinfektion mit Grapevine fleck virus (GFkV) oder Arabis mosaic virus (ArMV) darüber hinaus zum Absterben der Rebe führen (Mannini, 2000, Raski *et al.*, 1983). Wie eine Vielzahl von Pflanzenviren besitzen Nepoviren ein Genom mit einzelsträngiger, positiv orientierter RNA. Das RNA-Genom ist in zwei Stränge (RNA 1 und 2) aufgeteilt und liegt einzeln in separaten Viruspartikeln vor. RNA 1 weist eine Länge von ca. 8000 Nukleotiden (nt) auf, während RNA 2 nur ca. 4000 nt umfasst (Hull, 2002). Beide Stränge sind am 3'-Ende polyadenyliert, das 5'-Ende der viralen RNA weist ein über Phosphodiester gebundenes „viral genome-linked protein“ (VPg) auf (Margis *et al.*, 1993, Pinck *et al.*, 1991). Die jeweilige RNA besitzt einen großen „open reading frame“ (ORF), der auf jeder Seite von „non coding regions“ (NCR) flankiert wird. Bei der Translation viraler RNA entsteht ein Polyprotein, das mittels viraler Protease in funktionelle Proteine gespalten wird (Hull, 2002, Margis *et al.*, 1994). Von RNA 1 werden die „RNA dependent RNA polymerase“ (RdRp), virale Protease, das VPg und das „nucleotide

binding protein“ mit Helikasefunktion transkribiert. N-terminal erfolgt die Abspaltung eines weiteren Proteins, das vermutlich als Co-Faktor der Protease fungiert (Mayo & Robinson, 1996). Die RNA 2 codiert für das „movement protein“ (MP), das „coat protein“ (CP) und das Protein 2A, das eine Rolle bei der Replikation spielt (Gaire *et al.*, 1999, Mayo & Robinson, 1996). Virale Enzyme liegen in den Viruspartikeln nicht vor, sondern werden erst in der Wirtspflanze synthetisiert. Bei der Replikation viraler RNA über einen negativen Komplementärstrang, der als Matrize dient, tritt dadurch transient doppelsträngige (ds)RNA auf (Hull, 2002).

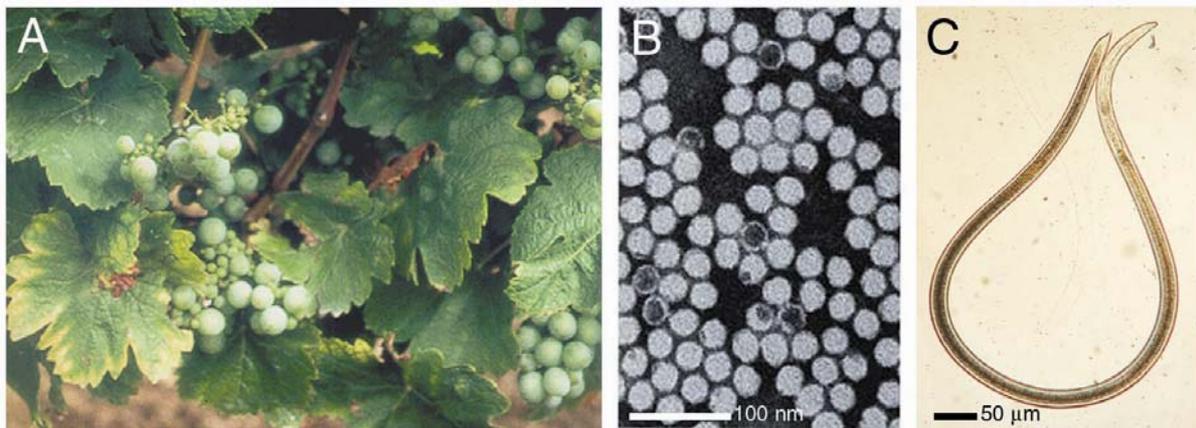


Abb. 1: Schadbild, Erreger und Virusvektor der Reisigkrankheit. Virusinfizierte Rebe mit Blattpanaschüre und Verrieselung der Trauben (A), elektronenmikroskopische Aufnahme isolierter Nepoviren nach Murphy *et al.* (1995) (B), *Xiphinema index*, der Überträger von GFLV (C).

Nepoviren werden durch bodenlebende, phytoparasitische Nematoden aus der Familie Longidoridae sehr spezifisch auf Reben übertragen. Außerdem können zumindest einige Nematodenarten an den parasitierten Bereichen die Ausbildung von Wurzelgallen induzieren (Brown *et al.*, 1995, Wyss, 1988). Beim Saugvorgang an Wurzeln infizierter Reben werden Viruspartikel von den Nematoden aufgenommen. Das virale Hüllprotein („coat protein“, CP) interagiert mit Bindungsstellen an der Innenwandung des Odontophors und des Ösophagus des Vektornematoden (Andret-Link *et al.*, 2004b, Belin *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2002). Bei erneuter Nahrungsaufnahme an Wurzelzellen einer anderen Pflanze erfolgt vor jedem Saugvorgang des Nematoden eine Injektion von Sekreten aus den Speicheldrüsen zur extraintestinalen Vorverdauung des Zellinhalts (Wyss *et al.*, 1988). Bei dieser Sekretion ändert sich der pH-Wert im Odontophor. Dadurch werden Viruspartikel von den

Bindungsstellen gelöst, in die Wurzelzellen gespült und die Pflanze infiziert (Brown *et al.*, 1995).

Interaktionen zwischen Viren und Nematoden sind meist artspezifisch, so daß jedes Virus in der Regel nur von einer Nematodenart effektiv übertragen wird. Für die Verbreitung von ArMV ist *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzky, 1927) verantwortlich, Raspberry ringspot virus (RpRSV) wird durch *Longidorus macrosoma* Hooper, 1961 übertragen (Brown *et al.*, 1995, Brown & Trudgill, 1983). Grapevine fanleaf virus (GFLV) ist das wirtschaftlich bedeutsamste Virus im Komplex der Reisigkrankheit und wird von *Xiphinema index* Thorne & Allen, 1950 verbreitet (Abb. 1, C) (Andret-Link *et al.*, 2004b). Nur durch Häutung der Larvenstadien verlieren virustragende *X. index* gebundene Viren. Adulte Nematoden häuten sich nicht mehr und können nach Aufnahme von Viren auch ohne weitere Nahrung mehrere Jahre überleben und infektiös bleiben (Demangeat *et al.*, 2005). Brachlegung von Rebanlagen über längere Zeit garantiert somit keine vollständige Auslöschung der vorhandenen Nematodenpopulation, und die Gefahr einer Reinfektion der Neuanlage bleibt bestehen (Raski *et al.*, 1983, Valat *et al.*, 2003a). Eine langjährige und großflächige Brachlegung kann außerdem erhebliche ökonomische Probleme für Winzer mit sich bringen. Die bei der Rodung im Boden zurückgebliebenen Wurzelreste können zudem weiterhin als Nahrungsquelle für *X. index* dienen und müssen eliminiert werden, da sie einen Infektionsherd für die Virusübertragung auf Neuanlagen darstellen (Demangeat *et al.*, 2005). Eine direkte Bekämpfung der virusübertragenden Nematoden ist schwierig und ineffizient. Maßnahmen zur Bodenentseuchung mit Methylbromid oder Dichlorpropen betreffen die gesamte Fauna im Interstitial und sind aus ökologischer Sicht bedenklich. Außerdem ist die Bodenentseuchung mit diesen Nematiziden in vielen Ländern, so auch in Deutschland, verboten (Andret-Link *et al.*, 2004a, Raski *et al.*, 1983, Spielmann *et al.*, 2000a).

1.2 Resistenz gegen phytoparasitische Nematoden

Da *Vitis vinifera* eine Wirtspflanze von *Xiphinema index* ist, wurden *Muscadinia*- und andere *Vitis*-Arten auf Resistenz gegen Nematoden getestet, mit dem Ziel, nematodenresistente Unterlagen zu züchten (Bouquet, 1981, Bouquet *et al.*, 2000, Walker & Wolpert, 1994). Durch Kreuzungen von *V. vinifera* mit *Muscadinia*-Arten konnte eine erhöhte Resistenz gegen *X. index* erreicht werden. Bei Inokulationsversuchen mit Nematoden wurden im

Versuchszeitraum nahezu keine Virusinfektionen an den Testpflanzen festgestellt (Bouquet, 1981). Die erhöhte Resistenz gegen Nematodenbefall verringert zwar die Wahrscheinlichkeit der Übertragung von GFLV, die Übertragung von Virus kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Effizienz der Nematodenresistenz muss unter Freilandbedingungen weiter analysiert und bewertet werden (Andret-Link *et al.*, 2004a).

1.3 Strategien für Virusresistenz in Reben

Natürliche Resistenzen gegen die Reiskrankheit, die für züchterische Aspekte eingesetzt werden könnten, sind aus *Vitis*-Arten nicht bekannt. Aus diesem Grund wurden gentechnische Züchtungsmethoden angewandt, um virusabgeleitete Sequenzen zur Induktion von Virusresistenz in Reben zu transformieren. Unterschiedliche Ansätze zur Induktion von transgen-vermittelter Virusresistenz in *Nicotiana benthamiana* wurden bereits verfolgt, wie die Expression von rekombinanten scFv („short chain variable fragment“) Antikörpern, sogenannten „plantibodies“. Hier werden nur die über ein Peptid verbundenen leichten Ketten des Antikörpers exprimiert (De Jaeger *et al.*, 2000, Franconi *et al.*, 1999). Als Antigen für rekombinante Antikörper wurden die „RNA dependent RNA polymerase“ (RdRp) oder das CP des entsprechenden Virus gewählt (Boonrod *et al.*, 2004, Nölke *et al.*, 2004). Auch durch die Expression von virusabgeleitetem CP zur Induktion von „coat protein mediated resistance“ (CPMR) konnte bereits eine signifikant höhere Resistenz gegen ArMV bei Tabak erzielt werden (Spielmann *et al.*, 2000b). Bertioli *et al.* (1991) zeigte zudem die Bildung von leeren, virus-ähnlichen Partikeln aus virusabgeleitetem CP in transgenen Zellen. Es wird vermutet, dass dadurch die Freisetzung von RNA aus inokulierten Viruspartikeln gestört wird und die Pflanze eine erhöhte Resistenz erfährt (Baulcombe, 1996, Reimann-Philipp, 1998). Die Resistenz durch Expression von viralem CP ist jedoch nicht absolut. Spielmann *et al.* (2000b) beschreibt, dass sich bei einigen transgenen Pflanzen die Virusinfektion verzögert durchsetzte. Die Strategie von CPMR wurde auch bei Reben schon mehrfach angewendet (Gambino *et al.*, 2005, Krastanova *et al.*, 1995, Maghuly *et al.*, 2006, Mauro *et al.*, 1995, Spielmann *et al.*, 2000a, Vigne *et al.*, 2004). Eine erhöhte Virusresistenz wurde nach dreijährigen Feldversuchen mit transgenen, GFLV-CP-exprimierenden Reben festgestellt (Vigne *et al.*, 2004).

Bei der Expression von CP (aus Tobacco etch virus) in transgenen *N. benthamiana* war jedoch nicht generell eine Akkumulation des Proteins zu beobachten, dennoch lag eine virusspezifische Resistenz vor. In einigen Fällen konnte weder das Protein, noch eine erhöhte Akkumulation von mRNA der transgenen Virussequenz festgestellt werden, obwohl die Transkription des Transgens nachgewiesen wurde (Lindbo *et al.*, 1993). Diese Beobachtungen führten zur verstärkten Untersuchung von Virusresistenz durch „gene silencing“. Bei „RNA mediated silencing“, dem natürlichen Abwehrsystem gegen virale Infektionen, wird die Translation durch sequenzspezifische Spaltung der invasiven RNA verhindert. Die Entdeckung von „RNA mediated silencing“ und die intensive Forschung der letzten Jahre in diesem Bereich lieferte viele Erkenntnisse zur Nutzung dieses universellen Systems, u. a. auch zur Induktion von Virusresistenz mittels transgener Pflanzen (Baulcombe, 1999, Baulcombe, 2004, Hamilton & Baulcombe, 1999, Tenllado *et al.*, 2004, Voinnet, 2005a, Waterhouse *et al.*, 1998, Waterhouse *et al.*, 2001b). Eine auf PTGS basierende Virusresistenz wird auch bei Reben untersucht (Fuchs, 2003, Reustle *et al.*, 2005).

1.4 Regulation der Expression durch „gene silencing“ als universelles Kontrollsystem

„Gene silencing“ auf Ebene von RNA wurde als „RNA mediated silencing“ oder bei Pflanzen als „post transcriptional gene silencing“ (PTGS) beschrieben und als natürlicher Abwehrmechanismus bei Virusinfektionen erkannt oder aber bei der unerwartet nicht erfolgten Expression von Transgenen beobachtet (Lindbo *et al.*, 1993, Napoli *et al.*, 1990, Vaucheret *et al.*, 1998). Ein Meilenstein war die Entdeckung von „antisense small interfering“ (si)RNA, die bei PTGS nachgewiesen wurde (Hamilton & Baulcombe, 1999). Diese siRNA ist für sequenzspezifisches „silencing“ verantwortlich und entsteht bei der Spaltung von dsRNA durch „Dicer“ (Xie *et al.*, 2004). Nach intensiver Forschung wurde siRNA in zwei Größenklassen unterteilt und mit unterschiedlichen Aufgaben beim PTGS assoziiert (Hamilton *et al.*, 2002, Mlotshwa *et al.*, 2002, Yoo *et al.*, 2004). Die Klasse mit einer Länge von ~21nt wurde mit lokalem „silencing“ in Verbindung gebracht, während größere siRNA mit ~24nt Länge vermutlich als Signal für die systemische Verbreitung von PTGS fungiert (Hamilton *et al.*, 2002, Voinnet, 2005b, Himber, 2003 #281, Voinnet *et al.*, 1998, Yoo *et al.*, 2004).

Darüber hinaus kann 24nt-siRNA durch Induktion von DNA-Methylierung zu „transcriptional gene silencing“ (TGS) führen (Jones *et al.*, 1999, Wassenegger & Pelissier, 1998). Hierbei erkennt siRNA die komplementäre Sequenz der DNA und ermöglicht die Methylierung von Cytosinresten durch eine Methyltransferase. Dies verhindert die Transkription und führt zur Inaktivierung des entsprechenden Gens (Chan *et al.*, 2004, Mette *et al.*, 2000, Pelissier *et al.*, 1999, Waterhouse *et al.*, 2001a).

Außerdem wurde „micro“ (mi)RNA endogenen Ursprungs entdeckt, die bei der Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle spielt (Bartel, 2004, Llave *et al.*, 2002, Wienholds & Plasterk, 2005, Zhang *et al.*, 2006). Durch miRNA wird z. B. die Ontogenese oder die Genexpression bei abiotischem Stress gesteuert (Sunkar & Zhu, 2004, Xie *et al.*, 2004). Pfeffer *et al.* (2004) beschreiben zudem virale miRNA, die mit komplementärer Sequenz auf ein Wirtsgen zielt.

Der komplexe Mechanismus von PTGS ist nicht nur bei Pflanzen zu finden, sondern universell verbreitet und bei Tieren als „RNA interference“ (RNAi) bzw. bei Pilzen als „quelling“ bekannt (Baulcombe, 2004, Kavi *et al.*, 2005, Nakayashiki, 2005).

1.5 Virusinfektion und PTGS

Historische Beobachtungen beschreiben Virussymptome von Tobacco ringspot virus an basalen Blättern von Tabakpflanzen durch Initialinfektion. Beim weiteren Wachstum der Pflanze waren neu entwickelte, apikale Blätter symptomfrei und zeigten sich immun gegen erneute Inokulation mit dem entsprechenden Virus (Baulcombe, 2004, Wingard, 1928). Lange Zeit gab es für diese unerwartete Genesung, auch als „recovery“ bezeichnet, keinen Erklärungsansatz bis zur Entdeckung von „post transcriptional gene silencing“ (PTGS) vor einigen Jahren.

Für die Induktion von PTGS sind bestimmte Charakteristika der RNA verantwortlich. Als Auslöser spielt RNA mit stabiler Doppelstrang-Struktur eine entscheidende Rolle. Viren mit RNA-Genom durchlaufen zumindest vorübergehend während der Replikation eine Phase, in der dsRNA zu finden ist (Tenllado *et al.*, 2004). Virale „single strand“ (ss)RNA wird bei einer Infektion durch hohe Transkriptionsraten angereichert und kann ebenfalls Sekundärstrukturen

mit Doppelstrang ausbilden (Molnar *et al.*, 2005). Durch Virusinfektion aktivierte „RNA directed RNA polymerase“ (RDR) bindet an viraler ssRNA und synthetisiert sekundär dsRNA bevorzugt vom 3'- zum 5'-Ende (Herr, 2005, Wassenegger & Krczal, 2006, Xie *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2004). Dies führt durch Anwesenheit von zusätzlicher dsRNA zu einem verstärkenden Effekt von PTGS, denn dsRNA bildet den Angriffspunkt der antiviralen Abwehr der Pflanze.

Verschiedene RNasen vom Typ III, als „Dicer-like“ (DCL) bezeichnet, spalten dsRNA in „small interfering“ (si)RNA mit einer Länge von 21-22nt und 2nt-Überhang des 3'-Endes (Hammond, 2005, Xie *et al.*, 2004). Diese kurze dsRNA wird in den „RNA induced silencing complex“ (RISC) integriert (Xie *et al.*, 2004). Die Aktivierung von RISC bei Pflanzen ist noch weitgehend unerforscht, jedoch liegen detaillierte Erkenntnisse aufgrund von Untersuchungen an *Drosophila* vor (Baumberger & Baulcombe, 2005, Hammond, 2005, Matranga *et al.*, 2005, Rand *et al.*, 2005, Tomari *et al.*, 2004). Diese werden hier stellvertretend erläutert.

Argonaute-2 (AGO2), die katalytische Untereinheit im RISC, bindet den durch „Dicer“ bereitgestellten siRNA-Doppelstrang (Rand *et al.*, 2005). Die Identifikation des RNA-Strangs, der als Matrize dienen soll („guide strand“), wird über thermodynamische Eigenschaften des 5'-Endes bestimmt. DCL-2 bindet am 5'-Ende des „guide strand“, während AGO2 den nicht benötigten Gegenstrang („passenger strand“) in Sequenzabschnitte von 9nt und 12nt Länge spaltet (Matranga *et al.*, 2005, Rand *et al.*, 2005, Tomari *et al.*, 2004).

Der „guide strand“ liegt nun als ssRNA im aktivierten RISC vor. Dieser führt die spezifische Spaltung von RNA mit komplementärer Sequenz durch, wobei AGO2 auch hier die RNase-Aktivität als „Slicer“ übernimmt (Hammond, 2005). Aktivierter RISC ist bei Anwesenheit von ATP ein „multiple turnover“-Enzymkomplex und kann, nach Ausstattung mit einem siRNA-„guide strand“ viele mRNA-Moleküle in Folge spalten (Haley & Zamore, 2004).

Bei Pflanzen (*Arabidopsis*) tritt u. a. AGO1 an die Stelle von AGO2 aus *Drosophila*, und es gibt Hinweise, dass auch hier die Beladung mit doppelsträngiger siRNA über DCL erfolgt (Baumberger & Baulcombe, 2005). Schematisch ist der Mechanismus von PTGS in Abb. 2 verdeutlicht.

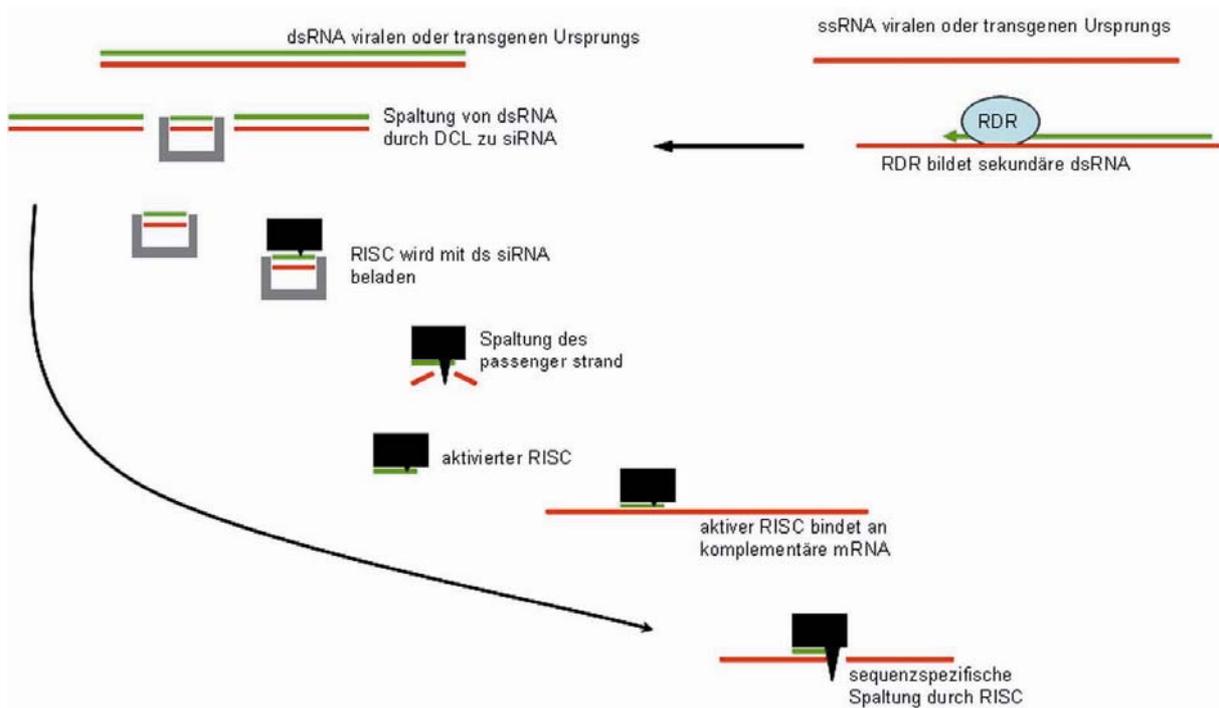


Abb. 2: PTGS für „silencing“ im Cytosol. dsRNA: Doppelstrang-RNA, DCL: „Dicer-like“, RISC: „RNA induced silencing complex“, RDR: „RNA directed RNA polymerase“.

Außer der beschriebenen Maschinerie für lokales PTGS im Cytosol, das sich nur begrenzt von Zelle zu Zelle ausbreiten kann, gibt es auch ein Signal zur systemischen Aktivierung von PTGS (Himber *et al.*, 2003, Kalantidis, 2004, Voinnet, 2001, Yoo *et al.*, 2004). Systemisches „silencing“ scheint im Falle von „recovery“ für die symptomfreien, apikalen Blätter einer Pflanze verantwortlich zu sein.

Das systemische Signal basiert bei transgenen Pflanzen im wesentlichen auf siRNA mit einer Länge von 24nt (Hamilton *et al.*, 2002, Hamilton & Baulcombe, 1999, Kalantidis, 2004, Metzloff, 2002, Voinnet, 2005b, Yoo *et al.*, 2004). Die Ausbreitung des Signals erfolgt vermutlich in Assoziation mit Protein durch das vaskuläre System der Pflanze und kann entlang der Gefäße auch in den Blättern verfolgt werden (Kalantidis, 2004, Mlotshwa *et al.*, 2002, Waterhouse *et al.*, 2001a, Yoo *et al.*, 2004). Die Bildung dieser siRNA setzt dsRNA im Nukleus voraus, die durch DCL3 zu 24nt-siRNA prozessiert wird (Dunoyer & Voinnet, 2005, Papp *et al.*, 2003, Wassenegger & Krczal, 2006).

Bei cytosolischer Virusreplikation in Wildtyp-Pflanzen ist diese Vorbedingung in der Regel nicht gegeben und der Mechanismus zur Entstehung des systemischen Signals noch ungeklärt.

Dennoch gibt es verschiedene Hinweise auf ein virusspezifisches systemisches Signal: einerseits das bereits erwähnte Phänomen von „recovery“ und außerdem die Expression viraler Suppressoren (Guo & Ding, 2002, Roth *et al.*, 2004). Um PTGS als Abwehrmechanismus zu umgehen, haben viele Viren Suppressoren entwickelt und blockieren oder behindern auf verschiedene Weise PTGS. Dies führt zur erheblichen Verminderung der spezifischen Spaltung von RNA endogener und viraler Herkunft (Qu & Morris, 2005, Roth *et al.*, 2004).

Es wurden verschiedene virale Suppressoren beschrieben, die systemisches, lokales oder sogar beide Arten von PTGS inhibieren. Der virale Suppressor p19 bindet spezifisch ds-siRNA mit einer Länge von 21-25nt und unterbricht so lokales und systemisches PTGS (Lakatos *et al.*, 2004, Qiu *et al.*, 2002, Silhavy *et al.*, 2002, Zamore, 2004). Der virale Suppressor 2b inhibiert systemisches PTGS, vermutlich durch Interaktion mit 24nt-siRNA (Lu *et al.*, 2004, Roth *et al.*, 2004). HC-Pro ist ein Suppressor von lokalem PTGS und inhibiert vermutlich die Funktion von RISC (Kasschau *et al.*, 2003, Lakatos *et al.*, 2004, Mallory *et al.*, 2003, Mallory *et al.*, 2002, Roth *et al.*, 2004).

Die Inhibition von PTGS durch virale Suppressoren wird auch für einige Krankheitssymptome der Pflanze verantwortlich gemacht, da die endogene Regulation der Genexpression über miRNA gestört werden kann (Chen *et al.*, 2004).

1.6 Virusinfektion in Kombination mit „defective interfering“-RNA

In Viruspartikeln ist oftmals neben genomischer RNA zusätzlich subvirale RNA enthalten, die Einfluss auf die Infektiosität des Virus nehmen kann. Hierbei wird Satelliten (sat)RNA, „defective“- (D-) und „defective interfering“- (DI-) RNA unterschieden. Während D- und DI-RNA Sequenzen aus dem Virusgenom aufweisen, zeigt satRNA zum zugehörigen Virus kaum oder gar keine Sequenzhomologie. Eine Gemeinsamkeit der nicht-kodierenden subviralen RNA ist die Abhängigkeit vom Virus bei ihrer Replikation (Simon *et al.*, 2004, White & J., 1999).

Da insbesondere DI-RNA Einfluss auf die Virusinfektion und die Symptomatik nimmt, soll nur diese hier näher beschrieben werden. DI-RNA weist eine hohe Ähnlichkeit zum Genom

des zugehörigen Virus auf, jedoch ist DI-RNA durch massive Verluste von kodierenden Sequenzen bis auf etwa 10-25% des Virusgenoms verkürzt. Auch repetitive Elemente, Substitutionen und Insertionen wurden beschrieben (Simon *et al.*, 2004, White & J., 1999, White & Morris, 1994).

Die Replikation der DI-RNA verläuft wie bei Viren mit positivem RNA-Genom über einen negativen RNA-Strang, der als Matrize für die Synthese der positiven RNA dient. Die Replikation von DI-RNA ist oft um ein Vielfaches effizienter als die des viralen Genoms. Hierfür werden Sekundärstrukturen, insbesondere der Region III, verantwortlich gemacht (Ray & White, 2003). Die Ausbildung von Sequenzabschnitten mit stabiler Sekundärstruktur durch Basenpaarungen ergaben einen Vorteil für die Replikationseffizienz und stellen einen entscheidenden Faktor für die Evolution von DI-RNA dar (White & Morris, 1994).

Das Verhältnis zwischen DI-RNA und dem Virus ist jedoch nicht einseitig parasitisch, sondern es wurden auch komplexe gegenseitige Beziehungen nachgewiesen (Simon *et al.*, 2004). Ist DI-RNA bei einer TBSV-Infektion beteiligt, äußert sich das in der Regel durch mildere Symptome und eine verringerte Akkumulation viraler RNA (Scholthof *et al.*, 1995, Simon *et al.*, 2004, White & J., 1999). Dagegen konnten aber auch symptomverstärkende Effekte bei Anwesenheit von DI-RNA in Infektionen mit Turnip crinkle virus nachgewiesen werden (Li *et al.*, 1989).

Bei der Replikation konkurriert DI-RNA mit dem Virus um den RNA-Syntheseapparat (Simon *et al.*, 2004, White & J., 1999). Erhöhte Virusresistenz der Wirtspflanze ist allerdings nicht allein auf das Konkurrenzverhalten zwischen DI-RNA und Virus zurückzuführen. Durch die selektive Unterdrückung der Expression viraler, symptomdeterminierender Proteine, wie des „silencing“-Suppressors p19 oder des „movement protein“ (MP) von TBSV, könnte DI-RNA direkt Einfluss auf die Symptomausprägung in der Wirtspflanze nehmen (Simon *et al.*, 2004). Bei Infektion mit Cymbidium ringspot virus mit Defekt am Suppressor p19 konnte Symptommilderung bis hin zu „recovery“ festgestellt werden. Dies wurde ebenfalls bei Anwesenheit von DI-RNA bei einer Infektion mit nicht-mutiertem Virus beobachtet (Silhavy *et al.*, 2002).

DI-RNA ist ein Induktor von PTGS, wird aber selbst kaum als Ziel von PTGS erkannt (Silhavy *et al.*, 2002). Betroffen von der sequenzspezifischen RNA-Spaltung sind dagegen

homologe Sequenzen des Virusgenoms. Bei Anwesenheit von DI-RNA wird verstärkt virale siRNA generiert und die Effizienz des Suppressors p19 durch Absättigung der Bindungskapazitäten herabgesetzt (Silhavy *et al.*, 2002). Von p19 nicht gebundene siRNA steht der Pflanze für die Virusabwehr durch PTGS zur Verfügung.

1.7 Induktion von Virusresistenz durch transgenvermitteltes PTGS

Induktion von PTGS durch ein Transgen ist vom Mechanismus weitestgehend vergleichbar mit PTGS durch virale Infektion, jedoch sind auch Unterschiede zu finden. Da die dsRNA oder „hairpin“ (hp)RNA des Transgens nach der Transkription als mRNA außer im Cytosol auch im Nukleus vorliegt, kommen hier zusätzliche Enzyme zum Einsatz. Die Spaltung durch DCL im Cytosol ergibt siRNA von 21nt Länge, während im Nucleus durch einen anderen DCL siRNA mit einer Länge von 24nt generiert wird (Mlotshwa *et al.*, 2002, Papp *et al.*, 2003, Wassenegger & Krczal, 2006). Diese 24nt-siRNA ermöglicht als mobiles Signal das oben angesprochene systemische PTGS gegen das Transgen bzw. das Zielvirus (Hamilton *et al.*, 2002, Mlotshwa *et al.*, 2002).

Die Aktivierung von PTGS durch dsRNA wurde erfolgreich zur Etablierung von Virusresistenz bei transgenen Pflanzen genutzt. Als besonders effizient stellten sich „inverted repeat“ (IR)-Konstrukte heraus, die virusabgeleitete Sequenzen in „sense“- und „antisense“-Orientierung enthielten und nach der Transkription dsRNA bildeten (Kalantidis *et al.*, 2002, Waterhouse *et al.*, 1998). Auch DI-RNA wurde in virusresistenz-induzierenden Konstrukten eingesetzt und dadurch breite Resistenz gegen mehrere Viren erzielt (Rubio *et al.*, 1999).

Im Rahmen eines Forschungsprojektes unserer Arbeitsgruppe wurden beide Strategien angewendet, um Resistenz gegen die Nepoviren GFLV, ArMV und RpRSV zu induzieren (Jardak-Jamoussi *et al.*, 2003, Reustle *et al.*, 2005). Die gesamte oder aber Abschnitte der DI-Sequenz von TBSV wurde mit einer konservierten Sequenz aus GFLV in „sense“-Konstrukten kombiniert. Als Sequenz des Zielvirus diente hierfür ein Abschnitt aus dem „movement protein“ (MP) der RNA2 (Wetzel *et al.*, 2001).

Für IR-Konstrukte wurden ebenfalls konservierte virale Sequenzen gewählt und, getrennt durch einen „spacer“, gegenläufig im Konstrukt angeordnet. Zum Einsatz kam auch hier die

Sequenz aus dem MP von GFLV, desweiteren die ebenfalls stark konservierte MP-Sequenz von ArMV (Wetzel *et al.*, 2001). Bei RpRSV lag der konservierte Sequenzbereich auf RNA 2 in der „non coding region“ (NCR) des 3'-Endes (Ebel *et al.*, 2003), so dass dieser Abschnitt im IR-Konstrukt eingesetzt wurde. Zur Induktion von Resistenz gegen mehrere Viren zugleich wurden in einem IR-Konstrukt die Sequenzen der verschiedenen Viren kombiniert (Jardak-Jamoussi *et al.*, 2003). Diese Konstrukte wurden mittels Agrobakterien in Reben und *Nicotiana benthamiana* transformiert.

1.8 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von „screening“-Systemen zur Identifikation von Virusresistenz in den oben beschriebenen, mit unterschiedlichen Konstrukten transformierten *N. benthamiana* bzw. Reben. Die Funktion der Konstrukte war zuerst am Modell *N. benthamiana* zu überprüfen, da eine sichere Bewertung ausschließlich an transgenen Reben schwierig ist. Virusresistenz wurde auch über eine molekularbiologische Charakterisierung der transgenen Pflanzen analysiert. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Induktion von PTGS durch das Transgen und die Generierung von siRNA gerichtet. Mit einem Sensorkonstrukt wurde PTGS in transgenen *N. benthamiana* über Fluoreszenz von „green fluorescent protein“ (GFP) *in vivo* untersucht. Zur Bewertung der Virusresistenz wurden zusätzlich Virusinokulationen durchgeführt und das Resistenzverhalten der Pflanzen ermittelt. Im Gegensatz zu *N. benthamiana* ist die Virusinokulation von Reben mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Es existiert kein einfaches, aussagekräftiges „screening“-System zur Bewertung von Virusresistenz in Reben. Aus diesem Grund wurde eine *in vitro* Dualkultur entwickelt, die den natürlichen Infektionsweg durch Nematoden nutzt. Mit dieser Methode sollte eine frühzeitige Bewertung der Virusresistenz der transgenen Reben ermöglicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Bezugsquellen

Tab. 1: Verwendete Kits und deren Einsatzbereich

Kit	Hersteller	Verwendung
Fluorescent DNA Quantitation Kit	Biorad	DNA-Quantifizierung
Purescript® RNA Isolation Kit	Gentra	RNA-Extraktion aus Reben
Invisorb® Spin Plant Mini Kit	Invitek	DNA-Extraktion aus Reben
SuperScript™ One-Step RT-PCR Kit	Invitrogen	RT-PCR
Nucleo Extraction Kit	Macherey-Nagel	Gelextraktion
Prime-a Gene® Labeling System	Promega	DNA-Sonde (Radioaktivmarkierung)
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega	Plasmid-DNA-Extraktion aus Agrobakterien
QIAprep® Spin Miniprepkit (250)	Quiagen	Plasmid-DNA-Extraktion aus <i>E. coli</i>
DIG Luminescent Detection Kit	Roche	Southern Blot
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche	DNA-Sonde (DIG-Markierung)

Substanzen und Chemikalien für Pufferlösungen wurden, falls nicht anderweitig angegeben, von Roth (Karlsruhe) geliefert. Medien für die Gewebekultur und Antibiotika wurden über Duchefa (Haarlem, Niederlande) bezogen. Primer (siehe Tab. 14 im Anhang) und der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 α für Klonierungen wurden von Invitrogen (Karlsruhe) geliefert. Der verwendete *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm ATHV basiert auf Hood *et al.* (1986), der Stamm LBA4404 auf Ooms *et al.* (1982). Soweit nicht gesondert aufgeführt,

wurden Enzyme von New England Biolabs (Frankfurt) oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot) geliefert. Kits verschiedener Hersteller sind der Tab. 1 zu entnehmen. Zur statistischen Datenauswertung diente Sigma Plot 9.0, die Bildbearbeitung erfolgte gegebenenfalls mit Adobe Photoshop 5.0. Zur Analyse von molekularen Sekundärstrukturen diente mFOLD (Zuker, 2003, <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>).

2.2 Gewebekultur und Transformation von Pflanzen

2.2.1 Transgene *Nicotiana benthamiana*

Aus sterilen Samen wurden auf MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962) unter *in vitro* Standardbedingungen (24°C, Tageslänge = 16/8 h, 60µmol m⁻² s⁻¹) Pflanzen angezogen und Blattscheiben mittels Agrobakterien (ATHV) transformiert (Horsch *et al.*, 1985, modifiziert). Die Anzucht von Agrobakterien mit dem entsprechenden zu transformierenden Konstrukt erfolgte auf Luria-Bertani (LB)-Medium in einer Petrischale, dann als Kultur in LB-Flüssigmedium bei 28°C über Nacht jeweils unter Selektion (Spc 300 mg/L, Str 300 mg/L, Rif 15 mg/L). Nach dem Pelletieren bei 5000xg für 10 min wurden die Bakterien in MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962) resuspendiert. Zu den Blattscheiben im MS-Flüssigmedium (BAP 1 mg/L, NAA 0,1 mg/L, AS 100 mM) wurde ½ vol Agrobakteriensuspension gegeben und 5 min inkubiert. Zur Co-Kultur wurden die Blattscheiben auf Filterpapier abgestreift und auf MS-Medium (BAP 1 mg/L, NAA 0,1 mg/L, AS 100 mM) bei 22°C für 48 h lichtgeschützt inkubiert. Nach der Co-Kultur wurden 2 Waschschrte in MS-Flüssigmedium (BAP 1 mg/L, NAA 0,1 mg/L, Carb 500 mg/L) durchgeführt, gefolgt von der Inkubation auf MS-Selektionsmedium (BAP 1 mg/L, NAA 0,1 mg/L, Carb 500 mg/L, PPT 50 mg/L) für 3-4 Wochen unter *in vitro* Standardbedingungen. Auswachsende Sprosse an den Kanten der Blattscheiben wurden auf MS-Transfermedium unter Selektionsbedingungen (Carb 500 mg/L, PPT 50 mg/L) weiterkultiviert und über Stecklinge vermehrt. Diese potentiell transgenen *N. benthamiana* standen aufgrund von Vorleistungen des Labors für weitere Untersuchungen bereits zur Verfügung.

2.2.2 Transgene Reben

Embryogener Kallus aus Antherenkultur verschiedener Unterlagen (SO4, Kober 5BB, Richter110, Kober 125AA, 5C, Binova) und Edelreife (Ariche dressé, Seyval, Tempranillo, Cabernet Sauvignon, Seyval blanc) wurden durch Agrobakterien (LBA4404) transformiert. Nach der Co- und Vorkultur erfolgte eine Selektion mit Phosphinotricin (PPT, 2,5-7,5 mg/L) bis zur Entwicklung der Embryonen zum Torpedostadium nach etwa 3 Monaten unter Dunkelheit (Reustle *et al.*, 2003). Nach der Keimung wurden die Reben als Stecklinge unter *in vitro*-Standardbedingungen auf LS-Medium (Linsmaier & Skoog, 1965) vermehrt. Durch Vorleistungen des Labors waren diese potentiell transgenen Reben verfügbar.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Klonierung der virusresistenz-induzierenden Konstrukte

Als Plasmid für Konstrukte zur Transformation von Pflanzen diente der binäre Vektor pPZP200 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) mit Phosphinotricin-Acetyltransferasegen (*bar*) unter der Kontrolle des *nos*-Promotors zur Selektion auf Phosphinotricin (PPT)-Resistenz.

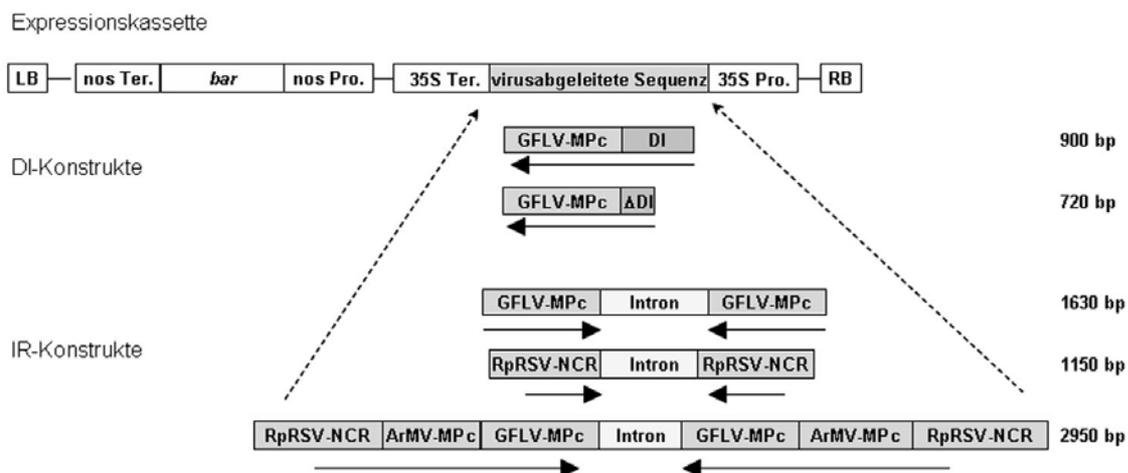


Abb. 3: Virusresistenz-induzierende Konstrukte zur Transformation von Pflanzen. Virusabgeleitete Sequenzen wurden unter der Kontrolle eines 35S-Promotors in die Expressionskassette kloniert. DI-Konstrukte enthalten virusabgeleitete Zielsequenzen kombiniert mit einer „defective interfering“ (DI)-Sequenz. „Inverted repeat“ (IR)-Konstrukte bestehen aus virusabgeleiteten Sequenzen in „sense“- und „antisense“-Orientierung.

Resistenz-induzierende Konstrukte mit konservierten viralen Sequenzen wurden in dieses Plasmid kloniert und anschließend *Escherichia coli* (DH5 α) durch Hitzeschock für 45 s bei 42°C transformiert. Nach Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte die Transformation in *Agrobacterium tumefaciens* (ATHV, LBA4404) durch Elektroporation. Die virusresistenz-induzierenden Konstrukte sind in Abb. 3 gezeigt, die entsprechenden Plasmidkarten sind der Abb. 32 im Anhang zu entnehmen (Reustle *et al.*, 2005).

2.3.2 Klonierung des GFP-Sensorkonstrukts

Zur Klonierung der Konstrukte für das GFP-Expressionsmodell wurden 2 μ g Plasmid (pCATgfp) mit BamHI linearisiert (5 U, 37°C, 2 h). Zur Dephosphorylierung wurde das Plasmid mit 2 μ L Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP) von Roche bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde bei 75°C gestoppt und die DNA mit Phenol:Chloroform (1:1) und Chloroform aufgereinigt. Nach der Fällung mit 2,7 vol EtOH 100% und 0,1 vol NaAc (3M, pH 5,2) wurde die DNA mit EtOH 70% gewaschen, anschließend getrocknet und in H₂O aufgenommen.

Die einzuklonierende virale Sequenz wurde mittels PCR aus cDNA amplifiziert. Um die zu klonierende Virussequenz mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen zu versehen, wurden Primer mit ergänzter Sequenz der BamHI-Schnittstelle am 5'-Ende gewählt. Die Restriktion des PCR-Produkts mit BamHI erfolgte entsprechend wie beim Plasmid. Das PCR-Produkt wurde danach mit 1 vol Chloroform aufgereinigt, durch 2,7 vol EtOH 100% gefällt, gewaschen und in H₂O aufgenommen. Das Fragment wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Zur Ligation (T4-Ligase) bei RT über Nacht wurden 300 μ g Fragment und 100 μ g linearisiertes Plasmid eingesetzt.

Der Vektor wurde in *E. coli* DH5 α durch Hitzeschock für 45s bei 42°C transformiert und unter Selektion (Amp 50mg/L) ausplattiert. Kolonien der ausplattierten Bakterien wurden in SOC-Medium bei 37°C über Nacht kultiviert und der Vektor mit der QD-Extraktion isoliert (siehe Punkt 2.3.3.3). Nach einer Kontrollrestriktion erfolgte die Retransformation und Kultivierung der positiven Klone in *E. coli* DH5 α . Im Anschluss an die Plasmidextraktion mit QIAprep® Spin Miniprepkit (250) (Quiagen) wurde der Vektor zur Kontrolle mit einem geeigneten Restriktionsenzym inkubiert und gelelektrophoretisch überprüft.

Die Kasette mit GFP am 3'-Ende der Virusequenz unter der Kontrolle eines doppelten 35S-Promotors wurde mit Hind III (5 U, 37°C, 2 h) aus dem Vektor ausgeschnitten. Die Kasette wurde über Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem Nucleo Extraction Kit (Macherey-Nagel) isoliert.

Zur Klonierung in den binären Vektor pGJ357 wurde dieser mit Hind III (5 U, 37°C, 2 h) linearisiert. Anschließend erfolgte die Dephosphorylierung des Vektors durch SAP, eine Aufreinigung wie oben beschrieben und die Ligation mit dem isolierten Fragment. Durch Transformation und Kultivierung in *E. coli* DH5 α wurde der Vektor vermehrt und danach mit der QD-Extraktion isoliert. Zur Überprüfung wurde eine geeignete Restriktion durchgeführt und diese über Gelelektrophorese kontrolliert. Positive Klone wurden mittels einer Retransformation in *E. coli* DH5 α weiterkultiviert.

Nach der Plasmidextraktion mit QIAprep® Spin Miniprepkit (250) (Quiagen) und einer weiteren Kontrollrestriktion wurden elektrokompente Agrobakterien (ATHV) mit dem Vektor durch Elektroporation (2,5 kV, 25 μ F, 200-400 Ω) transformiert und auf LB-Medium unter Selektion (Str 200 mg/L, Spc 200 mg/L, Rif 15 mg/L) bei 28°C kultiviert. Zur Plasmidüberprüfung erfolgte eine Extraktion mit dem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) sowie eine geeignete Restriktion.

Alle Plasmidaufreinigungen und Restriktionen wurden durch Gelelektrophorese (1% Agarose, 1‰ EtBr) überprüft. Die Restriktionsenzyme zur Kontrolle der Plasmide sind in Tab. 2 aufgelistet. Der Vektor pGJp19His zur Infiltration mit dem viralen Suppressor p19 wurde von Naumer (2005) zur Verfügung gestellt. Die Plasmidkarten der Konstrukte sind zur Übersicht in Abb. 33 im Anhang zusammengestellt.

SOC-Medium (100 ml)	0,5% Hefeextrakt
	2% Trypton
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgSO ₄
	10 mM MgCl ₂
	20 mM Glucose

und das erhaltene Pellet in 500 μ L Highsalt-TE-Puffer bei 65°C gelöst. Die Fällung erfolgte mit 1 vol eiskaltem Isopropanol bei -20°C für 30 min. Die DNA wurde durch Zentrifugation mit 18000xg für 10 min bei 4°C pelletiert. Mit 500 μ L eiskaltem Ethanol (80%) wurde das Pellet gewaschen, dann 5 min bei RT getrocknet und in 100-200 μ L TE'-Puffer bei 65°C gelöst.

Extraktionspuffer (pH 8,0)	55 mM CTAB
	200 mM Tris
	40 mM EDTA
	1,4 M NaCl
CTAB-Puffer 10%	275 mM CTAB
	0,7 mM NaCl
Präzipitationspuffer (pH 8,0)	27 mM CTAB
	100 mM Tris
	20 mM EDTA
Highsalt-TE-Puffer (pH 8,0)	5 M NaCl
	10 mM Tris
	0,1 mM EDTA
TE'-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris
	0,1 mM EDTA

Zur schnellen Gewinnung genomischer DNA für PCR-Screenings wurde das Extraktionsprotokoll von Edwards *et al.* (1991) verwendet, das einen hohen Probendurchsatz ermöglicht, allerdings DNA-Extraktionen geringerer Qualität liefert.

2.3.3.2 DNA-Extraktion aus Reben

DNA für Untersuchungen mittels PCR wurde mit dem Invisorb® Spin Plant Mini Kit (Invitek, Berlin) gewonnen. Gefrorenes Blattmaterial von *in vitro*-Reben wurde mit einem

sterilen Pistill im 1,5 mL-Reaktionsgefäß zerkleinert und die Extraktion nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Für die Southern Analyse wurde DNA aus 2 g gefrorenem Blattmaterial gewonnen (Thomas *et al.*, 1993, modifiziert). Die Homogenisation erfolgte mit einer Zelmühle (MM200, Retsch) in vorgekühlten Mahlgefäßen für 2 min bei 24 Hz. Das Probenpulver wurde in ein 50 mL-Zentrifugengefäß überführt und mit 25 mL Puffer A (4°C) durch Vortexen vermischt. Nach der Zentrifugation mit 5000xg für 15 min bei 4°C wurde das Pellet in 5 mL Puffer B resuspendiert und im Wasserbad für 30 min bei 37°C inkubiert. Eine zweimalige Extraktion erfolgte mit je 5 mL Chloroform / Isoamylalkohol (24:1). Die DNA im Überstand wurde mit 0,5 vol Isopropanol für 20 min bei -20°C gefällt, durch eine weitere Zentrifugation pelletiert und in 600 µL TE-Puffer aufgenommen.

Zur RNase-Behandlung (30 µg) wurde die DNA-Lösung 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 vol Ammoniumacetat (7,5 M) wurde die Probe mehrmals invertiert und anschließend 1 min bei 18000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 0,54 vol Isopropanol für 10 min bei -20°C gefällt. Die DNA wurde mit 18000xg für 10 min bei 4°C pelletiert, mit 600 µL Ethanol 70% gewaschen und bei RT getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 200 µL TE-Puffer bei 65°C resuspendiert und bei 4°C gelagert. Die Konzentration der DNA wurde mit dem Fluorescent DNA Quantitation Kit (Biorad, USA) am Fluorometer (FLx800, Biotech Instruments) ermittelt.

Puffer A	250 mM NaCl
	200 mM Tris (pH 8,0)
	50 mM EDTA (pH 8,0)
	2,5% PVP
	0,1% β-Mercaptoethanol nach Autoklavierung
Puffer B	500 mM NaCl
	200 mM Tris (pH 8,0)
	50 mM EDTA (pH 8,0)
	2,5% PVP

	3% Sarkosyl
	20% Ethanol absolut
TE-Puffer	10 mM Tris
	1 mM EDTA

2.3.3.3 Plasmid-DNA-Extraktion aus Bakterien

Plasmid-DNA aus Agrobakterien-Stämmen wurde mit dem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, USA) gewonnen. Für Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli*-Stämmen diente der QIAprep® Spin Miniprepkit (250) (Quiagen, Hilden). Die Extraktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Ebenso wurde Plasmid mit der QD-Extraktion gewonnen. Hierzu wurden die Bakterien durch Zentrifugieren für 10 min bei 18000xg pelletiert und in 200 µL Puffer QD1 resuspendiert. Nach der Lyse folgte die Zugabe von 200 µL Puffer QD2 und 200 µL Kaliumacetat (3 M, pH 5,5), wobei die Probe jeweils mehrmals invertiert wurde. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 18000xg wurde die DNA im Überstand mit 0,7 vol Isopropanol gefällt und für 10 min bei 18000xg pelletiert. Nach einem Waschschrift mit Ethanol 70% wurde die DNA getrocknet und in H₂O aufgenommen. Die Konstrukte in der Plasmid-DNA wurden mit Hilfe von Restriktionsenzymen (Tab. 2) und Gelelektrophorese (1% Agarose, 1% EtBr) überprüft.

Puffer QD1 (pH 8,0)	50 mM Tris
	10 mM EDTA
	100µg/ml RNase A
Puffer QD2	200mM NaOH
	1% SDS

2.3.4 RNA-Extraktion

2.3.4.1 RNA-Extraktion aus *Nicotiana benthamiana*

Gesamt-RNA aus Blattmaterial wurde nach dem Protokoll von Dunoyer (IBMP, Strasbourg) nach Hamilton *et al.* (2002, modifiziert) extrahiert. Zur Extraktion wurden 0,2 g Blattmaterial

unter flüssigem Stickstoff in einem vorgekühlten Mörser fein zerrieben. Nach Zugabe von 2 mL Trizol[®] Reagent (Invitrogen) wurde die Probe im Mörser weiter homogenisiert und anschließend in 1,5 mL-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nach 5 min Inkubationszeit bei RT wurden die Reaktionsgefäße mit Chloroform (ca. 500 µL) aufgefüllt und ausgiebig durch Vortexen gemischt. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 18000xg für 15 min wurde der Überstand mit 1,5 vol Isopropanol für 30 min bei RT gefällt. Durch Zentrifugation mit 18000xg für 30 min bei 4°C wurde die RNA pelletiert, mit 350 µL 80%igem Ethanol gewaschen und 5 min bei RT getrocknet. Die Pellets der Probe wurden in jeweils 30 µL deionisiertem Formamid 50% gelöst und vereinigt. Durch Gelelektrophorese und zusätzlich über photometrische Messung bei $\lambda = 260$ nm wurde Quantität, als auch Qualität (260/280 nm) der RNA bestimmt. Hierzu wurde mit TBE-Puffer ein 1%iges Agarosegel, das 0,01% Ethidiumbromid enthielt, angesetzt. Als Probe wurden 0,5 µg RNA aufgetragen, bei 80V aufgetrennt und anschließend unter UV-Illumination ausgewertet.

TBE-Puffer (pH 7,7)	89 mM Tris
	89 mM Borsäure
	20 mM EDTA
RNA-Ladepuffer	50% Glycerol
	50 mM Tris
	5 mM EDTA
	0,03% BPB

2.3.4.2 RNA-Extraktion aus Reben

Zur RNA-Extraktion aus Reben diente der Purescript[®] RNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, USA). Als Ausgangsmaterial wurden gefrorene Blätter von *in vitro*-Reben verwendet und mit sterilem Pistill in einem Reaktionsgefäß mit Extraktionspuffer homogenisiert. Bei der Extraktion wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. RNA aus Rebenblättern wurde außerdem nach dem Protokoll von Renault *et al.* (2000, modifiziert) gewonnen. Blattmaterial (0,2 mg) wurde unter flüssigem Stickstoff in einem vorgekühlten Mörser fein zerrieben. Die Probe wurde in mit 2 mL Extraktionspuffer (RT) versehene Reaktionsgefäße überführt und gründlich durch Vortexen gemischt. Nach Zugabe von 0,8 vol

Chloroform wurde die Probe gut durchmischt und bei 18000xg für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde 4x mit gleichem Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) bei 18000xg für 20 min extrahiert. Hierbei war zu beachten, daß der Überstand immer gut mit der organischen Phase durchmischt wurde und beim Abnehmen des Überstandes nach der Zentrifugation die Interphase vollständig zurückblieb. Unerwünschte Polysaccharide wurden mit ½ vol eiskaltem Ethanol ausgefällt und bei 18000xg für 15 min bei 4°C pelletiert. Die im Überstand enthaltenen Nukleinsäuren wurden anschließend bei RT mit 1 vol Isopropanol und 0,016 vol NaAc (3 M, pH 5,2) für 30 min gefällt und bei 18000xg für 30 min bei 4°C pelletiert. Nach dem Waschen mit 350 µL Ethanol 80% wurde das Pellet getrocknet und in 30 µL deionisiertem Formamid 50% aufgenommen. Die Überprüfung der RNA mittels Gelelektrophorese erfolgte wie oben bereits beschrieben. In den meisten Fällen enthielten die Proben zudem etwas DNA.

Extraktionspuffer	200 mM Tris
	300 mM LiCl
	10 mM EDTA
	1,5% SDS
	2% PVPP

2.3.4.3 RNA-Extraktion aus *Xiphinema index*

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Nematoden erfolgte nach dem Protokoll von Wilk *et al.* (1994, modifiziert). Bis zu 20 Individuen wurden mit Hilfe von 12 sterilen Glasperlen (Ø 3 mm) in 150 µL autoklaviertem, deionisiertem Wasser durch Vortexen homogenisiert. Im Anschluss an die Extraktion wurde der abgenommene Überstand mit 2,7 vol Ethanol und 0,1 vol NaAc (3 M, pH 5,2) für 1 h bei -20°C gefällt. Nach der Zentrifugation mit 18000xg für 30 min bei 4°C wurde die RNA bei RT 5 min getrocknet und in 10 µL nukleasefreiem Wasser gelöst.

2.3.5 Enzyme Linked Immuno Sorbent Essay (ELISA)

Der serologische Nachweis von Virusinfektionen bei Pflanzen erfolgte mittels ELISA. 96-well Platten (Nunc) wurden mit entsprechendem Antikörper (1:1000, 100 µL / well) in coating-Puffer bei 37°C für 4 h beschichtet und anschließend mit Waschpuffer 3x gespült. 150 µL Pflanzenprobe, in Extraktionspuffer „grapevine“ oder „general“ (Bioreba, Reinach, CH) homogenisiert, wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3x Spülen mit Waschpuffer wurde der sekundäre, mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Antikörper (1:1000, 100 µL pro well) 5 h bei 37°C inkubiert. Darauf folgend wurde die Platte wiederum 3x gewaschen und zur Farbreaktion mit Substratpuffer / 4-Nitrophenylphosphat Na₂ (1 mg/mL, 100 µL/well) beladen. Die Farbreaktion der Proben wurde bei $\lambda = 405$ nm mit einem ELISA-Reader (Multiskan Ascent, Thermo, Dreieich) gemessen. Als positiv wurden Proben gewertet, die mindestens den dreifachen Wert der Negativkontrolle (Probe einer gesunden Pflanze) ergaben. Die verwendeten Antikörper sind Tab. 3 zu entnehmen.

Coating-Puffer (pH 9,6)	15 mM Na ₂ CO ₃
	33 mM NaHCO ₃
Waschpuffer (pH 7,4)	137 mM NaCl
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	8 mM Na ₂ HPO ₄
	2,7 mM KCl
	5% Tween 20
Conjugate-Puffer (pH 7,4)	20 mM Tris
	137 mM NaCl
	2% PVP 24000 kD
	0,5‰ Tween 20
	0,2% BSA
	1 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O
Substratpuffer (pH 9,8)	2,7 mM KCl
	9,7% Diethanolamin

Tab. 3: Antikörper zum Virusnachweis mittels ELISA

Zielvirus	Antikörper	Hersteller
GFLV	Anti-GFLV-IgG (prim.) Anti-GFLV-IgG conjug AP (sek.)	Bioreba (CH)
ArMV	Anti-ArMV-IgG (prim.) Anti-ArMV-IgG conjug AP (sek.)	Bioreba (CH)
RpRSVg	RpRSV (prim.) RpRSV-IgG-AP (sek.)	DSMZ (D)

2.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Amplifikation ausgewählter Sequenzen wurde mittels PCR mit den Reagenzien von Solis BioDyne (Tartu, Estland) durchgeführt. Für einen Reaktionsansatz von 25 µL wurden 2,5 µL 10xPuffer B, 2 µL MgCl₂, 0,25 µL Desoxyribonukleotidmix (20 mM) und 0,25 µL Taq-Polymerase FIREPol® in nukleasefreiem Wasser angesetzt. Die gewünschte Primerkombination (0,5 µL je Primer, 12 mM, MWG, Ebersberg) und Template-DNA wurden zugefügt und der Ansatz durchmischt. Die Probe wurde 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend folgten max. 40 Zyklen mit 95°C für 30 s (Denaturierung), T_M für 30 s (Annealing) und 68°C für 45 s (Elongation). Der abschließende Elongationsschritt betrug 7 min bei 68°C. Die Amplifikation wurde im Thermocycler GeneAmp®PCRSYSTEMS9700 (Perkin Elmer) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden generell über Gelelektrophorese mit einem Agarosegel (1% in TBE-Puffer, 0,01%EtBr) überprüft.

2.3.7 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Für die Transkription und Amplifikation von RNA-Sequenzen wurde der SuperScript™ One-Step RT-PCR Kit (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Für einen Ansatz von 20 µL wurden 10 µL RT-Puffer und 0,5 µL RT-Taq auf Eis angesetzt und die gewünschte

Primerkombination (0,5 µL je Primer, 12 mM, MWG), sowie RNA als Template zugefügt und gemischt. Die Reverse Transkription fand bei 50°C für 45 min statt, gefolgt vom entsprechenden PCR-Programm für die Amplifikation.

2.3.8 Immunocapture-RT-PCR (IC-RT-PCR)

Zum sensitiven Nachweis von Virusinfektionen bei Pflanzen wurde die IC-RT-PCR angewandt. Pflanzengewebe wurde im Extraktionspuffer (Bioreba) homogenisiert. Auf mit Antikörpern (1:1000) gegen das entsprechende Virus beschichtete Titerplatten wurden diese Homogenate gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert, wie unter 2.3.5 beschrieben. Nach 3x Spülen mit Waschpuffer wurden die am Antikörper gebundenen Viruspartikel mit 20 µL TritonX100 (10%, 65°C) geknackt und dadurch die virale RNA freigesetzt. Zur Transkription und Amplifikation wurden 2 µL dieser Lösung als Template für die RT-PCR eingesetzt.

2.3.9 quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Für die qRT-PCR im MJ Opticon Monitor (Biorad) wurden 50 ng DNA als Template eingesetzt. Der Reaktionsansatz für die PCR mit 25 µL wurde wie oben beschrieben vorbereitet, wobei hier jedoch noch 0,75 µL SYBR Green (Amresco), 1:2000 in DMSO gelöst, als Fluoreszenzfarbstoff enthalten waren. Außerdem betrug die Konzentration der eingesetzten Primer 3 pmol/µL. Die Ansätze wurden 3 min bei 95°C denaturiert, anschließend folgten max. 40 Zyklen mit 95°C für 30 s (Denaturierung), T_M für 30 s (Annealing) und 72°C für 30 s (Elongation). Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz der Proben gemessen. Der abschließende Elongationsschritt betrug 5 min bei 72°C. Die Schmelztemperatur der Produkte wurde über 40 Schritte von je 10 s ab 55°C bis 94°C bestimmt. Zur Kontrolle der Produktgröße der Amplifikate wurden die Proben zusätzlich durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.3.10 Northern Blot

2.3.10.1 High Molecular Weight (HMW) Northern Blot

Zur Untersuchung von mRNA wurden Northern Blots nach dem modifizierten Protokoll von Roche durchgeführt. Als Blotgel diente ein 1,5%iges Agarosegel, angesetzt mit 1x MEN-Puffer / 1,6% deionisiertem Formaldehyd. Die RNA-Proben wurden mit 1 vol Denaturierungspuffer versetzt, 10 min bei 65°C denaturiert und im Anschluss 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Mischen der Proben mit 1/10 vol Ladepuffer wurde das Gel mit diesen beladen und in 1x MEN-Puffer bei 5 V/cm aufgetrennt. Anschließend fand unter UV-Licht eine Überprüfung des Gels statt. Das Blotgel wurde 3 min in Wasser gewaschen, anschließend 15 min in 0,05M NaOH und danach 2x 20 min in 20x SSC-Puffer geschwenkt. Das Blotten erfolgte durch Kapillartransfer über Nacht, wozu das Gel auf mit 20x SSC-Puffer getränktes Whatmanpapier in die Blotkammer gelegt wurde. Die Membran (Hybond N+) und drei Lagen Whatmanpapier in Gelgröße wurden positioniert. Abschließend wurde saugfähiges Papier in Gelgröße ca. 5 cm hoch gestapelt und das Blotsystem mit etwa 2 kg beschwert. Nach dem Blotten wurden die Membran und das Gel auf die Effizienz des Transfers unter UV-Licht überprüft. Die Membran wurde 10 min mit 2x SSC-Puffer equilibriert und unter UV-Licht mit 240 mJ/cm² im Crosslinker fixiert.

10x MEN-Puffer (pH 8,0)	200 mM MOPS
	50 mM NaAcetat
	20 mM EDTA
Denaturierungspuffer	53% Formamid (deionisiert)
	12,7% Formaldehyd 37% (deionisiert)
	21,2% 10x MEN-Puffer
	0,1% EtBr
	in H ₂ O _{DEPC}
Ladepuffer	30% Ficoll
	10 mM EDTA
	1 Spatelspitze BPB

	1 Spatelspitze CX
	in H ₂ O _{DEPC}
20x SSC-Puffer (pH 7,0)	3 M NaCl
	300 mM tri-NaCitrat

2.3.10.2 Low Molecular Weight (LMW) Northern Blot

Die Auftrennung von siRNA erfolgte über ein 17,5%iges Polyacrylamidgel (PAGE) im Minigel-System (Biorad) nach dem Protokoll von Dunoyer (IBMP, Strasbourg). Nach dem Gießen und Auspolymerisieren des Gels wurde bei 80 V ein 30minütiger Vorlauf in 0,5x TBE-Puffer durchgeführt. Die Geltaschen wurden vor dem Beladen mit einer Spritze gespült, um den angesammelten Harnstoff zu entfernen. Das Volumen der RNA-Proben (10 µg) wurde mit deionisiertem Formamid 50% auf max. 20 µL angeglichen. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 65°C denaturiert, danach 5 min auf Eis abgekühlt und mit Ladepuffer versehen. Nach dem Beladen lief das Gel in 0,5x TBE-Puffer bei 80 V für ca. 3,5 h. Das Gel wurde wie in der Herstelleranleitung (Biorad) angegeben in die Blotvorrichtung eingesetzt und die RNA mit 320 mA auf die Membran (Hybond N+, Amersham) bei 4°C in 0,5x TBE-Puffer transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran 10 min mit 2x SSC equilibriert und im Crosslinker (240 mJ/cm²) fixiert.

PAGE 17,5 % (2 Gele)	4,2 g Harnstoff
	4,35 ml 40% Acryl / Bisacryl (19:1)
	0,5 mL 10x TBE-Puffer
	80 µL APS 10%
	3,8 µL TEMED
	ad 10 mL H ₂ O _{bidest}
Ladepuffer	50% Glycerol
	50 mM Tris
	5 mM EDTA
	1 Spatelspitze BPB

10x TBE-Puffer (pH 7,7)	890 mM Tris
	890 mM Borsäure
	20 mM EDTA
20x SSC-Puffer (pH 7,0)	3 M NaCl
	300 mM tri-NaCitrat

2.3.11 Southern Blot

Zur Southern Blot-Analyse wurden 15 µg DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen (75-100 U) über Nacht inkubiert und mit 2,7 vol Ethanol 99% und NaAc (300 mM, pH 5,2) bei -20°C für 1 h gefällt. Nach Zentrifugation mit 18000xg für 10 min wurde die DNA in TE'-Puffer bei 65°C resuspendiert. Die DNA-Proben wurden mit 0,12 vol Ladepuffer versetzt und bei 70°C für 10 min denaturiert. Das Blotgel (1% TAE, 0,05 % EtBr) lief bei 25 V über Nacht und wurde danach unter UV-Illumination überprüft. Das Gel wurde 2x 10 min in HCL (0,25 M) depuriniert, anschließend 1 min in sterilem H₂O_{Millipor} und 2x 20 min in Transferpuffer gespült. Das Kapillarblotsystem wurde wie unter 2.3.10.1 beschrieben aufgebaut und die DNA unter Verwendung von Transferpuffer über Nacht auf die Membran geblotet. Nach dem Blot wurde die Membran 2x 20 min in Puffer N neutralisiert.

Transferpuffer	400 mM NaOH
	1 M NaCl
Puffer N (pH 7,2)	500 mM Tris
	1 M NaCl

2.3.12 Hybridisierung mit radioaktivmarkierter Sonde (Northern Blot)

Mit dem Prime-a-Gene® Labeling System (Promega, Madison, USA) wurde die Radioaktivmarkierung der DNA-Sonde nach Herstellerangaben durchgeführt. Als radioaktives Nukleotid wurde α -³²P-dCTP (3000 Ci/mM, Amersham) verwendet. Als Template-DNA (15-100 ng) diente eine durch PCR amplifizierte entsprechende Sequenz (< 1 kb), die über Gelextraktion mittels Glaswolle aufgereinigt wurde. Die Abtrennung der

Sonde von überschüssigen Nukleotiden erfolgte über eine Säule aus einer sterilen Pasteurpipette, beladen mit Sephadex 50fine (Pharmacia Biotech, Schweden). Die zu hybridisierenden Membranen wurden mit PerfectHyb Plus (Sigma) bei entsprechender Temperatur für 20 min prähybridisiert. Die erforderliche Temperatur lag bei 65°C für HMW Northern Blot (mRNA), für LMW Northern Blot (siRNA) bei 42°C. Die Hybridisierung mit der Sonde erfolgte über Nacht. Gewaschen wurden die Membranen bei 65°C (HMW Northern Blot) bzw. 50°C (LMW Northern Blot) für 2x 20 min mit 2x Waschpuffer. Im Fall eines zu starken Signals (>200 IPS) wurde bei Bedarf mit dem stringenderen 0,1x Waschpuffer bei RT gewaschen und die Intensität der Aktivität überprüft. Die Membranen wurden in Frischhaltefolie gelegt und Röntgenfilm (BioMax MS, Kodak) bei -70°C für 8 h exponiert. Die Röntgenfilme wurden jeweils 5 min mit Entwickler und Fixierer von Kodak behandelt. Um eine weitere Sonde zu hybridisieren, wurde die Membran zuvor 2x 10 min in kochendem SDS 0,1% gestriipt.

2x Waschpuffer	300 mM NaCl
	30 mM NaCitrat
	2% SDS
0,1x Waschpuffer	150 mM NaCl
	15 mM NaCitrat
	0,1% SDS

2.3.13 Hybridisierung mit dem DIG-Labeling System (Southern Blot)

Die Membran wurde 2 h bei 45°C mit 10 mL DIG Easy Hyb (Roche) prähybridisiert. Die Herstellung der Sonde erfolgte mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Penzberg) nach Vorgaben des Anbieters. Die Sonde wurde 15 min bei 65°C denaturiert, die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 45°C. Als erster Waschschriff wurde die Membran 2x 20 min mit 2x Waschpuffer gespült. Anschließend folgten 2 Waschschriffe von je 20 min mit 0,5x Waschpuffer bei 68°C. Nach dem Equilibrieren für 2x 1 min in Puffer E wurde die Membran 1 h in Blockinglösung inkubiert. Sobald die Blockinglösung gegen Antikörperlösung (AK Anti-DIG-AP, Roche; 1:10000 in Blockinglösung) ausgetauscht war, wurde eine weitere Stunde inkubiert und die Membran anschließend 2x 30 min in Puffer E gespült. Die

Membran wurde 2x 2 min in Detektionspuffer equilibriert und mit 20 µL CDP-Star (Roche) in 2 mL Detektionspuffer für 10 min inkubiert. Chemolumineszenz wurde mit dem Analysesystem BIS 303 PC (Biostep) detektiert.

2x Waschpuffer	300 mM NaCl
	30 mM NaCitrat
	0,1% SDS
0,5x Waschpuffer	75 mM NaCl
	7,5 mM NaCitrat
	0,1% SDS
Maleinsäurepuffer (pH 7,5)	100 mM Maleinsäure
	150 mM NaCl
Puffer E	0,3% Tween 20 in Maleinsäurepuffer
Blockinglösung	10% Blocking Reagent (Roche)
	in Maleinsäurepuffer
Detektionspuffer (pH 9,5)	100 mM Tris
	100 mM NaCl

2.3.14 Virusisolation aus Blattmaterial

Zur Aufreinigung von Viren (Le Gall *et al.*, 1989, modifiziert) wurden 200 g Blattmaterial infizierter *Chenopodium quinoa* mit 200 mL Extraktionspuffer im Standmixer homogenisiert, über Filterwatte in ein Glasgefäß überführt und das Volumen mit Phosphatpuffer auf 400 mL aufgefüllt. Nach Zugabe von 34 mL Butanol wurde die Suspension 15 min gerührt, dann in Zentrifugengefäße aufgeteilt und bei 8000xg für 20 min bei 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Filterwatte überführt, 100 mL 5x PEG-Puffer sowie 5 mL TritonX-100 zugegeben und eine Stunde bei RT gerührt. Im Anschluss an eine weitere Zentrifugation von 30 min wurde jedes Pellet in 2 mL Phosphatpuffer aufgenommen und bei 4°C über Nacht gelöst. Die Probe wurde bei 60000xg für 10 min zentrifugiert. Nach Überführung des Überstandes in Ultrazentrifugengefäße folgte eine Zentrifugation bei 250000xg für 3 h bei

4°C. Jedes Pellet wurde daraufhin in 1 mL Phosphatpuffer resuspendiert und bei 18000xg für 2 min abzentrifugiert. Virus wurde über einen 10%-20%-40%-60%-Saccharosegradienten in Phosphatpuffer durch Ultrazentrifugation bei 150000xg für 5 h bei 4°C aufgereinigt. Viruspartikel, die im Gradienten zwischen den Phasen 40% und 60% akkumulierten, wurden abpipettiert und das Volumen mit Phosphatpuffer auf 20 mL aufgefüllt. Mit einer abschließenden Ultrazentrifugation mit 250000xg für 2 h bei 4°C wurde das Virus pelletiert und in 1 mL Phosphatpuffer resuspendiert.

Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0)	1 M Na ₂ HPO ₄ (57,7 mL) 1 M NaH ₂ PO ₄ (42,3 mL) ad 1 L H ₂ O _{Millipor}
Extraktionspuffer	100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,0) 100 mM Ascorbinsäure 10 mM EDTA
5x PEG-Puffer	100 mM NaCl 10% PEG 20.000 Zugabe von 1% TritonX-100 nach Erhitzen

2.4 Infiltration der Sensorkonstrukte

2.4.1 Agrobakterien-Infiltration

Die Anzucht von Agrobakterien erfolgte unter Selektion (Str 200mg/mL, Spc 200mg/mL, Rif 15 mg/mL) in LB-Medium bei 28°C. Für die Infiltration (Kapila *et al.*, 1997, modifiziert) wurden nach einer Zentrifugation mit 5000xg für 10 min die Bakterien in Induktionsmedium resuspendiert und eine Konzentration von OD₆₀₀ 1 eingestellt. Eine folgende Präinkubation von 2 h bei RT diente der Aktivierung der Bakterien. Mit einer nadellosen Spritze wurde die Bakterienlösung in die Unterseite von *Nicotiana benthamiana*-Blättern infiltriert.

Junge, vollständig entwickelte Rebenblätter wurden in Agrobakterienlösung gelegt und unter Vakuum (55 mmHg) in der Kammer vom Biolistic System PDS1000He (Biorad) 10 min

infiltriert. Zur Entspannung verblieben die Blätter anschließend 20 min in der Lösung. Die Co-Kultur erfolgte abgedunkelt bei 22°C.

LB-Medium (pH 7,5)	0,5% Hefe
	1% Pepton / Trypton
	170 mM NaCl
	1,5% Bacto-Agar für Festmedium
Induktionsmedium	10 mM MgSO ₄
	10 mM MES (pH 5,6)
	100 µM AS

2.5 Virusinokulation

2.5.1 Inokulation von *Nicotiana benthamiana* und *Chenopodium quinoa*

N. benthamiana und *Ch. quinoa* mit 4-6 Blättern wurden über Standard-Challenge-Inokulation mit Virus infiziert. Hierzu wurde 0,5 g infektiöses Blattmaterial in 1 mL Inokulationspuffer homogenisiert und auf 2 Blätter je Pflanze aufgerieben.

Inokulationspuffer (pH 9,2)	30 mM K ₂ HPO ₄
	50 mM Glycin
	1% Bentonit
	1% Celite

2.5.2 *Xiphinema index*-Kultur im Gewächshaus

Zur Zucht von *Xiphinema index* wurden Stecklinge von Feigen (*Ficus carica*) bzw. virusinfizierten Reben (*Vitis vinifera*) in Perlite bewurzelt, in Sand (Körnung 0,2-0,5 mm) unter Standard-Gewächshausbedingungen kultiviert und mit handverlesenen *X. index* besetzt. Die Pflanztöpfe der Kultur wurden zuvor mit Folie ausgekleidet, um das Ausrieseln von Sand und den Verlust von Nematoden zu verhindern. Der Wassergehalt des Sandes wurde auf 40-

60% Feldkapazität eingestellt. Nematoden wurden aus einer Bodenprobe der Kultur durch Aufschwemmen und Auswaschen über einem Sieb (Maschenweite 50 µm) gewonnen und mittels einer Borste handverlesen.

2.5.3 *In vitro* Dualkultur mit *Xiphinema index* und Reben

Einaugen-Rebenstecklinge aus *in vitro* Standardkultur wurden in WECK-Gläsern mit Sand (140 g, Körnung 0,2-0,5 mm, bei 200°C ü. N. sterilisiert) und ½ MS-Medium bei 100% Feldkapazität bewurzelt. Nach dieser 3-wöchigen Vorkultur wurden zur Inokulation handverlesene, mit sterilem Wasser gespülte *X. index* direkt an freigelegte Wurzeln gegeben und mit Sand bedeckt. Nach 6 Wochen Inkubationszeit wurden zur Analyse Blattproben genommen und Nematoden sowie Rebenwurzeln ausgewaschen.

2.6 Transmissionselektronenmikroskopie

2.6.1 Virusnachweis im Odontophor von *Xiphinema index*

Handverlesene *X. index* wurden 2 h bei RT in Phosphatpuffer (0,05 M, pH 7,0) mit 2% Formaldehyd / 0,01% Glutaraldehyd fixiert und 3x 10 min mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend folgte eine Behandlung mit Osmiumteroxid (1% in Phosphatpuffer) für 2 h bei RT. Nach erneutem 3x 10-minütigem Waschen wurden die Objekte in 1% Agar eingebettet und über Nacht bei 4°C in Phosphatpuffer gelegt. Die Präparate wurden als möglichst kleine Blöcke ausgeschnitten und entwässert. Die Entwässerungsreihe bestand aus Methanol zu 30%, 50%, 70% und 90%. Jeder Entwässerungsschritt wurde 2x ½ h bei RT auf einem Schüttler durchgeführt. Abschließend wurde 3x ½ h mit 100% Methanol inkubiert. Der Einbettung in Kunstharz geht eine Konzentrationsreihe mit Methanol / Harz (LR Gold oder LR white, PLANO, Marburg) von 3:1, 1:1, 1:3 und 0:1 je 2x für ½ h voraus. Als letzter Schritt wurde die Probe über Nacht in Harz gelagert. Zur Einbettung wurden die Blöcke mit den Proben in geeigneten Kapseln ausgerichtet, mit LR Gold / 1% Benzylperoxid aufgefüllt und die Kapsel verschlossen. Nach mehrtägigem Aushärten wurden die Präparate den Kapseln entnommen. In erforderlichen Fällen wurde das eingebettete Objekt abgesägt und

neu ausgerichtet am Harzblock mit 2-Komponenten-Kleber (UHU plus schnellfest 2K-Epoxidharzkleber) fixiert.

Kupfernetze („grids“) zur Aufnahme der Gewebeschnitte wurden mit Formvar (PLANO, Marburg) beschichtet. Saubere, vorgewärmte Objektträger wurden für 20 s in Chloroform / 0,4% Formvar getaucht und getrocknet. Der Formvarfilm wurde auf eine Wasseroberfläche übertragen und die „grids“ mit der glänzenden Seite aufgelegt. Mit einem Stück Parafilm wurden die beschichteten „grids“ von der Wasseroberfläche aufgenommen.

Der Harzblock mit eingegossenem Präparat wurde mit einer Rasierklinge pyramidenförmig zugeschnitten und in die Haltevorrichtung des Ultramikrotoms (2128 Ultratome, LKB) eingesetzt. Mit dem Glasmesser wurde zunächst bis zum Kopfbereich des Objektes geschnitten. Nun wurde das Präparat wieder zu einer kleineren Pyramide geformt. Mit dem Diamantmesser wurden nun Schnitte von 50 nm angefertigt. Die Oberflächenspannung wurde mit Chloroformdampf herabgesetzt und die schwimmenden Gewebeschnitte mit formvarbeschichteten Kupfernetzen aufgenommen und getrocknet. Die Färbung der Objekte erfolgte nach Reynolds (Reynolds, 1963) mit Uranylacetat und Bleicitrat. Das Kupfernetz mit den Ultradünnschnitten wurde mit der Präparatseite auf einen Tropfen Uranylacetat 3% aufgelegt und für 10 min inkubiert, anschließend 6x 1 min auf Wasser schwimmend gewaschen. Zur weiteren Behandlung wurde das Präparat in einem Tropfen Bleicitrat 2 min inkubiert und darauffolgend gewaschen. Zuerst wurde das Präparat 1 min in einem Tropfen Wasser, dann entsprechend 6x 1 min auf Wasser schwimmend gewaschen und getrocknet. Die Untersuchung der Schnitte erfolgte mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop EM 208 (Philips).

3 Ergebnisse

Die verwendeten Konstrukte für transgene Pflanzen wurden zunächst auf ihr theoretisches Potential zur Induktion von Virusresistenz untersucht. Hierfür wurde eine Strukturanalyse der mRNA durchgeführt, um die „post transcriptional gene silencing“ (PTGS)-induzierenden Eigenschaften zu bewerten.

3.1 Thermodynamische Analyse der virusresistenz-induzierenden Konstrukte

Mit mFOLD konnte anhand thermodynamischer Eigenschaften der analysierten Sekundärstruktur der einzelsträngigen mRNA der Konstrukte eine stabile Doppelstrangbildung in den PTGS-induzierenden Sequenzabschnitten nachgewiesen werden. Die durch das Programm ermittelten Molekülfaltungen basierten auf der minimalen Energie bei 37°C. Die Faltungsmodelle in Abb. 4 und 5 geben die optimale Sekundärstruktur bei minimaler Energie wieder. Die optimale theoretische Sekundärstruktur muss jedoch nicht mit der Realen übereinstimmen. Aus den Diagrammen ist zu entnehmen, dass mögliche Basenpaarungen unter Abweichung von der optimalen Energie von $\Delta G = 12$ kcal/mol dennoch konstante Doppelstrangstrukturen besonders bei „defective interfering“ (DI)- bzw. „inverted repeat“ (IR)-Sequenzen ergeben können. Diese RNA-Abschnitte nehmen eine definierte Sekundärstruktur ein. Energetisch bedingte Änderungen der Sekundärstruktur wurden hingegen in den restlichen Konstruktabschnitten („spacer“, „sense“-Abschnitte) festgestellt, wodurch diese als variabel zu bezeichnen sind.

3.1.1 DI-Konstrukte

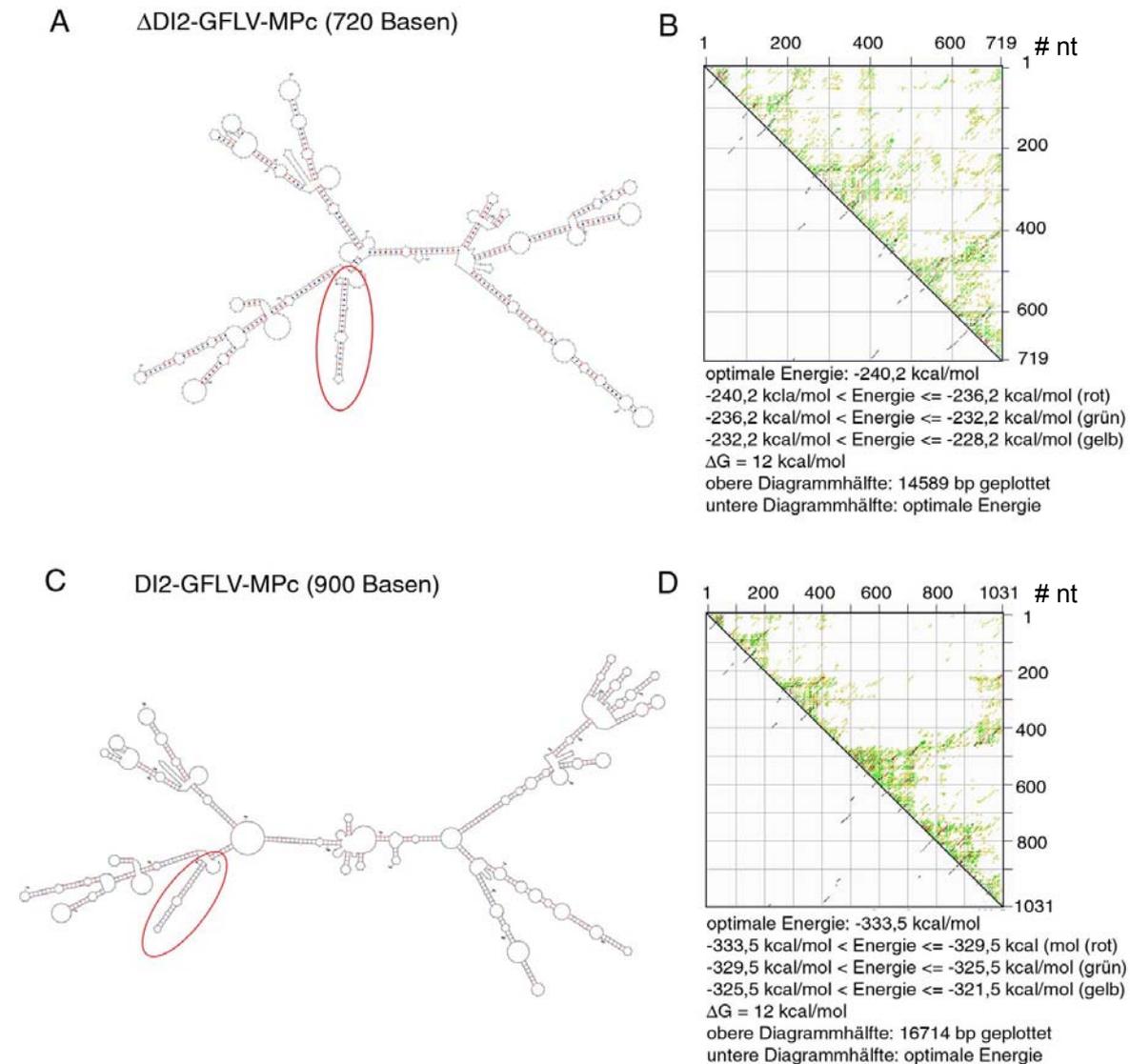


Abb. 4: Sekundärstruktur der DI-Konstrukte. Optimale Faltung bei minimaler Energie, „hairpin“-Struktur der DI-Sequenz rot markiert (A, C). Verteilung der möglichen Paarungen der gegeneinander aufgetragenen Basen im Energiegefälle (B, D), $\Delta G = 12$ kcal/mol.

Aus der mFOLD-Analyse gingen jeweils 25 mögliche Faltungsschemata für die DI-Konstrukte hervor. Die virale Sequenz aus dem „movement protein“ (MP) von GFLV ergab variable Sekundärstrukturen, während die DI-Sequenz konstant dsRNA bildete (Abb. 4 A, C, rot markiert). In der Diagrammhälfte rechts der Diagonalen (= obere Diagrammhälfte) ist die breite Streuung zu erkennen, die die Variabilität der möglichen Basenpaarungen in Abhängigkeit der Energie angibt (Abb. 4 B, D). Stabile Basenpaarungen beschränken sich auf

kurze RNA-Abschnitte und sind für die optimale Energie in der Diagrammhälfte links der Diagonalen (= untere Diagrammhälfte) zusätzlich gespiegelt dargestellt (B, D). Energetisch stabile doppelsträngige Abschnitte sind insbesondere in der DI-, aber auch in der viralen „sense“-Sequenz aus dem MP zu finden.

3.1.2 IR-Konstrukte

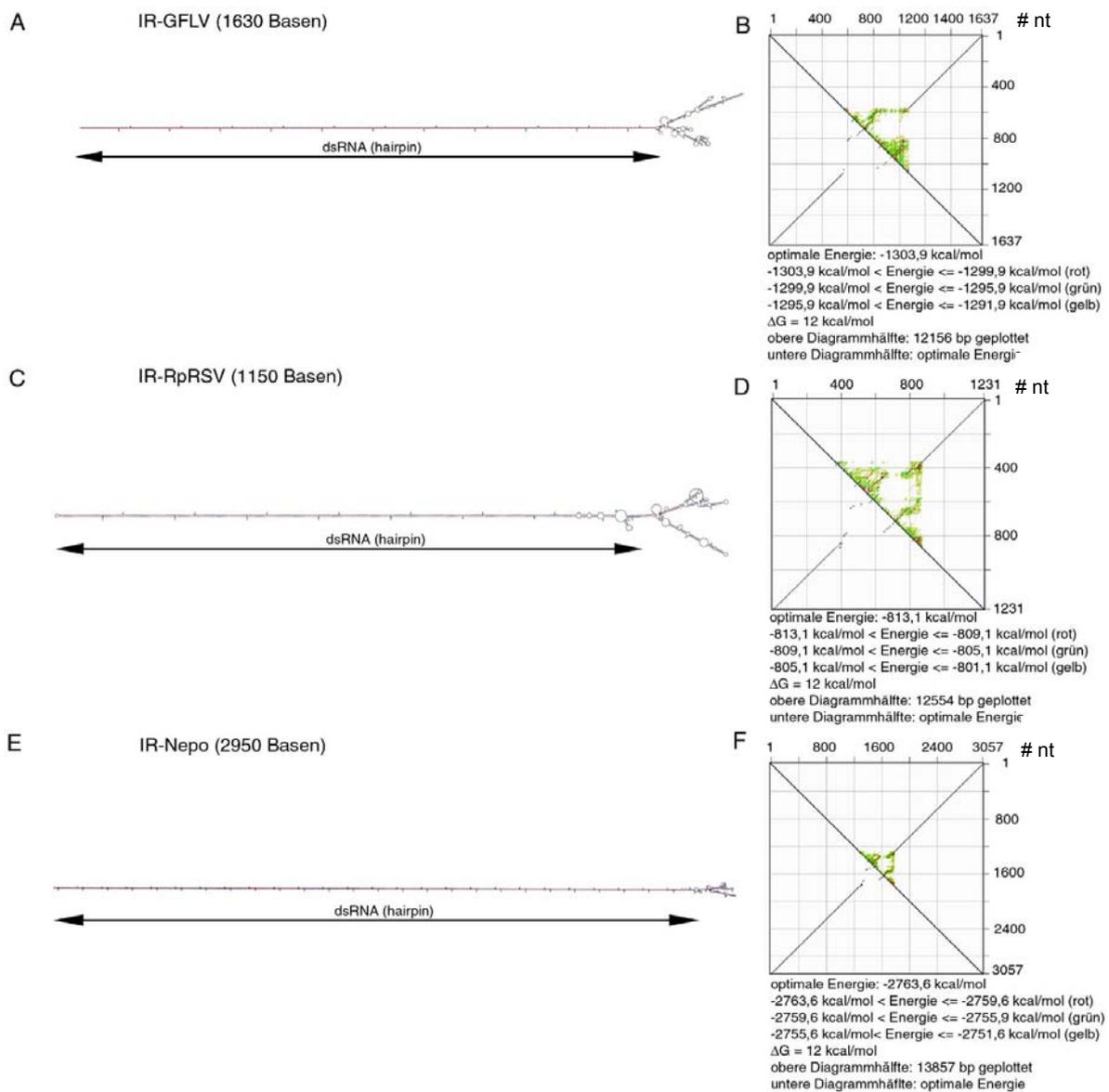


Abb. 5: Sekundärstruktur der IR-Konstrukte. Optimale Faltung bei minimaler Energie, IR-Sequenz durch Doppelpfeil markiert (A, C, E). Verteilung der möglichen Paarungen der gegeneinander aufgetragenen Basen im Energiegefälle (B, D, E), ΔG = 12kcal/mol.

Die viralen Sequenzen in IR-Anordnung bilden sehr stabile Sekundärstrukturen in Form von „hairpin“- (hp)RNA (Abb. 5 A, C, D). Bei IR-GFLV wurden 4, bei IR-RpRSV 6 und bei IR-Nepo nur 2 Faltungsvarianten als Modell ermittelt. Die Analyse der möglichen Basenpaarungen ergab auch bei Abweichung von der optimalen Energie nur wenige Faltungsmöglichkeiten der IR-Konstrukte (Abb. 5 B, D, E). Im Bereich der komplementären Sequenzen wurde konstant dsRNA ausgebildet. Die stabile dsRNA dieser Sequenzabschnitte ist im Diagramm als Orthogonale zur diagrammteilenden Diagonalen erkennbar. Variabilität in der Molekülfaltung war nur im Bereich des „spacer“ zu finden, was auf instabile Doppelstrangstruktur im mittleren RNA-Abschnitt hinweist.

3.2 Transgene *Nicotiana benthamiana* als Modellsystem

3.2.1 Biologische und molekulare Charakterisierung

Aus der Transformation mit Agrobakterien wurden insgesamt 124 unabhängige transgene Pflanzen mit 5 unterschiedlichen Konstrukten (vergl. 2.3.1) regeneriert. Hierbei entfielen auf DI2-GFLV-MPc (als DI2 bezeichnet) 25 Primär-Transformanten und Δ DI2-GFLV-MPc (als Δ DI2 bezeichnet) 33 Primär-Transformanten. Bei den IR-Konstrukten wurden 40 Primär-Transformanten mit IR-Nepo, 20 mit IR-GFLV und 5 mit IR-RpRSV regeneriert. Alle Transformanten wurden über Stecklinge auf Medium mit Phosphinotricin selektiert.

3.2.1.1 Überprüfung der Transgenität mittels PCR

Die regelmäßige Überprüfung mittels PCR (Abb. 6) erfolgte, um nicht-transgene oder chimäre Pflanzen zu identifizieren. Mittels einer NADH-Dehydrogenase (nad)-spezifischen PCR (803 bp) erfolgte die Amplifikation einer Sequenz dieses Endogens, welches zur Qualitätskontrolle der DNA-Extraktion diente (A). Das Transgen wurde durch Amplifikation des bar-Selektionsmarkers (322 bp) und der entsprechenden transgenen Virussequenz (GFLV-MPc: 298 bp, RpRSV-NCR: 366 bp) nachgewiesen. Transgene Pflanzen mit Δ DI2-, DI2- und IR-GFLV-Konstrukten zeigten die spezifischen Banden für bar und GFLV-MPc (B, C). Aus Pflanzenproben mit dem IR-RpRSV-Konstrukt wurden Sequenzen aus dem Phosphinotricin-Acetyltransferase- (bar) und RpRSV-Transgen amplifiziert (B, D). Da im

IR-Nepo-Konstrukt sowohl Sequenzen von GFLV, als auch von RpRSV enthalten waren, zeigten diese Pflanzen beide Amplifikationsprodukte (C, D). Zusätzlich wurde auch das bar-Transgen nachgewiesen (B).

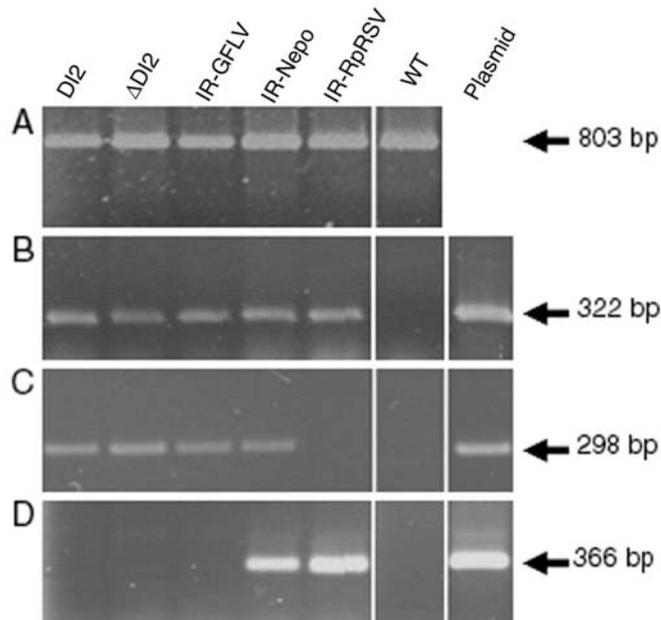


Abb. 6: Nachweis des Transgens durch PCR bei transformierten *N. benthamiana*. Amplifikation der endogenen NADH-Dehydrogenase (A). Nachweis des Selektionsmarkers bar (B). Nachweis der viralen Sequenzen in den Konstrukten: GFLV-MPc (C) und RpRSV-NCR (D).

3.2.1.2 Resistenztest durch Challenge-Inokulation

Transgene Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen durch Challenge-Inokulation auf Virusresistenz überprüft. Hierfür wurden Pflanzen der T0-Generation verwendet, lediglich die Linien IR-Nepo 13-15 stammten aus der T1-Generation verschiedener Primärtransformanten. Nicht alle *in vitro* kultivierten Transformanten konnten aufgrund mangelnder Bewurzelung für die Inokulationsexperimente im Gewächshaus etabliert werden.

Die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Inokulationsexperimenten sind in Tab. 4 zusammengestellt. Das Resistenzverhalten variierte bei Pflanzen mit verschiedenen Konstrukten. Ebenso zeigte sich unterschiedliche Virusresistenz bei Primärtransformanten bzw. Linien, die das gleiche Konstrukt enthielten. Aber auch bei genetisch identischen Klonen, die durch Stecklinge gewonnen wurden, reagierten die Einzelindividuen unterschiedlich auf die Challenge-Inokulation. Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (WT) war jedoch bei vielen

transgenen Pflanzen Virusresistenz zu beobachten. Bei den klonal vermehrten Primär-Transformanten mit dem Konstrukt Δ DI2 waren bei #13, 15, 21, 28, und 30 GFLV-resistente Pflanzen zu finden. Pflanzen aus den Transformanten #4 und 19 mit DI2-Konstrukt bzw. #2, 8, 10 und 21 mit IR-GFLV-Konstrukt zeigten ebenfalls Resistenz gegen GFLV. Eine Resistenz gegen RpRSVg bei T0-Pflanzen mit IR-RpRSV-Konstrukt konnte nicht festgestellt werden. Bei den Linien (T1) 13, 14 und 15 mit IR-Nepo-Konstrukt, die ebenfalls über Stecklinge vermehrt wurden, waren GFLV-resistente Pflanzen zu finden. Eine Pflanze der Linie IR-Nepo14 zeigte Resistenz gegen RpRSVg. Gegen ArMV konnte keine Resistenz nachgewiesen werden.

Tab. 4: Challenge-Inokulation von transgenen *N. benthamiana* und Überprüfung der Infektion mittels ELISA (14dpi). Klonal vermehrte transgene Primär-Transformanten mit Δ DI-, DI-, IR-GFLV, IR-RpRSV- und IR-Nepo-Konstrukten (T0).

Konstrukt	Transformant/ Linie #	Pflanzen inokuliert (n)	ELISA (14dpi)		Inokuliertes Virus
			pos	neg	
Δ DI2-GFLV-MPc	2	1	1	0	GFLV
Δ DI2-GFLV-MPc	5	3	3	0	GFLV
Δ DI2-GFLV-MPc	8	8	8	0	GFLV
Δ DI2-GFLV-MPc	9	6	6	0	GFLV
Δ DI2-GFLV-MPc	12	2	2	0	GFLV
Δ DI2-GFLV-MPc	13	5	1	4	GFLV
Δ DI2-GFLV-MPc	15	4	1	3	GFLV
Δ DI2-GFLV-MPc	16	6	6	0	GFLV
Δ DI2-GFLV-MPc	17	5	2	3	GFLV
Δ DI2-GFLV-MPc	18	8	8	0	GFLV
Δ DI2-GFLV-MPc	21	7	6	1	GFLV
Δ DI2-GFLV-MPc	28	3	2	1	GFLV
Δ DI2-GFLV-MPc	30	7	5	2	GFLV
Δ DI2-GFLV-MPc	31	4	4	0	GFLV
DI2-GFLV-MPc	2	4	4	0	GFLV
DI2-GFLV-MPc	4	3	2	1	GFLV
DI2-GFLV-MPc	6	5	5	0	GFLV

Ergebnisse

Konstrukt	Transformant/ Linie #	Pflanzen inokuliert (n)	ELISA (14dpi)		Inokuliertes Virus
			pos	neg	
DI2-GFLV-MPc	8	5	5	0	GFLV
DI2-GFLV-MPc	13	5	5	0	GFLV
DI2-GFLV-MPc	17	2	2	0	GFLV
DI2-GFLV-MPc	18	2	2	0	GFLV
DI2-GFLV-MPc	19	4	3	1	GFLV
DI2-GFLV-MPc	20	5	5	0	GFLV
DI2-GFLV-MPc	21	4	4	0	GFLV
DI2-GFLV-MPc	24	4	4	0	GFLV
IR-GFLV	2	4	1	3	GFLV
IR-GFLV	3	7	7	0	GFLV
IR-GFLV	7	4	4	0	GFLV
IR-GFLV	8	4	0	4	GFLV
IR-GFLV	9	5	5	0	GFLV
IR-GFLV	10	2	1	1	GFLV
IR-GFLV	16	1	1	0	GFLV
IR-GFLV	17	6	5	1	GFLV
IR-GFLV	21	5	0	5	GFLV
IR-RpRSV	1	4	4	0	RpRsVg
IR-RpRSV	2	13	13	0	RpRsVg
IR-RpRSV	3	6	6	0	RpRsVg
IR-RpRSV	4	8	8	0	RpRsVg
IR-RpRSV	5	10	10	0	RpRsVg
IR-Nepo	12	6	6	0	GFLV
		2	2	0	RpRsVg
IR-Nepo	16	7	7	0	GFLV
IR-Nepo	13 *	13	9	4	GFLV
		13	13	0	ArMV
		20	20	0	RpRsVg

Ergebnisse

Konstrukt	Transformant/ Linie #	Pflanzen inokuliert (n)	ELISA (14dpi)		Inokuliertes Virus
			pos	neg	
IR-Nepo	14 *	12	7	5	GFLV
		13	13	0	ArMV
		9	8	1	RpRSVg
IR-Nepo	15 *	13	10	3	GFLV
		13	13	0	ArMV
		16	16	0	RpRSVg
-	WT	20	19	1	GFLV
-	WT	10	10	0	ArMV
-	WT	10	10	0	RpRSVg

* Transgene Pflanzen aus T1-Generation.

Für anschließende Untersuchungen wurden jeweils 6 Transformanten mit den Konstrukten DI-, Δ DI- und IR-GFLV ausgewählt und weiterhin in *in vitro*-Kultur erhalten. Bei Pflanzen mit dem IR-Nepo-Konstrukt wurden 10 Linien, und bei IR-RpRSVg wurden 5 Transformanten weiterkultiviert. Außerdem wurden von allen fruchtbaren Pflanzen Samen gewonnen.

3.2.1.3 Nachweis von mRNA durch RT-PCR

Zur Überprüfung der Transkription transgener mRNA wurde die Virussequenz der Konstrukte durch RT-PCR nachgewiesen (Abb. 7). Bei den Pflanzen DI2.4 und DI2.18 konnte keine mRNA nachgewiesen werden, während DI2.6 und DI2.17 schwache Banden zeigten (A). Deutliche Amplifikation war bei DI2.8 und DI2.19 festzustellen (A). In allen Pflanzen mit Δ DI2-Konstrukt war mRNA des Transgens nachweisbar (B). Proben von IR-GFLV8, 14 und 17 ergaben spezifische Banden des Transgens, während bei IR-GFLV2, 10 und 21 keine Amplifikate zu finden waren (C). Bei allen Pflanzen mit IR-RpRSV-Konstrukt konnte mRNA des Transgens detektiert werden (D). Die 3 verschiedenen virusabgeleiteten Sequenzen des IR-Nepo-Konstrukts wurden in jeder Linie über RT-PCR amplifiziert (E).

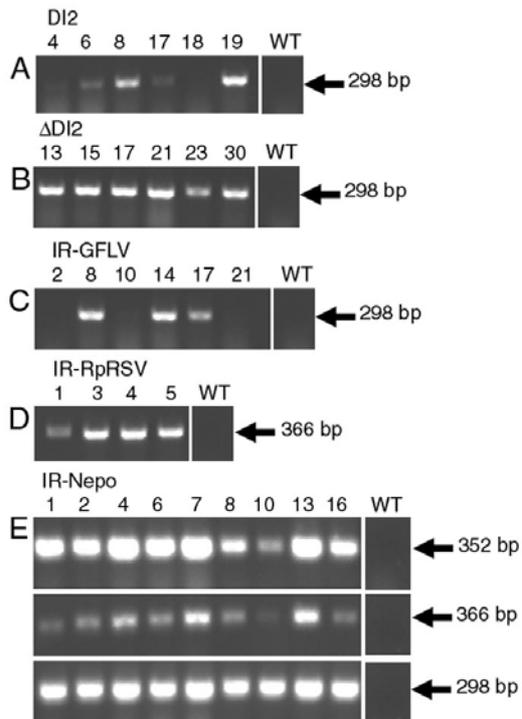


Abb. 7: Nachweis von mRNA durch RT-PCR in *N. benthamiana*. Transgene Pflanzen mit DI- (A, B) und IR-Konstrukten (C, D, E). Transgenspezifische Amplifikate für GFLV-MPc (298 bp), RpRSV-NCR (366 bp) und ArMV-MPc (352 bp). Nummerierung der „lanes“ entspricht # des Primär-Transformanten.

3.2.1.4 Nachweis transgenspezifischer siRNA

Transgene Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur wurden auf Akkumulation von transgenspezifischer „small interfering“ (si)RNA untersucht. Die Detektion von siRNA erfolgte über „low molecular weight“ (LMW) Northern Blot (Abb. 8). Transgene siRNA, induziert durch das DI2-Konstrukt, wurde nur bei DI2.4 nachgewiesen (A). Bei zwei unabhängigen Transformanten (#13, #30) mit dem Δ DI2-Konstrukt konnte siRNA detektiert werden, wobei die Linie Δ DI2.13 nur eine sehr schwache Bande aufwies (B). Unter den IR-GFLV-Pflanzen war lediglich bei IR-GFLV21 eine Akkumulation transgener siRNA zu finden (C). Die Linien IR-RpRSV3 und 4 akkumulierten ebenfalls transgenspezifische siRNA (D). Bei Pflanzen mit dem IR-Nepo-Konstrukt zeigten die Linien #1, #4, #8, #10 und #13 Banden für die Sequenz von GFLV-MPc (E). Darüber hinaus war bei den Linien #4, #10 und #13 zusätzlich siRNA spezifisch für die RpRSV-Sequenz detektierbar (E).

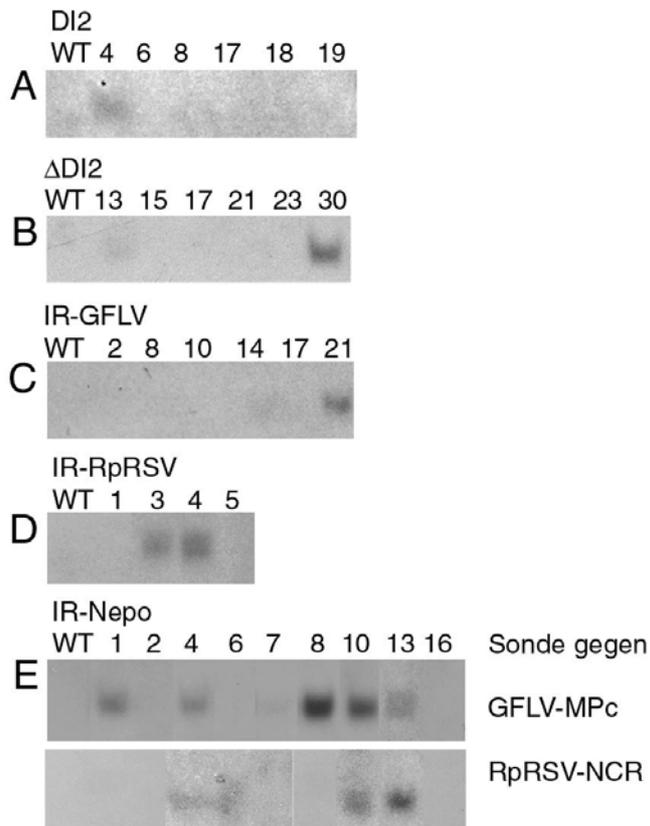


Abb. 8: Detektion transgener siRNA mit LMW Northern Blot. Hybridisierung mit Sonden spezifisch für GFLV-MPc in DI2-, ΔDI2- und IR-GFLV-Linien (A-C) und RpRSV-NCR in IR-RpRSV-Linien (D). Bei IR-Nepo-Linien erfolgte Hybridisierung mit GFLV-MPc- und RpRSV-NCR-spezifischen Sonden (E). Nummerierung der „lanes“ entspricht # des Primär-Transformanten.

3.2.2 Agrobakterien-Infiltration mit GFP-Expressionsmodell

Zur Überprüfung der Effizienz von PTGS in den verschiedenen transgenen *N. benthamiana* wurden in Anlehnung an Johansen & Carrington (2001) und Voinnet *et al.* (2003) die virus-abgeleiteten Sequenzen der Konstrukte mit „green fluorescent protein“ (GFP) kombiniert und in einen binären Vektor zur Agrobakterien-Infiltration kloniert (vergl. 2.3.2). Wie in Abb. 9 dargestellt führt etabliertes PTGS durch siRNA des Transgens über RISC („RNA induced silencing complex“) zur Inaktivierung der homologen Virussequenz des infiltrierten Konstrukts, wodurch die Translation von GFP verhindert wird. Im Falle von „transitive silencing“ dient die RNA des infiltrierten Sensoronstrukts als Matrize für eine endogene „RNA-directed RNA-polymerase“ (RDR), die auch von 3'- in 5'-Richtung dsRNA synthetisieren kann. Diese dsRNA wird durch „Dicer“ in sekundäre siRNA gespalten

(Hannon *et al.*, 2003, Wassenegger & Krczal, 2006). Hierbei entsteht neben siRNA der virusabgeleiteten Sequenz auch siRNA der benachbarten GFP-Sequenz, die GFP-mRNA direkt erkennt und die spezifische Spaltung durch RISC bewirkt. Die GFP-Sequenz wird dadurch sekundär zum Ziel von PTGS.

PTGS am Expressionsmodell mit GFP-Sensorkonstrukt

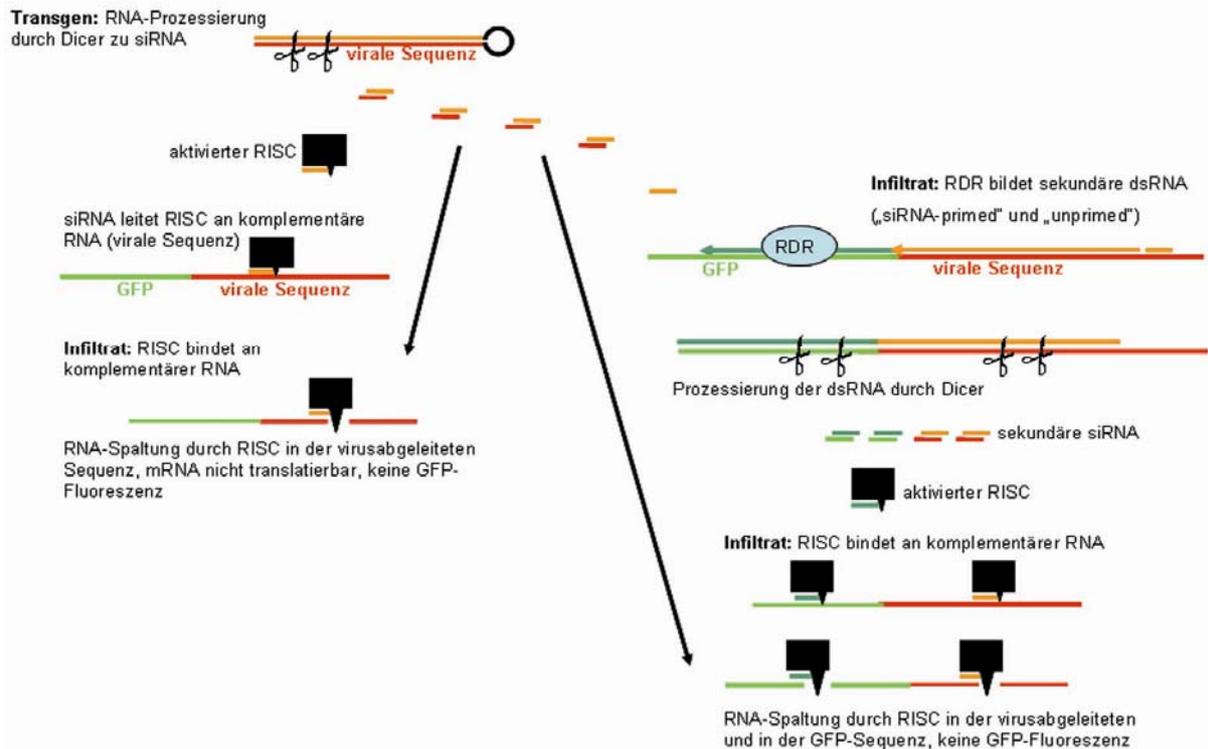
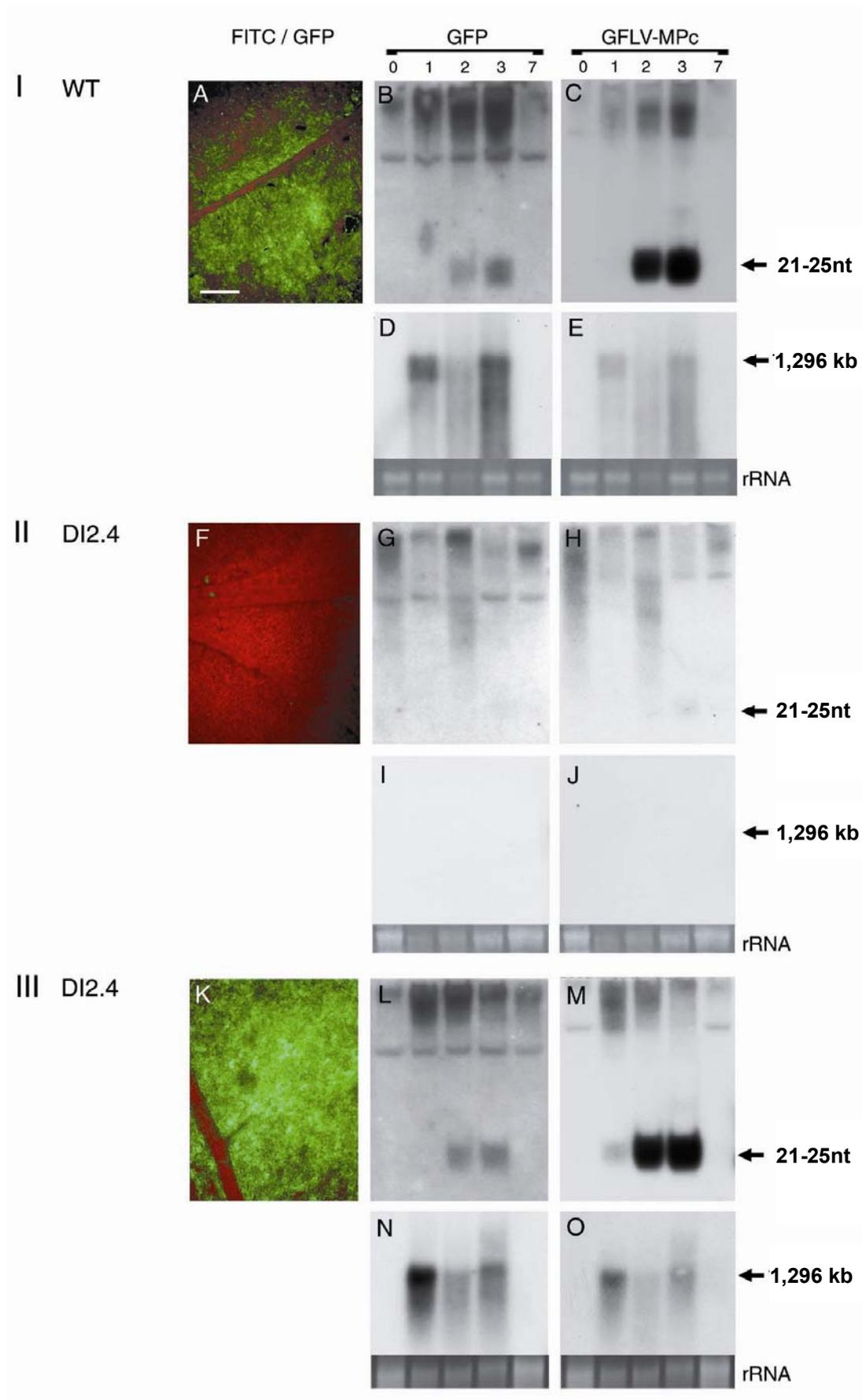


Abb. 9: Schematische Darstellung zum „silencing“ des infiltrierten GFP-Sensorkonstrukts in transgenen Pflanzen. GFP: “green fluorescent protein”, RISC: “RNA-induced silencing complex”, siRNA: “small interfering RNA”, RDR: “RNA directed RNA polymerase”, dsRNA: “double stranded RNA”.

Bei Pflanzen, die nach der Agrobakterien-Infiltration mit dem Sensorkonstrukt GFP exprimierten, war eine deutliche GFP-spezifische Fluoreszenz ab dem 2. Tag nach der Infiltration festzustellen. In Abb. 10 bis 13 sind infiltrierte Blätter von Pflanzen verschiedener transgener Linien mit unterschiedlicher GFP-Expression dargestellt. Bei *N. benthamiana* WT (I) und der Pflanze III-DI2.4 (A, K) war GFP-Fluoreszenz im mit GFP-GFLV-MPc infiltrierten Blatt zu sehen, während die Pflanze II-DI2.4 (F) keine Fluoreszenz zeigte. Gleichzeitig war bei den GFP-exprimierenden Pflanzen siRNA von GFP (B, L) und GFLV-MPc (C, M) ab Tag 2 nach der Infiltration im infiltrierten Blatt festzustellen. Die mRNA des infiltrierten Konstrukts mit 1296 bp konnte 1 Tag nach der Infiltration



nachgewiesen werden (GFP: D, N; GFLV-MPc: E, O). An den folgenden 2 Tagen war eine zunehmende Degradation der mRNA und parallel hierzu eine Anreicherung von siRNA erkennbar. Weder mRNA, noch siRNA des Infiltrats konnte 7 Tage nach der Infiltration detektiert werden. Bei Pflanze II-DI2.4 war keine siRNA (G, H) bzw. mRNA (I, J) des Infiltrats nachweisbar.

In Abb. 11 sind GFP-GFLV-MPc-infiltrierte Transformanten der Linie Δ DI2.23 ohne (I, A) und mit GFP-Expression (II, F) gezeigt. Bei GFP-Expression (II- Δ DI2.23) war bereits 1 Tag nach der Infiltration mRNA (I, J) des Infiltrats nachzuweisen, am 2. und 3. Tag nach der Infiltration auch siRNA von GFP (G) und GFLV-MPc (H). Linie I- Δ DI2.23 zeigte weder spezifische siRNA (B, C), noch mRNA von 1296 bp des Infiltrats (D, E). In beiden Δ DI2.23-Pflanzen wurde eine GFLV-MPc-spezifische Bande detektiert, die der Größe des Transgens von 718 bp entspricht (E, J).

In Abb. 12 sind GFP-ArMV-MPc-infiltrierte Pflanzen aus der T1-Generation der Linie IR-Nepo13 dargestellt. Bei den GFP-exprimierenden Pflanzen I-WT (A) und III-IR-Nepo13 (G) war siRNA von GFP (B, H) und ArMV-MPc (C, I) nachzuweisen. Die Akkumulation von siRNA wurde bei infiltrierte Blättern 2 sowie 3 Tage nach der Infiltration festgestellt. Die Pflanze II-IR-Nepo13 zeigte keine GFP-Expression (D), weder GFP-, noch ArMV-MPc-spezifische siRNA wurde festgestellt (E; F).

T0-Pflanzen der Linie IR-RpRSV3 wurden mit GFP-RpRSV-NCR infiltrierte und sind in Abb. 13 veranschaulicht. Hier zeigten I-WT (A) und III-IR-RpRSV3 (G) GFP-Expression sowie GFP- (B, H) und RpRSV-NCR-spezifische siRNA (C, I). Obwohl bei Pflanze II-IR-RpRSV3 keine GFP-Fluoreszenz (D) zu sehen war, wurde GFP- (E) und RpRSV-NCR-spezifische siRNA (F) detektiert. Dies war im Infiltrationsexperiment der einzige Fall, in dem siRNA auch bei fehlender GFP-Fluoreszenz detektiert wurde. Sowohl bei transgenen Pflanzen aus der T0-Generation (Abb. 10, 11, 13), als auch aus der T1-Generation

←

Abb. 10: Agrobakterien-Infiltration mit GFP-GFLV-MPc bei DI2.4 (T0). Zusammengesetzte Aufnahmen der Blattunterseite (A, F, K) mit FITC- und GFP-Filter. Nachweis von GFP-siRNA (B, G, L) und GFLV-MPc-siRNA (C, H, M). Nachweis von mRNA mit GFP- (D, I, N) und GFLV-MPc-spezifischer Sonde (E, J, O), rRNA: Ladekontrolle mit EtBr angefärbt. Nummerierung der „lanes“ bezeichnet Tage nach der Infiltration (dpi). Maßstab 2 mm.

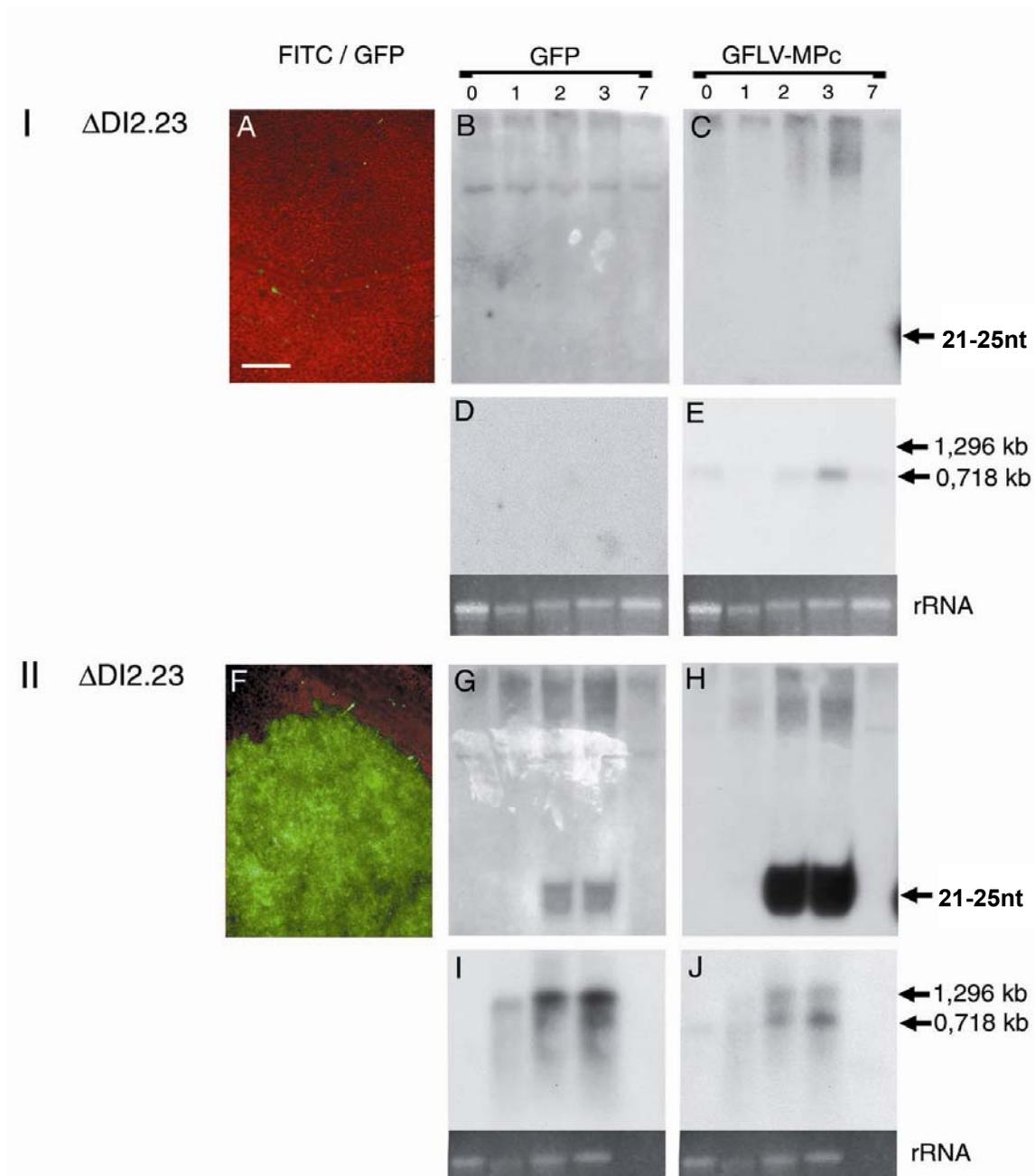


Abb. 11: Agrobakterien-Infiltration mit GFP-GFLV-MPc bei Δ DI2.23 (T0). Zusammengesetzte Aufnahmen der Blattunterseite (A, F) mit FITC- und GFP-Filter. Nachweis von GFP-siRNA (B, G) und GFLV-MPc-siRNA (C, H). Nachweis von mRNA mit GFP- (D, I) und GFLV-MPc-spezifischer Sonde (E, J), rRNA: Ladekontrolle mit EtBr angefärbt. Nummerierung der „lanes“ bezeichnet Tage nach der Infiltration (dpi). Maßstab 2 mm.

(Abb. 12) war innerhalb einer Linie die GFP-Expression durch Agrobakterien-Infiltration des Sensorkonstrukts unterschiedlich ausgeprägt.

Bei allen Pflanzen, die GFP-Fluoreszenz aufwiesen, konnte GFP-spezifische siRNA und siRNA aus der virusabgeleiteten Sequenz ab dem 2. Tag nach der Infiltration detektiert werden. siRNA der Virussequenz des Konstrukts ergab hierbei ein stärkeres Signal als GFP-spezifische siRNA. Infiltrierte transgene Pflanzen ohne GFP-Fluoreszenz akkumulierten keine GFP- bzw. virussequenz-spezifische siRNA, mit Ausnahme der Pflanze II-IR-RpRSV-3 (Abb. 13). Die mRNA des infiltrierten GFP-Sensorkonstrukts war ab Tag 1 nach der Infiltration nachzuweisen und wurde in den folgenden Tagen abgebaut. In Transformanten von Δ DI2.23 (Abb. 11) wurde außerdem mRNA des Transgens detektiert.

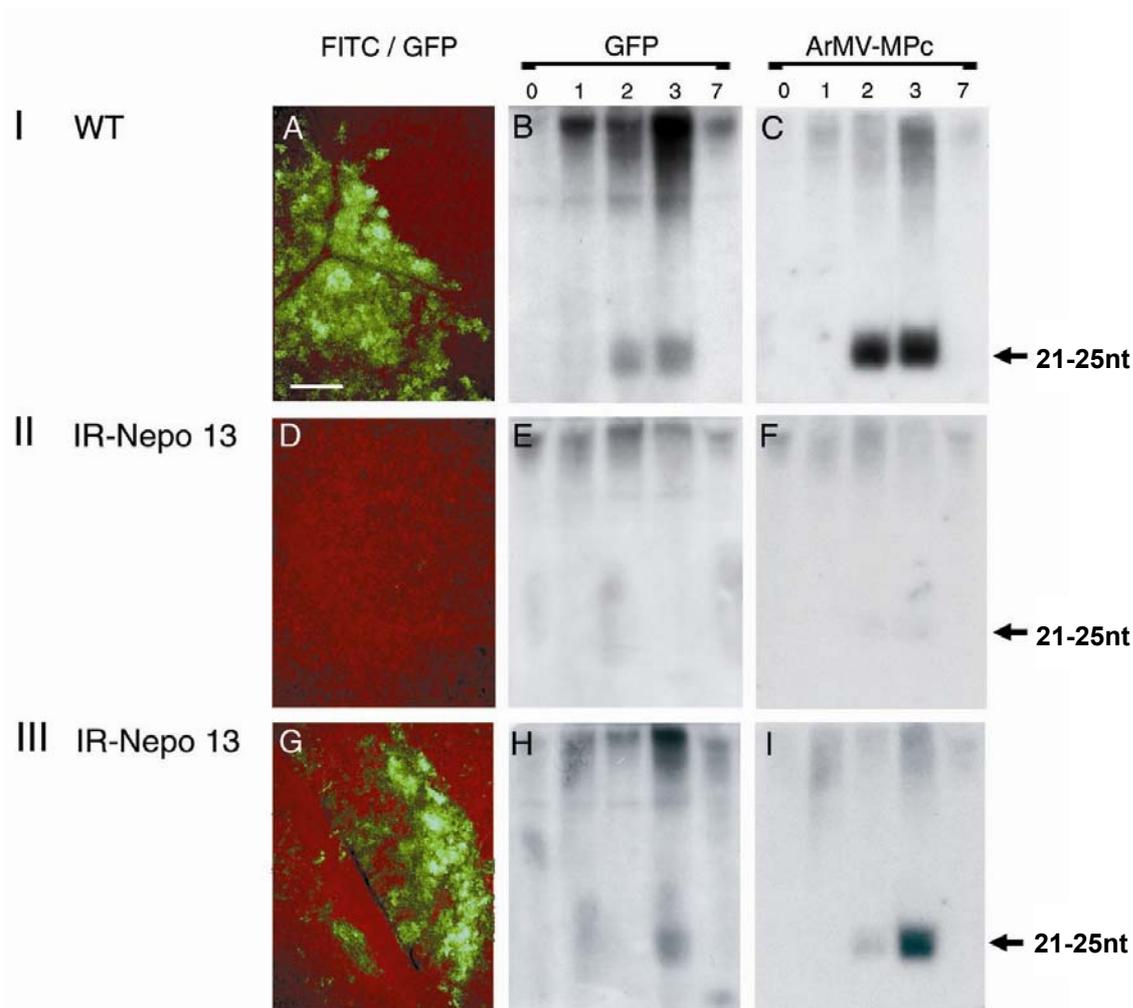


Abb. 12: Agrobakterien-Infiltration mit GFP-ArMV-MPc an Linie IR-Nepo13 (T1). Zusammengesetzte Aufnahmen der Blattunterseite (A, D, G) mit FITC- und GFP-Filter. Nachweis von GFP-siRNA (B, E, H) und ArMV-MPc-siRNA (C, F, I). Nummerierung der „lanes“ bezeichnet Tage nach der Infiltration (dpi). Maßstab 2 mm.

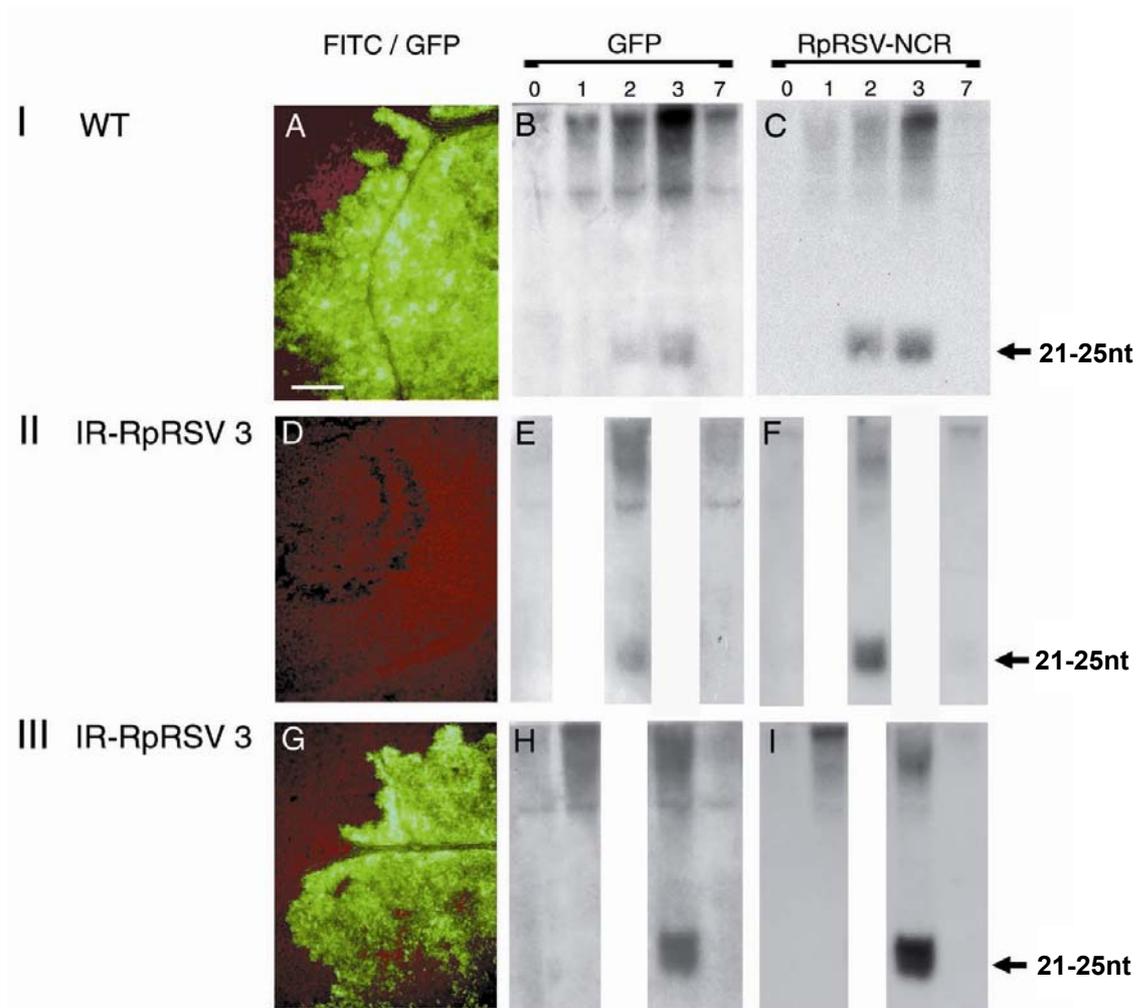


Abb. 13: Agrobakterien-Infiltration mit GFP-RpRSV-NCR bei IR-RpRSV3 (T0). Zusammengesetzte Aufnahmen der Blattunterseite (A, D, G) mit FITC- und GFP-Filter. Nachweis von GFP-siRNA (B, E, H) und RpRSV-NCR-siRNA (C, F, I). Nummerierung der „lanes“ bezeichnet Tage nach der Infiltration (dpi). Maßstab 2 mm.

3.2.3 Agrobakterien-Infiltration und Challenge-Inokulation

Die Gesamtübersicht der Ergebnisse aus dem Experiment mit Virusinokulation und Agrobakterien-Infiltration sind der Tab. 14 im Anhang zu entnehmen. Um die festgestellte Variabilität zu zeigen, sind einzelne Pflanzen aus diesem Versuchsansatz beispielhaft in Abb. 14 bis 17 dargestellt, die Zahl in Klammern entspricht der Pflanzen-Nr. aus Tab. 14.

Zur Klärung, inwieweit das „silencing“ des GFP-Sensorkonstrukts mit Virusresistenz korreliert, wurden T1-Pflanzen verschiedener transgener Linien bei 26°C kultiviert, mit dem

entsprechenden Virus inokuliert und nach 14 Tagen mittels ELISA auf Virusinfektion getestet. Daraufhin folgte eine Agrobakterien-Infiltration mit dem entsprechenden GFP-Sensorkonstrukt und zusätzlich eine Co-Infiltration des GFP-Sensorkonstrukts mit dem viralen Suppressor p19, dessen Sequenz ebenfalls in einen binären Vektor inseriert war.

Durch den Suppressor p19 wird siRNA gebunden und PTGS inhibiert, wodurch auch Pflanzen mit etabliertem PTGS GFP-Fluoreszenz im co-infiltrierten Bereich zeigen sollen. Hiermit lässt sich nachweisen, dass GFP-Expression tatsächlich durch etabliertes PTGS verhindert wurde und keine methodischen Fehler bei der Infiltration für die Nicht-GFP-Expression verantwortlich waren.

Mit einer virus-spezifischen Sonde, die nicht an RNA des Transgens bindet, wurde virale von transgener RNA unterschieden. Für den Nachweis viraler RNA von GFLV und ArMV wurde eine Sonde spezifisch für die Sequenz des „coat protein“ (CP) gewählt. Der Nachweis viraler RNA von RpRSV erfolgte mit einer Sonde für einen Sequenzabschnitt aus dem Genombereich a2/MP. Diese Sequenzen sind nicht im Transgen enthalten, und detektierte RNA basiert somit auf viralem Ursprung.

Es wurden in diesem Experiment 112 transgene Pflanzen untersucht (Tab. 14 im Anhang). Insgesamt waren 70% der Pflanzen aus der T1-Generation, die unterschiedliche Konstrukte enthielten, im Inokulationsexperiment virusresistent. Bei der Mehrheit dieser virusresistenten Pflanzen konnte nach der Agrobakterien-Infiltration mit dem GFP-Sensorkonstrukt keine oder nur schwache GFP-Fluoreszenz festgestellt werden. Etwa 30% der virusresistenten Pflanzen exprimierten hingegen deutlich GFP. Umgekehrt war bei virusinfizierten transgenen Pflanzen, außer in 5 Fällen, GFP-Fluoreszenz nach der Agrobakterien-Infiltration nachweisbar. In der Regel war die GFP-Fluoreszenz hier stärker ausgeprägt als bei GFP-fluoreszierenden virusresistenten Pflanzen. Im Experiment waren alle *N. benthamiana* WT virusanfällig und zeigten GFP-Fluoreszenz.

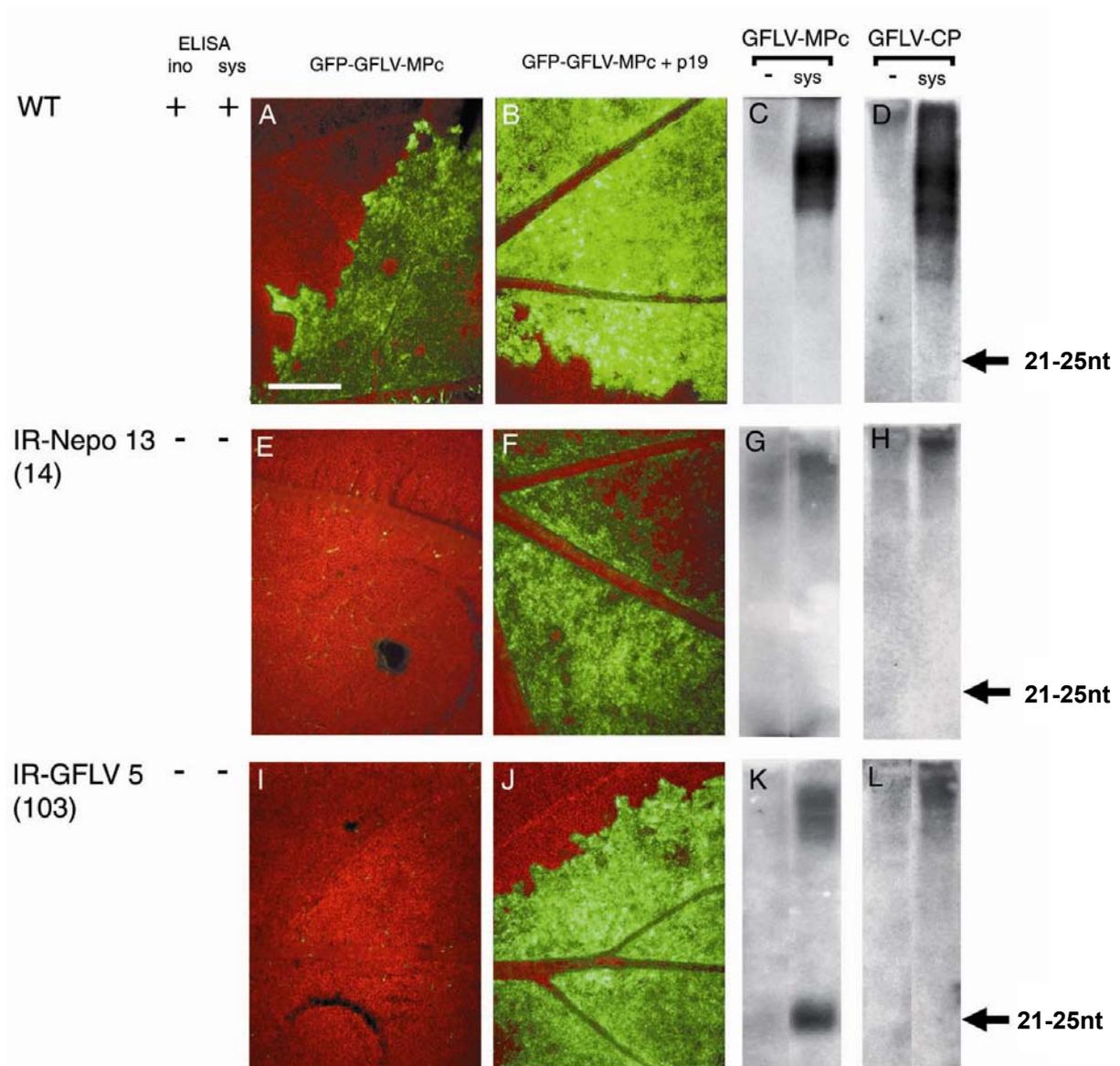


Abb. 14: Challenge-Inokulation (GFLV) und Agrobakterien-Infiltration bei transgenen T1-Pflanzen mit IR-Nepo- und IR-GFLV-Konstrukt. Infiltration mit GFP-GFLV-MPc (A, E, I) und GFP-GFLV-MPc + p19-Konstrukt (B, F, J). Zusammengesetzte Aufnahmen der Blattunterseite (A, B, E, F, I, J) mit FITC- und GFP-Filter 3dpi. LMW Northern Blot mit GFLV-MPc spezifischer Sonde (C, G, K) und GFLV-CP spezifischer Sonde (D, H, L). ELISA 14dpi, (ino) inokuliertes Blatt, (sys) systemisches apikales Blatt, (-) Blattprobe vor Inokulation. Maßstab 2 mm.

Die transgenen Pflanzen (14, 103) aus der T1-Generation in Abb. 14 wurden mit GFLV inokuliert und zeigten beim ELISA-Test (14dpi) keine Virusinfektion, während bei *N. benthamiana* WT Virus detektiert wurde. Virale siRNA konnte beim Wildtyp nicht festgestellt werden (C, D). Bei der virusresistenten Pflanze IR-Nepo13(14) konnte keine transgen- oder virusspezifische siRNA detektiert werden (G, H). Mit der GFLV-MPc-Sonde

wurde bei IR-GFLV-5(103) siRNA nachgewiesen (K), virusspezifische siRNA des CP wurde jedoch nicht gefunden (L). Im oberen Abschnitt der „lanes“ mit Proben von apikalen (= systemischen, sys) Blättern war beim Wildtyp virale mRNA nachweisbar (C, D). Obwohl IR-GFLV5(103) im ELISA-Test virusnegativ war, konnte virale mRNA detektiert werden (K, L). Bei beiden resistenten Pflanzen (E, I) war im Gegensatz zum Wildtyp (A) keine GFP-Fluoreszenz nach der Agrobakterien-Infiltration mit GFP-GFLV-MPc zu finden. Durch Inhibition von PTGS über Co-Infiltration des GFP-Sensorkonstrukts mit p19-Konstrukt zeigten alle Pflanzen GFP-Expression (B, F, J).

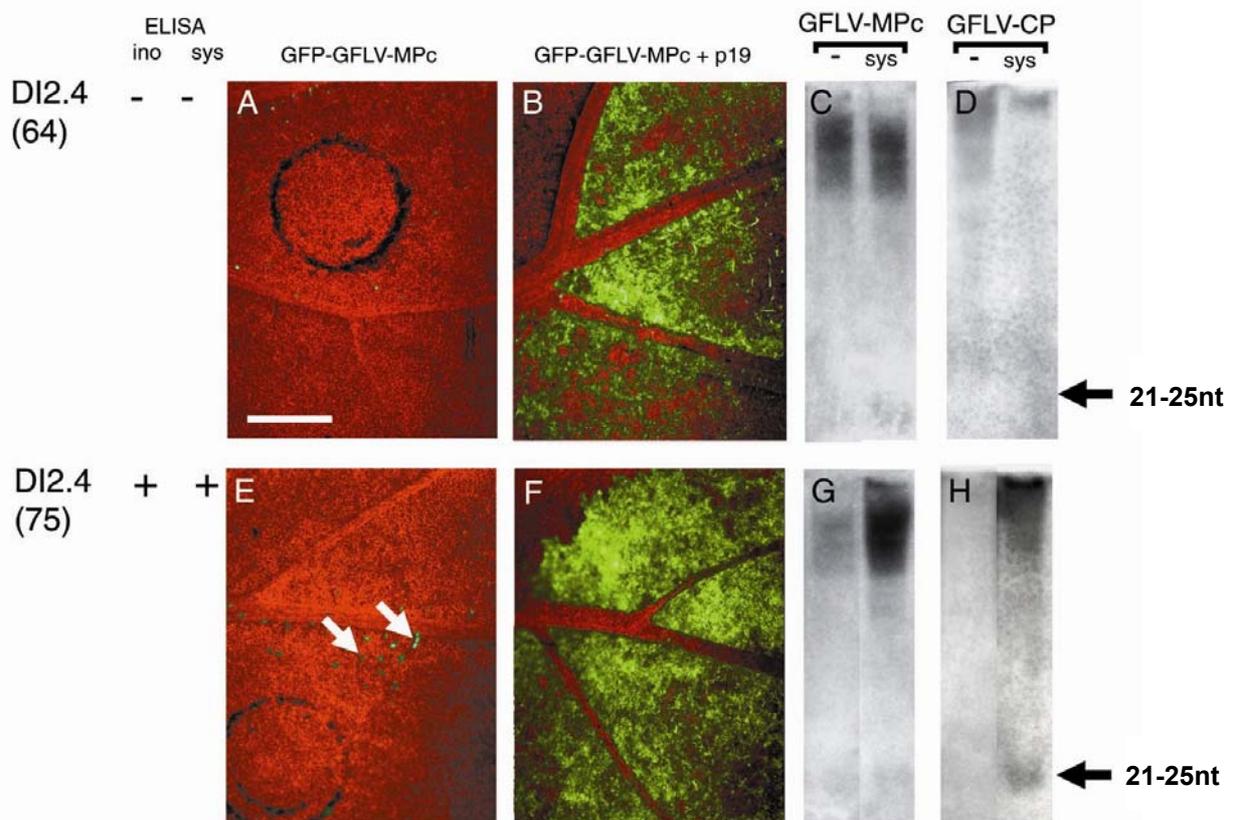


Abb. 15: Challenge-Inokulation (GFLV) und Agrobakterien-Infiltration von transgenen T1-Pflanzen (DI-Konstrukt). Infiltration mit GFP-GFLV-MPc (A, E) und GFP-GFLV-MPc + p19-Konstrukt (B, F). Unspezifische Autofluoreszenz von Trichomen (E, Pfeile). Zusammengesetzte Aufnahmen der Blattunterseite (A, B, E, F) mit FITC- und GFP-Filter 3dpi. LMW Northern Blot mit GFLV-MPc spezifischer Sonde (C, G) und GFLV-CP spezifischer Sonde (D, H). ELISA 14dpi, (ino) inokuliertes Blatt, (sys) systemisches apikales Blatt, (-) Blattprobe vor Inokulation. Maßstab 2 mm.

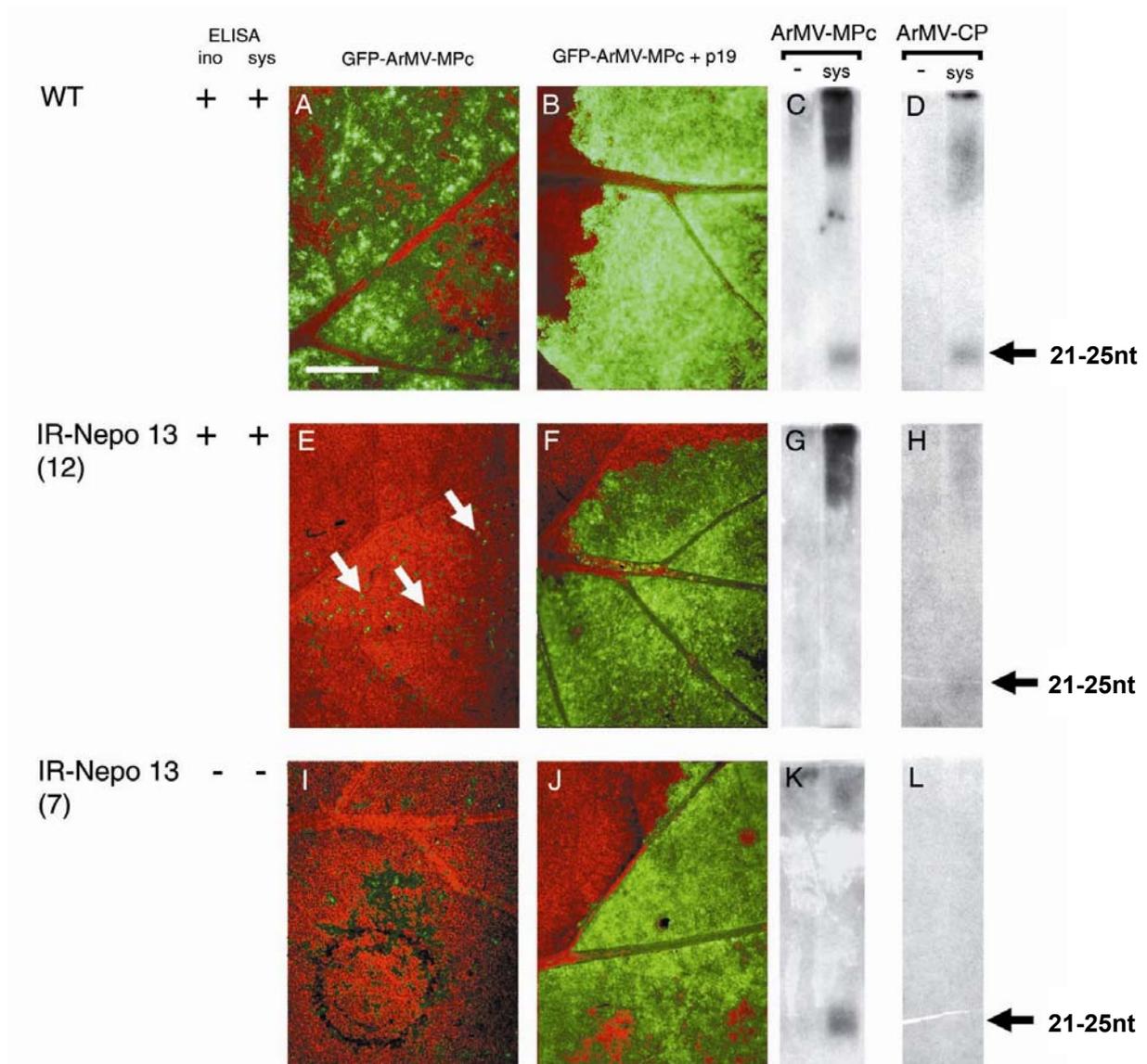


Abb. 16: Challenge-Inokulation (ArMV) und Agrobakterien-Infiltration bei transgenen T1-Pflanzen mit IR-Nepo-Konstrukt. Infiltration mit GFP-ArMV-MPc (A, E, I) und GFP-ArMV-MPc + p19-Konstrukt (B, F, J). Unspezifische Autofluoreszenz von Trichomen (E, Pfeile). Zusammengesetzte Aufnahmen der Blattunterseite (A, B, E, F, I, J) mit FITC- und GFP-Filter 3dpi. LMW Northern Blot mit ArMV-MPc spezifischer Sonde (C, G, K) und ArMV-CP spezifischer Sonde (D, H, L). ELISA 14dpi, (ino) inokuliertes Blatt, (sys) systemisches apikales Blatt, (-) Blattprobe vor Inokulation. Maßstab 2 mm.

In Abb. 15 sind 2 Pflanzen aus der T1-Generation der Linie DI2.4 gezeigt. Nach der Inokulation mit GFLV sowie ELISA-Test nach 14 Tagen war DI2.4(75) infiziert, bei DI2.4(64) konnte hingegen kein Virus nachgewiesen werden. Im Northern Blot war siRNA bei DI2.4(75) mit der virusspezifischen GFLV-CP-Sonde nachweisbar (H). DI2.4(64) zeigte keine Bande in Höhe der siRNA (C, D). In der virusinfizierten Pflanze DI2.4(75) wurde virale mRNA in den Proben apikaler Blätter detektiert (G, H). Keine der beiden Pflanzen zeigte

GFP-Fluoreszenz nach Agrobakterien-Infiltration mit GFP-GFLV-MPc (A, E). Nach Co-Infiltration mit GFP-Sensorkonstrukt und p19-Konstrukt exprimierten beide Pflanzen im infiltrierten Bereich GFP (B, F). Das geringfügige und punktuelle Signal bei E beruht auf Autofluoreszenz von Trichomen (Pfeile).

Nach der Inokulation mit ArMV waren *N. benthamiana* WT und IR-Nepo13(12) im ELISA nach 14 Tagen positiv, die Pflanze IR-Nepo13(7) negativ (Abb. 16). siRNA der MPc- und CP-spezifischen Sequenz konnte beim Wildtyp nachgewiesen werden (C, D). IR-Nepo13(12) zeigte eine schwache Bande mit der GFLV-CP-Sonde (H), während bei der resistenten Pflanze IR-Nepo13(7) siRNA mit der GFLV-MPc-Sonde detektiert wurde (K). Bei den virusinfizierten Pflanzen wurde mit der ArMV-MPc-Sonde virale mRNA in Proben apikaler Blätter detektiert (C, G). Nach der Agrobakterien-Infiltration mit GFP-ArMV-MPc zeigte der Wildtyp eine deutliche (A), die virusresistente Pflanze IR-Nepo13(7) hingegen nur eine schwache GFP-Fluoreszenz (I). Bei der virusinfizierten Pflanze IR-Nepo13(12) dagegen war keine GFP-Fluoreszenz zu finden (E), die punktuelle Fluoreszenz beruhte auf dem unspezifischen Signal von Trichomen (Pfeile). Co-Infiltration von GFP-Sensorkonstrukt und p19-Konstrukt bewirkte in allen Pflanzen eine starke GFP-Expression (B, F, J).

T1-Pflanzen der Linie IR-RpRSV3 wurden mit RpRSVg inokuliert und nach 14 Tagen mittels ELISA getestet (Abb. 17). *N. benthamiana* WT und IR-RpRSV3(115) waren im ELISA-Test positiv, in der Pflanze IR-RpRSV3(113) konnte dagegen keine Infektion nachgewiesen werden. Mit der RpRSV-NCR-spezifischen Sonde wurde bei beiden transgenen Pflanzen siRNA detektiert (G, K). Bei der resistenten Pflanze IR-RpRSV3(113) waren siRNA des Transgens auch in der Blattprobe vor der Inokulation zu finden (K, -). In virusinfizierten Pflanzen wurde virale mRNA in den Proben apikaler Blätter detektiert (C, D, G, H). Die virusinfizierten Pflanzen exprimierten nach der Agrobakterien-Infiltration mit GFP-RpRSV-NCR deutlich GFP (A, E), während bei der resistenten IR-RpRSV3(113) keine Fluoreszenz zu sehen war (I). Nach Co-Infiltration mit dem GFP-Sensorkonstrukt und dem p19-Konstrukt war GFP-Fluoreszenz in allen Pflanzen nachzuweisen (B, F, J).

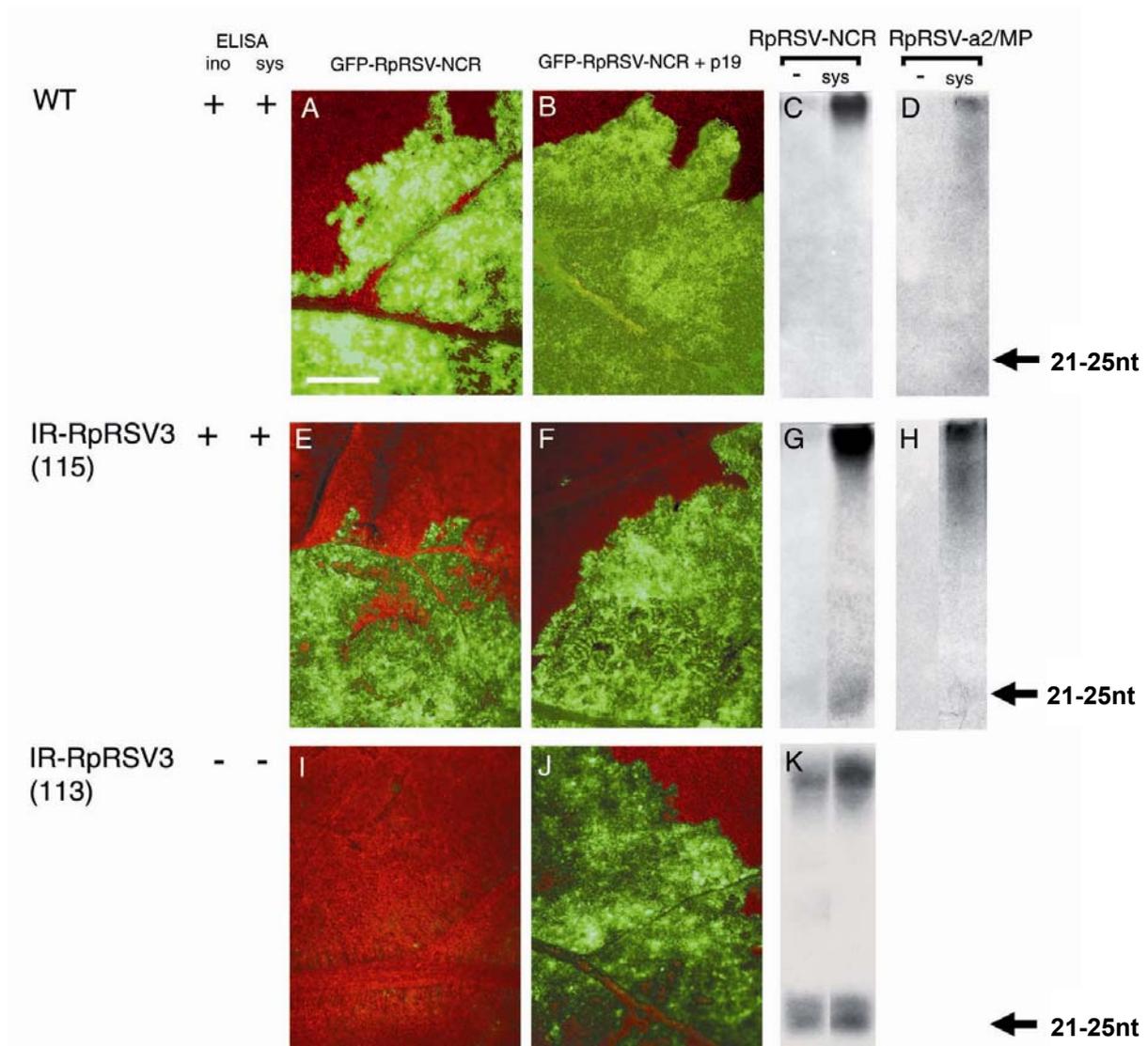


Abb. 17: Challenge-Inokulation (RpRSV) und Agrobakterien-Infiltration bei transgenen T1-Pflanzen mit IR-RpRSV-Konstrukt. Infiltration mit GFP-RpRSV-NCR (A, E, I) und GFP-RpRSV-NCR + p19-Konstrukt (B, F, J). Zusammengesetzte Aufnahmen der Blattunterseite (A, B, E, F, I, J) mit FITC- und GFP-Filter 3dpi. LMW Northern Blot mit RpRSV-NCR-spezifischer Sonde (C, G, K) und RpRSV-a2/MP-spezifischer Sonde (D, H). ELISA 14dpi, (ino) inokuliertes Blatt, (sys) systemisches apikales Blatt, (-) Blattprobe vor Inokulation. Maßstab 2 mm.

Während bei *N. benthamiana* WT nach Agrobakterien-Infiltration mit dem entsprechenden GFP-Sensorkonstrukt GFP-Fluoreszenz zu sehen war, zeigten virusresistente Pflanzen keine oder nur geringfügige Fluoreszenz (Abb. 14-17). Es gab jedoch auch virusinfizierte Pflanzen, bei denen ebenfalls keine GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte (Abb. 15, 16). Eine Co-Infiltration des GFP-Sensorkonstrukts mit dem Konstrukt des Suppressors p19 bewirkte in allen Fällen GFP-Fluoreszenz (Abb. 14-17). Der Nachweis von siRNA war nicht auf

virusresistente Pflanzen beschränkt, auch nicht-resistente Pflanzen akkumulierten in einigen Fällen siRNA: DI2.4(75) (Abb. 15, GFLV-infiziert), WT und IR-Nepo13(12) (Abb. 16, ArMV-infiziert) und IR-RpRSV3(115) (Abb. 17, RpRSVg-infiziert). Darüber hinaus konnte bei einigen virusresistenten Pflanzen keine siRNA detektiert werden (Abb. 14, 15). Virale mRNA konnte bei allen ELISA-positiven Pflanzen im Northern Blot nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte eine ELISA-negative transgene Pflanze eine Akkumulation viraler mRNA im Northern Blot (Abb. 14).

3.2.4 Bestimmung der Kopienzahl des Transgens mittels Southern Blot

Die DNA zur Southern Blot-Analyse stammt von ausgewählten, mittels Virusinokulation und Agrobakterien-Infiltration untersuchten Pflanzen der T1-Generation. Extrahierte GesamtdNA aus Blattproben wurde mit EcoR V inkubiert. Dieses Enzym schneidet im Bereich des 35S-Promotors einmal im Transgen. Durch die Wahl einer entsprechenden Sonde, die die GFLV-MPc-Sequenz nach der Restriktionsstelle erkennt, wird eine Bande pro Insertion im Genom erwartet.

Als Repräsentanten wurde von den Linien DI2.4 und IR-Nepo13 jeweils eine resistente und eine virusanfällige Pflanze untersucht (Abb. 18 A). Bei der virusinfizierten Pflanze IR-Nepo13(12) konnte nach einer Restriktion mit EcoR V 1 transgenspezifische Bande detektiert werden (Pfeil), während die virusinfizierte Pflanze DI2.4(75) 2 Banden aufwies (Pfeile). Der Southernblot der virusresistenten Pflanzen DI2.4(64) und IR-Nepo13(7) zeigte nach Restriktion der DNA durch EcoR V jeweils 2 transgenspezifische Banden (Pfeile).

Durch die Restriktion mit Hind III wurde das Konstrukt aus dem Pflanzengenom ausgeschnitten (Abb. 18 B). Bei den Pflanzen der Linie IR-Nepo13 konnte daraufhin 1 Bande in der Größe des Transgens (3,8 kb) nachgewiesen werden (Pfeile). In *N. benthamiana* WT waren nach den Restriktionen keine Banden nachweisbar.

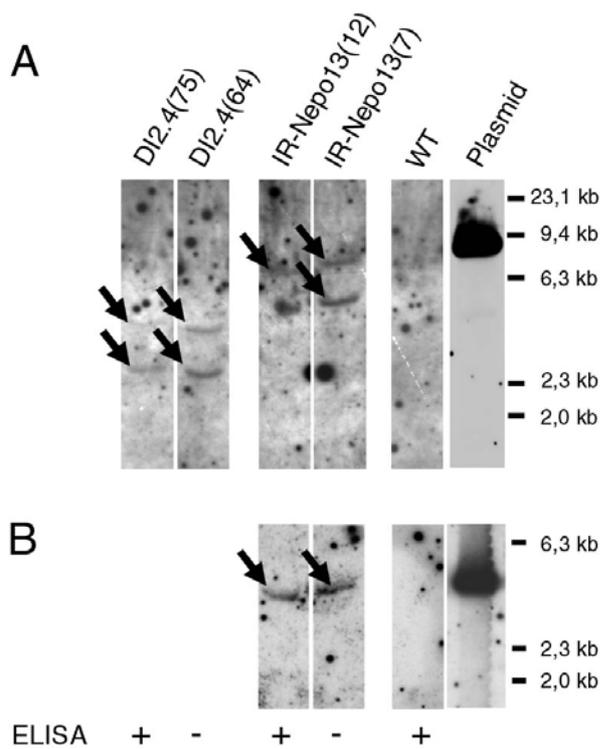


Abb. 18: Nachweis des Transgens im Pflanzengenom. 15 µg Gesamt-DNA aus Blattproben transgener T1-Pflanzen. Transgennachweis mit spezifischer Sonde für die GFLV-MPc-Sequenz. (A) Restriktion mit EcoR V zur Ermittlung der Kopienzahl, Plasmid: Δ DI2-GFLV-MPc mit 9,3 kb Größe. (B) Restriktion mit Hind III ergibt für das IR-Nepo-Konstrukt ein Fragment mit der Größe von 3,8 kb, Plasmid: IR-Nepo mit 11,7 kb Größe. Nachweis der Virusinfektion mittels ELISA (14 dpi).

3.3 Transgene Reben

3.3.1 Molekulargenetische Charakterisierung

3.3.1.1 Nachweis der Transgenität

Zur Transformation von Reben wurden dieselben Konstrukte wie zuvor bei *N. benthamiana* verwendet, zusätzlich stand ein GFLV-MPd-Konstrukt (1046 bp, mit „MP deleted-sense“-Sequenz) (Reustle *et al.*, 2005) zur Verfügung. Transformierte Reben wurden nach der Selektion mit PPT regeneriert, und die Transgenität mittels PCR überprüft (Abb. 19). Neben stabilen Transformanten wurden trotz Selektion nicht-transgene oder chimäre Pflanzen identifiziert. Aus der Regeneration nach PPT-Selektion ging Transformant #130 mit Δ DI2-Konstrukt, sowie #141, #142 und #157 mit dem MPd-Konstrukt hervor. Die transgenen

Linien wurden über Einaugenstecklinge *in vitro* erhalten und vermehrt. Die Qualität der DNA wurde mittels PCR spezifisch für eine endogene NADH-Dehydrogenase bestätigt (Abb. 19, A). Die Transformanten #130, #141, #142 und #157 wiesen Amplifikate der viralen (B) und der Markersequenz (C) auf (Abb. 19). Mittels RT-PCR war mit MP-spezifischen Primern für das Transgen bei den Transformanten #141, #142 und #157 mRNA detektierbar (Abb. 20).

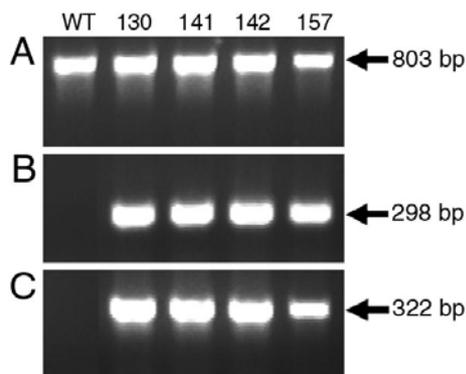


Abb. 19: Nachweis des Transgens über PCR bei Reben. Endogene NADH-Dehydrogenase (A) als Kontrolle, virusabgeleitete Sequenz aus GFLV-MP (B), Selektionsmarker bar (C). Δ DI2-GFLV-MPc (#130), GFLV-MPd (#141, #142, #157).

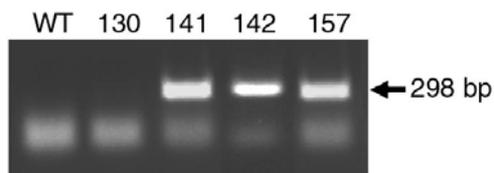


Abb. 20 Nachweis von mRNA transgenen Ursprungs über RT-PCR. cDNA der GFLV-MP-Sequenz bei transgenen Reben. Δ DI2-GFLV-MPc (#130), GFLV-MPd (#141, #142, #157).

3.3.1.2 Nachweis von siRNA

Der Nachweis von siRNA des Transgens erfolgte über LMW Northern Blot. Für die Extraktion von Gesamt-RNA aus Reben wurden 6 verschiedene Extraktionsprotokolle getestet, wobei 6 ng synthetische siRNA dem Homogenat von WT-Reben zugegeben wurde. Bei der Extraktion mit dem Purescript® RNA Isolation Kit (Gentra) und der Methode nach Renault *et al.* (2000) war zugesetzte siRNA in der extrahierten Gesamt-RNA enthalten (Abb. 21). Bei der Extraktionsmethode nach Renault *et al.* wurden etwa 100% der

zugegebenen synthetischen siRNA mit der Gesamt-RNA isoliert (B), während die Ausbeute von siRNA mit dem Kit von Gentra wesentlich geringer war (C).

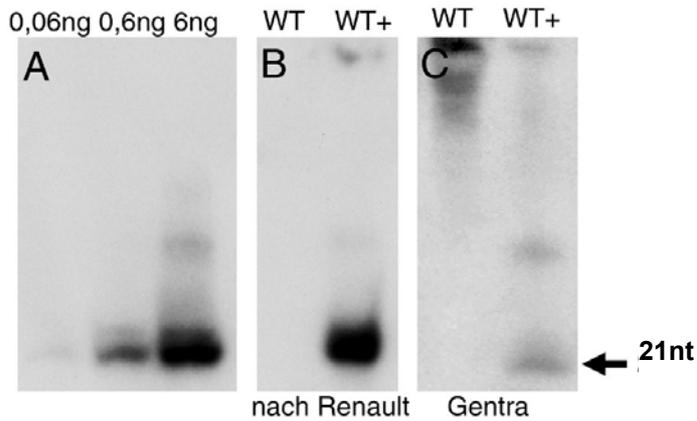


Abb. 21: Extraktionsmethoden für siRNA aus Reben im Vergleich. Synthetische siRNA direkt aufgetragen (A), Extraktion nach Renault *et al.* (2000) (B), Extraktion mit Purescript® RNA Isolation Kit (Gentra) (C). WT+: Wildtyp-Rebe mit Zugabe von 6 ng synthetischer siRNA zum Homogenat.

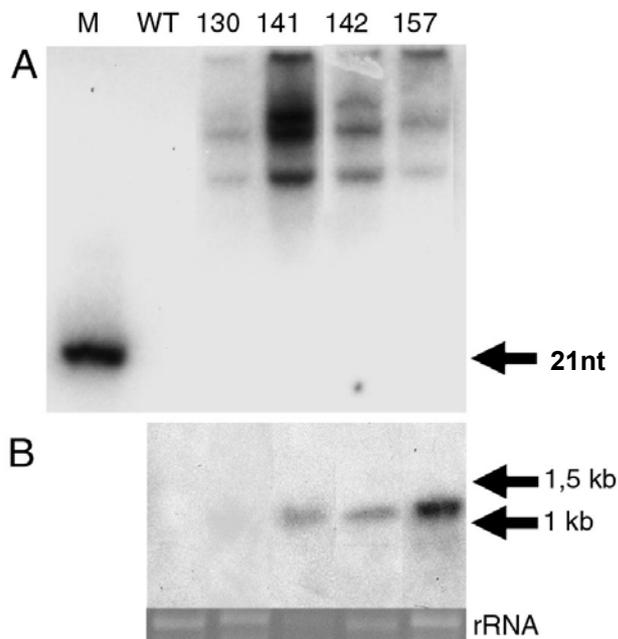


Abb. 22: Nachweis von RNA des Transgens bei Reben. Δ DI2-GFLV-MPc (#130), GFLV-MPd (#141, #142, #157). Nachweis von siRNA (A) und mRNA (B), M: synthetische siRNA (21 nt), rRNA: Ladekontrolle mit EtBr angefärbt.

Mit beiden verwendeten Extraktionsmethoden konnte bei keinem der Transformanten siRNA der virusabgeleiteten Sequenz aus dem Transgen nachgewiesen werden (Abb. 22, A). Bei den Transformanten #141, #142 und #157 wurde mRNA detektiert, wobei das Signal der nachgewiesenen Molekülgröße wenig über 1 kb liegt (B). Dies würde der Größe des MPd-Konstrukts mit 1046 Basen dieser Transformanten entsprechen. Bei Transformant #130 war keine transgenspezifische mRNA nachweisbar (B).

3.3.1.3 Bestimmung der Kopienzahl des Transgens

Die Kopienzahl des Transgens in Reben wurde mit qRT-PCR untersucht. Mit drei Primerkombinationen, spezifisch für die Sequenzen von 35S-Promotor, GFLV-MP und dem Selektionsmarker bar, wurde deren Amplifikation gegen das „single-copy“-Endogen „ABA [abscisic acid]-, stress-, and ripening-induced“ (ASR) Protein abgeglichen. Je Rebenlinie wurden drei unabhängige Versuche jeweils mit Doppelbestimmung angesetzt.

Die Rohdaten aus einem Versuchsansatz sind beispielhaft an Transformant #142 dargestellt (Abb. 23). Um Hintergrundfluoreszenz zu unterdrücken, wurde der Schwellenwert für das Fluoreszenzsignal bei 0,036 angelegt, so dass die linearen Bereiche der Kurven den entsprechenden Amplifikationen zugeordnet werden konnten. Die Fluoreszenzschwelle wurde bei der Amplifikation von GFLV-MP bei Zyklus 22, von bar bei Zyklus 24 und von 35S bei Zyklus 28 überschritten. Amplifikate des Endogens ASR überschritten die Schwelle bei Zyklus 29 (A). Zur Bestimmung der relativen Kopienzahl wurde die Primereffizienz normiert und über ANOVA die statistische Vergleichbarkeit der Proben sichergestellt. Bei der Analyse mittels Schmelzkurve zeigte jedes Amplifikat einen charakteristischen Verlauf mit einem spezifischen Schmelzpunkt (B). Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass kein unspezifisches Produkt mit abweichendem Schmelzpunkt amplifiziert und die Fluoreszenzmessung verfälscht wurde.

Die Amplifikate zeigten bei der gelelektrophoretischen Auftrennung die erwartete Produktgröße von 458 bp für das Endogen ASR (A), 373 bp für den 35S-Promotor (B), 298 bp für die virale Sequenz GFLV-MP (C) und 322 bp für den Selektionmarker bar (D) (Abb. 24).

Ergebnisse

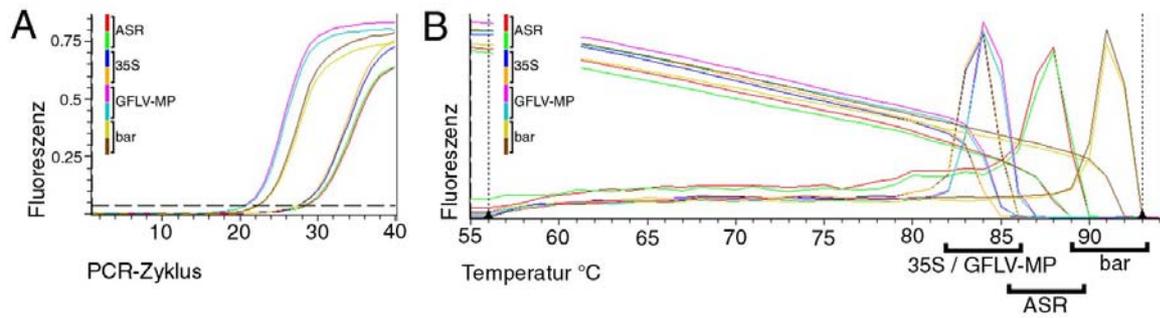


Abb. 23: Rohdaten aus der Analyse des Transformanten #142 mittels qRT-PCR. Darstellung der Fluoreszenz gegen die Anzahl der Zyklen (A). Bestimmung der Schmelzkurve der Amplifikate (B).

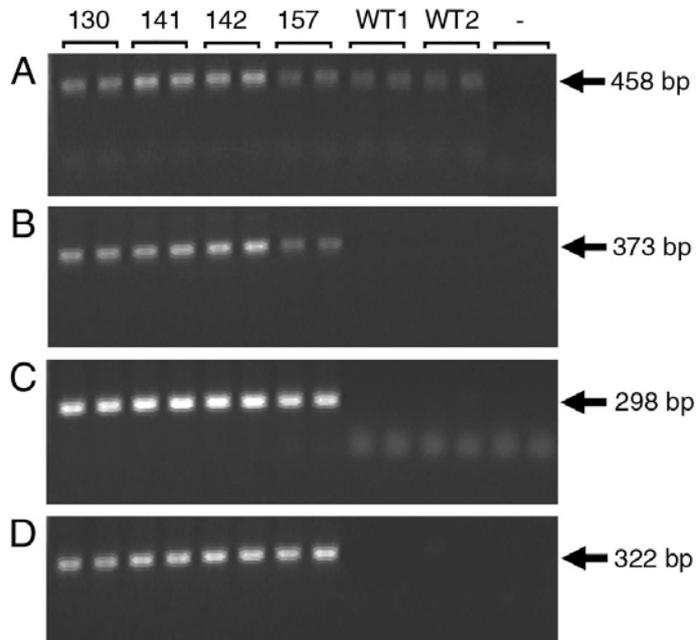


Abb. 24: Größenbestimmung der Produkte der qRT-PCR durch Gelelektrophorese. Endogen ASR ("ABA [abscisic acid]-, stress-, and ripening-induced protein"): 458 bp (A), 35S-Promotor: 373 bp (B), GFLV-MP: 298 bp (C), bar: 322 bp (D). Δ DI2-GFLV-MPc (#130), GFLV-MPd (#141, #142, #157).

Tab. 5: Mit qRT-PCR ermittelte, zu dem „single-copy“-Endogen ASR relative Kopienzahl des Transgens bei Reben. Verschiedene Sequenzabschnitte des Transgens wurden mit Primern für 35S-Promotor, GFLV-MP und bar amplifiziert und relativ zur Amplifikation von ASR quantifiziert.

Rebe Amplifikat	130	141	142	157	WT1	WT2
35S	0,9	2,9	2,3	1,3	0,0	0,0
GFLV-MP	1,5	3,6	3,8	1,9	0,0	0,0
bar	1,3	2,7	2,6	3,0	0,0	0,0

Das verwendete „house-keeping“-Gen ASR wurde im Rebengenom als „single-copy“-Gen charakterisiert (Cakir *et al.*, 2003). Es ist jedoch nicht bekannt, ob es sich hier um ein homozygot vorliegendes Gen handelt. Bei dem diploiden Chromosomensatz im Falle einer homozygoten Rebe würden für die Amplifikation des ASR-Gens über qRT-PCR 2 Kopien zur Verfügung stehen. Wenn das „single copy“ ASR-Gen heterozygot nur auf einem Allel im Rebengenom vorliegen würde, wäre dessen Kopienzahl mit der, des nach einem einmaligen Transformationsereignisses ebenfalls heterozygot vorliegenden Transgens, identisch.

Die normierte relative Kopienzahl des Transgens bei den verschiedenen Klonen ist als Vielfaches der angenommenen Kopienzahl des Endogens ASR der Tab. 5 zu entnehmen. Die mit den einzelnen Primerkombinationen für GFLV-MP, 35S und bar ermittelten Kopienzahlen stimmten innerhalb einer Pflanze nicht immer überein. Aufgrund der abweichenden ermittelten Kopienzahlen der überprüften Abschnitte des Transgens innerhalb eines Transformanten konnten somit keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Anzahl der erfolgten Integrationen gezogen werden.

Für die Southern Blot-Analyse wurde eine Restriktion mit EcoR V an 20 µg Gesamt-DNA aus Rebenblättern durchgeführt und das Transgen mit einer Sonde spezifisch für GFLV-MP nachgewiesen (Abb. 25). Bei Transformant #130 wurden 2 distinkte Kopien nachgewiesen, während bei den Transformanten #141, #142 und #157 je 3 Kopien des Transgens festgestellt wurden (A). Mittels einer Restriktion mit Hind III wurde das Transgen aus dem Pflanzengenom ausgeschnitten, wodurch Einzelbanden mit den Größen von 1,4 kb für ΔDI2-GFLV-MPc (#130) bzw. 1,7 kb für GFLV-MPd (#141, #142, #157) nachweisbar waren (B).

Die über qRT-PCR ermittelte relative Kopienzahl des Transgens (Tab. 5) stimmte in der Regel nicht mit der mittels Southern Blot (Abb. 25) festgestellten Anzahl der Insertionen überein. Für den oben beschriebenen Fall, dass das ASR-Gen bei der Rebe homozygot vorliegt und somit 2 Kopien amplifiziert würden, wurde die über qRT-PCR ermittelte Kopienzahl des Transgens rechnerisch verdoppelt. Danach konnte nur für Rebe #130 eine dem Southern Blot entsprechende Kopienzahl gefunden werden. Da letztendlich nicht geklärt ist, ob das „single copy“ ASR-Gen heterozygot oder homozygot im Rebengenom vorliegt, konnte die darauf bezogene relative Kopienzahl des Transgens mit qRT-PCR nicht sicher

bestimmt werden. Für die Bestimmung der Kopienzahl des Transgens stellte sich in diesem Fall der Southern Blot als die geeignete und reproduzierbare Methode heraus.

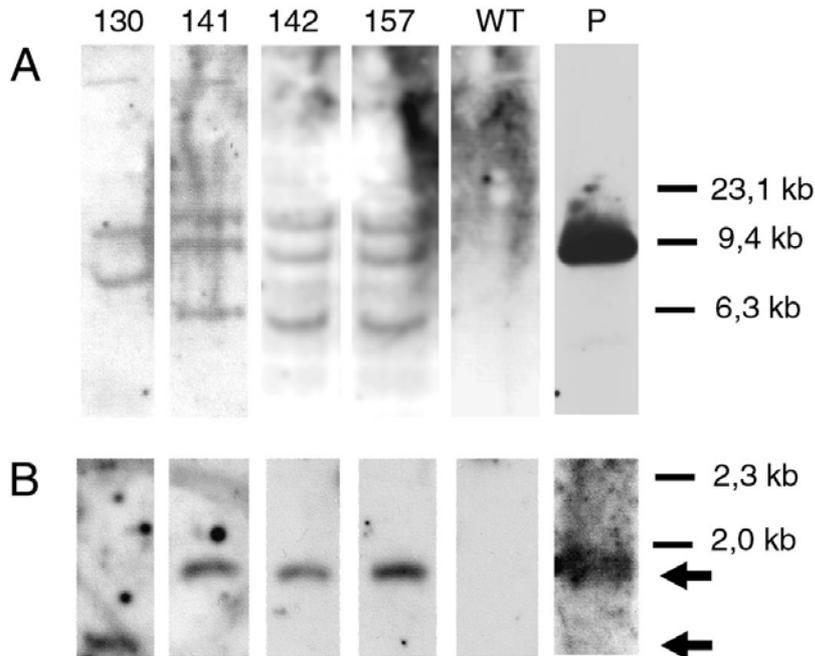


Abb. 25: Nachweis des Transgens im Rebengenom. Restriktion von 20 µg Gesamt-DNA mit EcoR V (A) und Hind III (B). Transgennachweis mit spezifischer Sonde für die GFLV-MP Sequenz. Restriktion mit Hind III ergibt Fragmentgrößen (Pfeile) von 1,4 kb für Δ DI2-GFLV-MPc (#130) bzw. 1,7 kb für GFLV-MPd (#141, #142, #157). P: Δ DI2-GFLV-MPc (A), GFLV-MPd (B).

3.3.2 Agrobakterien-Infiltration und GFP-Expression

Um PTGS wie bei *N. benthamiana* *in vivo* zu überprüfen sollte das GFP-Expressionsmodell mit dem Sensorbaustein GFP-GFLV-MPc auch auf Reben (WT) übertragen werden. Die Agrobakterienlösung konnte mit der Spritze jedoch nur kleinflächig in Blattkompartimente infiltriert werden. Eine großflächige Infiltration des gesamten Blattes wie bei *N. benthamiana* war bei Reben nicht möglich. Aus diesem Grund wurden Agrobakterien über Vakuum in das Parenchym junger, voll entwickelter Rebenblätter infiltriert und verschiedene Parameter zur Optimierung getestet.

Zur Vorbehandlung wurden Blätter aus *in vitro*- und Gewächshauskultur zur Herabsetzung der Oberflächenspannung für 10 min in TritonX100 inkubiert. Blätter wurden z.T. biolistisch behandelt, um Mikroverletzungen als Angriffspunkt für Agrobakterien zu erzielen. Die

anschließende Co-Kultur erfolgte auf zuckerfreiem Co-Kulturmedium (NN-Medium). Die GFP-Fluoreszenz wurde am 3. Tag nach der Infiltration mikroskopisch ausgewertet (Abb. 26). Aus Vorversuchen ging hervor, dass bei Co-Kultur ohne NN-Medium die Blätter ausgedehnte Nekrosen von bis zu 90% in den infiltrierten Bereichen aufwiesen. Auch eine Verwendung von TritonX100 mit einer Konzentration > 0,1% führte zu massiver Schädigung des Blattgewebes.

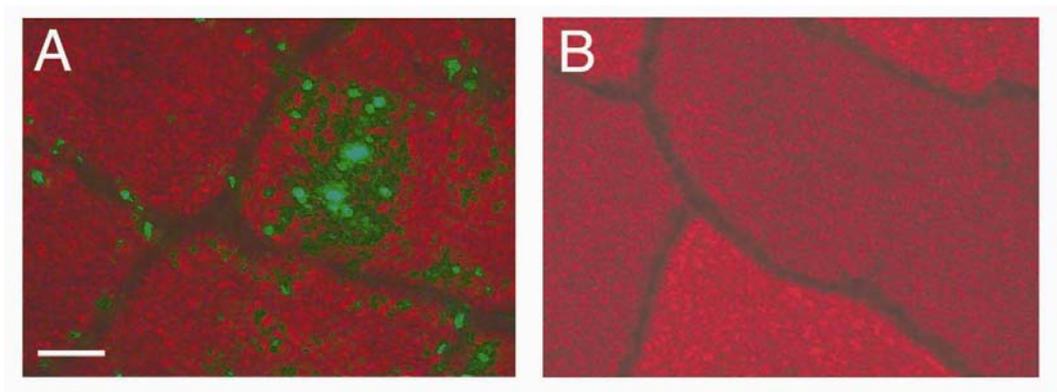


Abb. 26: Vakuum-Agrobakterien-Infiltration mit GFP-Sensorkonstrukt an Rebenblättern. GFP-Fluoreszenz 3 dpi (A), Kontrolle (B). Maßstab 100 µm.

Tab. 6: GFP-Expression nach Agrobakterien-Infiltration an Rebenblättern.

Vorbereitung		Blätter aus Gewächshauskultur				Blätter aus <i>in vitro</i> -Kultur			
		0,1% TritonX100		-		0,1% TritonX100		-	
		Biolistik	-	Biolistik	-	Biolistik	-	Biolistik	-
Vakuum-Infiltration mit Agrobakterienlösung und Co-Kultur auf Co-Kulturmedium									
GFP-Fluoreszenz*	Blatt 1	2	3	2	2	0	1	1	0
	Blatt 2	3	3	2	3	1	1	1	0
	Blatt 1,2	Kontrolle 0				Kontrolle 0			
Nekrotische Blattfläche (%)		40-70	35-40	25-30	25-30	15-20	15	10	5-10
		Kontrolle 20-25				Kontrolle 5-10			

* GFP-Fluoreszenz 3 dpi: 3 = stark, 2 = deutlich, 1= schwach, 0 = keine Fluoreszenz

Die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsansätze sind der Tab. 6 zu entnehmen. Pro Variante wurden 2 Blätter infiltriert. Als Negativkontrolle wurden Rebenblätter mit entsprechender Vorbehandlung einer Vakuuminfiltration ohne Agrobakterien unterzogen. GFP-Fluoreszenz von unterschiedlicher Intensität konnte bei allen getesteten Varianten, außer bei *in vitro*-Blättern ohne Vorbehandlung festgestellt werden. Generell war bei Blättern von Reben aus dem Gewächshaus eine intensivere GFP-Fluoreszenz festzustellen. Die Behandlung mit TritonX100 resultierte in verstärkter Nekrotisierung des Blattgewebes. Die biolistische Behandlung erzielte in Bezug auf die GFP-Fluoreszenz keinen weiteren positiven Effekt.

3.4 Virusinfektion von Reben

Reben konnten mittels Standardmethoden, wie Inokulation durch Abreiben der Blätter, nicht mit Nepoviren infiziert werden. Mechanische Inokulation an Wurzeln führte nur bei einzelnen Pflanzen zu einer Infektion. Durch Pfropfen von Testreben auf viruskrankes Material konnte Virus inokuliert werden, ermöglichte jedoch keine sichere Bewertung der Resistenz. Feldversuche und Dualkultur mit virulenten Nematoden im Gewächshaus ergeben aussagekräftige Ergebnisse, sind jedoch sehr langwierig. Als alternatives Verfahren wurde zur Virusübertragung eine *in vitro* Dualkultur entwickelt.

3.4.1 Entwicklung einer Dualkultur

3.4.1.1 Zucht virulenter *Xiphinema index*

Für eine Dualkultur zur Inokulation von Reben mit *Xiphinema index* als Vektor sind virulente Nematoden notwendig. An Feigen gezogene, adulte Nematoden wurden im Gewächshaus an GFLV-infizierten Reben kultiviert, um eine Virusaufnahme zu ermöglichen. Nach ca. 6 Wochen Inkubationszeit wurden über transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen mehrere Individuen auf Virusgehalt überprüft. Nematoden aus der Kultur mit virusinfizierten Reben zeigten virusähnliche Partikel an der Wandung des Odontophors und auch des Stiletts (Abb. 27 B, Pfeil). In Abb. 27 A ist zur Übersicht der Kopfbereich von

X. index in vivo gezeigt. Die Lage des Odontostiletts ist durch einen Pfeil markiert. Das eingelagerte Bild in B zeigt das Odontostilett in der Mundstachelscheide im Querschnitt.

Aufgrund des erheblichen Aufwandes beim Nachweis von GFLV in Nematoden mittels TEM wurde zur Analyse einer größeren Anzahl von Individuen auf die RT-PCR zurückgegriffen (Abb. 28). Mittels einer spezifischen RT-PCR für *X. index* wurde die Nematodenart verifiziert und die Qualität der RNA überprüft (A). In der Gesamt-RNA von Nematoden, die an GFLV-infizierten Reben kultiviert wurden, konnte virale RNA nachgewiesen werden (B, Xi 2-6). Nematoden aus der Feigenkultur waren im Test virusnegativ (B, Xi 1).

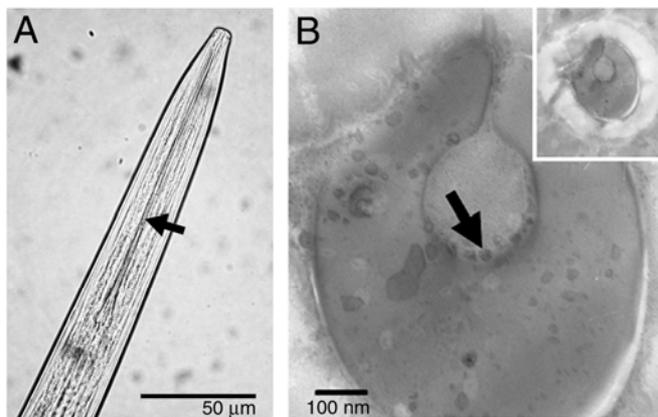


Abb. 27: Nachweis von Viruspartikeln in *Xiphinema index*. Laterale Ansicht des Kopfabschnitts *in vivo*, Lage des Odontostiletts (A, Pfeil). Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des Odontostiletts im Querschnitt mit virusähnlichen Partikeln (B, Pfeil).

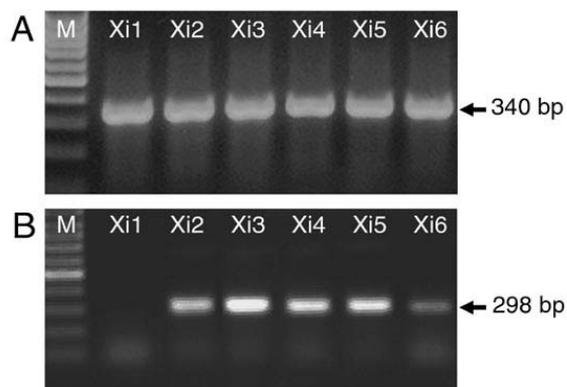


Abb. 28: Nachweis von *Xiphinema index* und GFLV mittels RT-PCR. RT-PCR mit spezifischen Primern für *X. index* (A). Nachweis viraler RNA (GFLV) in *X. index* (B). 10 Individuen pro Probe. (Xi 1) Nematoden aus Feigenkultur, (Xi 2-5) Nematoden aus Kultur mit GFLV-infizierten Reben. (M) 100 bp-Marker, Fermentas.

3.4.2 *In vitro* Dualkultur

3.4.2.1 Etablierung der *in vitro*-Kulturbedingungen

Für die *in vitro* Dualkultur wurden Parameter untersucht, die eine gemeinsame Kultur von Reben und *X. index* ermöglichen. Als Substrat wurde sterilisierter Sand gewählt, der mit verschiedenen Flüssigmedien (Tab. 7) auf eine Feldkapazität von 100% eingestellt wurde. Nach 3 Wochen Vorkultur wurde durch Verdunstung eine Feldkapazität von etwa 60% erreicht, die sich für eine Co-Kultur mit Nematoden als geeignet herausstellte.

Tab. 7: Medien für die *in vitro* Dualkultur.

Medium	Parameter	Wachstumsbedingung ¹
A	0,5 MS / pH 5,8 / 1% Saccharose	ohne Lichtschutz
B	0,5 MS / pH 5,8	ohne Lichtschutz
C	0,5 MS / pH 7,0 / 1% Saccharose	ohne Lichtschutz
D	0,5 MS / pH 7,0	ohne Lichtschutz
E	LS / pH 5,8	ohne Lichtschutz
F	LS / pH 5,8 / 1% Saccharose	ohne Lichtschutz
G	0,5 MS / pH 5,8 / 1% Saccharose	Lichtschutz
H	0,5 MS / pH 5,8	Lichtschutz
I	0,5 MS / pH 7,0 / 1% Saccharose	Lichtschutz
J	0,5 MS / pH 7,0	Lichtschutz

¹Lichtschutz: Substratabdeckung mit Aluminiumfolie, um Irritation der Nematoden durch Lichteinfall zu vermeiden.

In Vorversuchen war mit ½ MS-Medium mit und ohne Zuckerzusatz die Sproß- und Wurzelentwicklung deutlich besser, als mit LS-Medium (Tab. 8). Bei weiterführenden Versuchen mit ½ MS-Medium wurden zusätzliche Parameter verändert und die

Anwuchsraten der Rebenstecklinge bewertet (Tab. 8 C, D, G-J). Bei allen ½ MS-Medien mit Zuckerzusatz (A, C, G, I) war ein beschleunigtes Wachstum der Reben im direkten Vergleich zu Medien ohne Zucker zu beobachten. Wurzel und Sprossbildung begannen früher, außerdem waren die Anwuchsraten der Stecklinge höher. Medien mit pH 5,8 (A, B, G, H) ergaben ein stärker verzweigtes und besser ausgebildetes Wurzelsystem. Wurzeln aus der *in vitro* Sandkultur glichen eher den Wurzeln von Pflanzen aus dem Gewächshaus. Sie hatten einen bräunlichen Cortex und bildeten Wurzelhaare aus. Diese Merkmale wurden in der *in vitro* Kultur auf Medien mit Agar nicht festgestellt.

Tab. 8: Entwicklung von Rebenstecklingen in der *in vitro* Sandkultur mit verschiedenen Medien.

Medium*	Reben (n)	Bewurzelung (%)				Bewurzelung 4.Wo (%)	Sprossbildung (%)				Sprossbildung 4.Wo (%)
		1.Wo	2.Wo	3.Wo	4.Wo		1.Wo	2.Wo	3.Wo	4.Wo	
A	16	25	37,5	25	0	87,5	43,8	37,5	12,5	0	93,8
B	84	13,1	28,6	26,2	3,6	71,5	31	32	16,7	7,1	86,8
C	16	43,8	31,2	18,8	0	93,8	18,8	62,5	12,5	0	93,8
D	16	25	37,5	6,2	0	68,7	6,2	81,3	6,3	0	93,8
E	8	0	0	0	6,2	6,2	0	0	0	0	0
F	8	0	0	0	6,2	6,2	0	0	0	0	0
G	12	66,7	8,3	0	0	75	25	33,3	8,4	0	66,7
H	60	11,7	48,3	13,3	1,7	75	26,7	26,7	8,3	1,7	63,4
I	12	16,7	25	25	33,3	100	33,3	41,7	16,7	0	91,7
J	12	16,7	16,7	8,3	0	41,7	8,3	16,7	8,3	0	33,3

* Medien siehe Tab. 7

Um eine optimale Kombination von Rebenentwicklung mit hoher Überlebensrate der besetzten Nematoden zu finden, wurden Rebenansätze der *in vitro* Sandkultur nach 3 Wochen mit jeweils 10 *X. index* inokuliert. Die nach 6 Wochen Inkubationszeit ermittelte Überlebensrate der Nematoden ist Tab. 9 zu entnehmen. Die Nematodenpopulation war in allen Ansätzen mit Medien ohne Zucker (B, D, H, J) höher als bei zuckerhaltigen Ansätzen. Bei den Ansätzen mit zuckerhaltigen Medien waren nach Zugabe der unsterilen Nematoden

Kontaminationen festzustellen. Mehrmaliges Spülen der handverlesenen Nematoden mit sterilem Wasser vor dem Besetzen konnte Kontaminationen zwar verringern, aber nicht verhindern. Eine Desinfektion der Nematoden wurde nicht durchgeführt, um deren Vitalität nicht zu beeinträchtigen (Bavaresco & Walker, 1994). Die Nematoden zeigten keine Präferenzen für einen der getesteten pH-Werte, auch die Substratfeuchte ließ keinen Effekt erkennen, solange sie im Bereich zwischen 40 und 70% der Feldkapazität lag. Hier konnte ein Unterschied zu den Ergebnissen von Sultan & Howard (1991) festgestellt werden, die eine Präferenz für eine Substratfeuchte von 10-15% beschrieben. Eine Abdunkelung des Substratbereichs in Kombination mit zuckerfreien Medien (H, J) hatte einen positiven Effekt auf die Überlebensrate der Nematoden. Um eine hohe Anwuchsrate (75%) der Rebenstecklinge mit einer hohen Überlebenswahrscheinlichkeit (75%) des Nematodenbesatzes zu kombinieren, wurde die Medienvariante H für Infektionsversuche gewählt.

Tab. 9: Anwuchsrate von Rebenstecklingen und Überlebensrate besetzter *X. index*.

Medium ¹	Wachstumsbedingungen	bewurzelte Stecklinge ² (%)	Stecklinge mit Spross ³ (%)	Überlebensrate <i>X. index</i> ⁴ (%)
A	ohne Lichtschutz	88	94	5
B	ohne Lichtschutz	75	81	51
C	ohne Lichtschutz	94	94	2
D	ohne Lichtschutz	69	94	36
G	Lichtschutz	75	67	0
H	Lichtschutz	75	25	75
I	Lichtschutz	75	92	3
J	Lichtschutz	42	33	73

¹ Medien siehe Tab. 7

^{2,3} nach 3 Wochen Vorkultur

⁴ nach 6 Wochen Inkubationszeit

3.4.3 Infektionsversuche mit der *in vitro* Dualkultur

Reben aus Infektionsversuchen über *in vitro* Dualkulturansatz mit *X. index*, die aus der Gewächshauskultur mit GFLV-positiven Reben stammten, wurden nach 2-6 Wochen Inkubationszeit auf Wurzelparasitismus und Virusübertragung untersucht. Überlebende Nematoden wurden auf Virusgehalt getestet. Insgesamt wurden 154 inokulierte Reben ausgewertet. Bei 16 Reben war GFLV in der Wurzel nachweisbar, 9 Reben zeigten eine systemische Infektion im Spross. Virussympptome konnten über den Habitus der Reben nicht festgestellt werden. In den Reben war Virus frühestens 3 Wochen nach der Inokulation mit *X. index* nachweisbar. Eine Verlängerung der Inkubationszeit über 6 Wochen hinaus führte nicht zu einer erhöhten Infektionsrate bei den Reben. Die Nematodenpopulation brach in diesen Ansätzen jedoch bis auf einzelne überlebende Individuen zusammen. Gallbildung an Wurzeln (Abb. 29, Pfeile) war in der *in vitro* Dualkultur (A) nur sehr selten festzustellen und korrelierte nicht mit einer Virusinfektion der Reben (Abb. 30, R3).

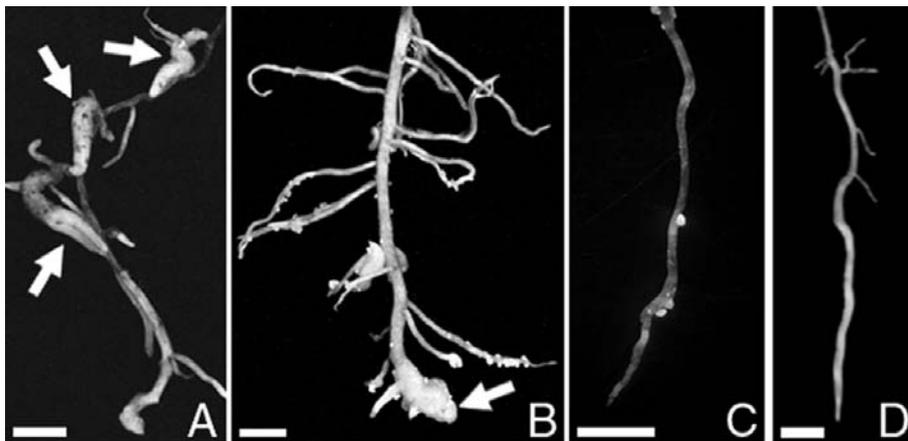


Abb. 29: Gallbildung an Rebenwurzeln nach Befall von *X. index*. Wurzeln von Reben aus der *in vitro* Dualkultur (A), Gewächshauskultur (B). Wurzeln von nicht parasitierten Reben aus *in vitro* Dualkultur (C) und Gewächshaus (D). Maßstab 5 mm.

Repräsentative Ansätze von Inokulationsversuchen mit einer Inkubationszeit von 6 Wochen sind in Tab. 10 dargestellt. In Versuchsansatz 1 und 3 waren bei 29 bzw. 45% der Reben Wurzelproben viruspositiv. 12 bzw. 20% der Sprossproben waren systemisch infiziert und enthielten GFLV. Wurzelgallen waren in Ansatz 1 und 3 nicht zu detektieren. In Ansatz 2 wurden Wurzelgallen an 2 Reben identifiziert, GFLV war in diesen Proben jedoch nicht nachweisbar. Die Überlebensrate der Nematoden lag bei 74-90%, außerdem wurde in allen Populationen aus den Versuchsansätzen nach der Inkubationszeit GFLV detektiert.

Tab. 10: Infektionsversuche aus der *in vitro* Dualkultur.

Ansatz #	Reben (n)	Reben mit GFLV inf. Wurzeln (%)	Reben mit GFLV inf. Spross (%)	Überlebensrate X.index (%)	Reben mit Wurzelgallen (n)
1 ¹	17	29	12	90	0
2 ¹	20	0	0	74	2
3 ²	20	45	20	87	0

Inokulation mit ¹10 oder ²20 *X. index* pro Ansatz

6 Wochen Inkubationszeit nach 3 Wochen Vorkultur

Abb. 30 zeigt durch *X. index* mit GFLV-infizierte Reben nach einer Inkubationszeit von 6 Wochen. Bei Rebe R1 war virale RNA sowohl in der Wurzelprobe (W1), als auch in der Blattprobe (B1) nachzuweisen. Virale RNA konnte in Rebe R2 nur in der Wurzel (W2) detektiert werden, die Blattprobe (B2) war virusnegativ. Bei Rebe R3 konnte weder in der Wurzel- (W3), noch in der Blattprobe (B3) Virus nachgewiesen werden. An den Wurzeln der Reben R1 und R2 konnten keine Gewebeveränderungen, die auf Parasitieren der Nematoden hingewiesen hätten, festgestellt werden. Bei Rebe R3 wurden hingegen Wurzelgallen nachgewiesen.

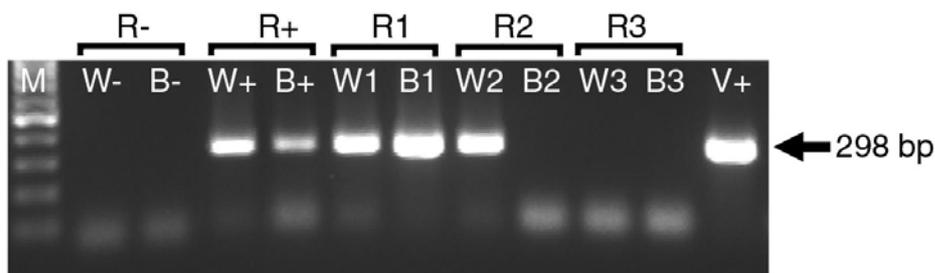


Abb. 30: Nachweis von GFLV durch RT-PCR an Reben aus Infektionsversuchen. Wurzel- (W-) und Blattprobe (B-) einer virusfreien Rebe (R-), Wurzel- (W+) und Blattprobe (B+) einer GFLV-infizierten Rebe (R+), Wurzel- (W1-3) und Blattproben (B1-3) von Reben (R1-3) aus Infektionsversuchen mit *in vitro* Dualkultur, Positivkontrolle GFLV cDNA (V+), 100 bp-Marker, Fermentas.

3.4.4 Virusinfektion durch mechanische Inokulation

Nepoviren konnten durch mechanische Inokulation von Blättern nicht auf Reben übertragen werden. Da die natürliche Infektion der Rebe über die Wurzel erfolgt, wurden verschiedene Varianten mechanischer Inokulation an Wurzeln von Reben aus der *in vitro* Sandkultur durchgeführt (Tab. 11).

Tab. 11: Mechanische Virusinokulation an Rebenwurzeln aus der *in vitro* Sandkultur.

Virus	Methode	Inokulum	Inokulierte Reben (n)	Infizierte Reben (n)
ArMV	Injektion	0,1g/mL Extrakt	7	0
GFLV	Injektion	0,1g/mL Extrakt	43	3
	Injektion	0,1g/mL Extrakt/BSA	6	0
	Injektion	Virusisolat 1:1	2	0
	Injektion	Virusisolat 1:10	4	1
	Injektion	Virusisolat 1:100	1	0
	Injektion	Virusisolat 1:1000	2	0
RpRSVg	Injektion	0,1g/mL Extrakt	25	2
	Injektion	0,1g/mL Extrakt/BSA	7	2
GFLV	Abreiben	0,1g/mL Extrakt	52	5
	Abreiben	Virusisolat 1:10	12	0
RpRSVg	Abreiben	0,1g/mL Extrakt	11	2

Injektion in Rebenwurzel mittels Hamilton-Spritze

Abreiben der Wurzelspitze mit Virusextrakt/-isolat

Rohextrakt aus GFLV-infizierten *Chenopodium quinoa* in Bentonit-Puffer

Virusisolat 2 mg/mL in Bentonit-Puffer

Die Wurzeln aus der *in vitro* Sandkultur wiesen eine höhere Bruchstabilität im Gegensatz zu Wurzeln aus Agar-Medien auf, was die Handhabung beim Inokulieren erleichterte. Die Injektion von Virusextrakt bzw. -isolat wurde mit einer Hamilton-Spritze durchgeführt. Mit ArMV-Extrakt konnten Rebenwurzeln durch Injektion nicht infiziert werden. Die Infektion

einzelner Pflanzen gelang mit GFLV-Extrakt und Virusisolat 0,2 mg/mL. Ebenso konnten Reben mit RpRSVg-Extrakt durch Injektion infiziert werden. Durch mechanisches Abreiben mit durch Handschuh geschützten Fingern konnten Reben mit GFLV und RpRSVg mittels Virusextrakt infiziert werden.

Generell blieben erfolgreiche Inokulationen auf Einzelpflanzen begrenzt, wobei sich die Wiederholbarkeit der Versuche als schwierig heraus stellte. Ein weiteres Problem war der Verlust zahlreicher Versuchsreben durch Absterben der inokulierten Wurzeln. Die mechanische Inokulation von Reben war ineffizient, die Ergebnisse zeigen jedoch, dass Reben im Prinzip mechanisch inokulierbar sind.

3.4.5 Virusinokulation durch Pfropfung

Testreben, auf virusinfizierte bewurzelte Unterlagen (26G) gepfropft, wurden nach Überwinterung im Gewächshaus kultiviert und 14 Tage nach dem Austrieb mittels ELISA getestet (Tab. 12). Während beide getesteten Pfropfreben mit Klon #142 GFLV-positiv waren, konnte bei 68% der Pfropfreben mit Klon #130 kein Virus nachgewiesen werden. SO4 wurde als Ausgangsmaterial für die Transformation verwendet und diente im Resistenztest als virusanfällige Kontrollsorte, wobei 73% der Pfropfungen infiziert waren. Bei den mit ELISA überprüften Viruspender-Unterlagen konnte die Virusinfektion bestätigt werden. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme 9 Monate nach der Pfropfung war bei Klon #130 im Vergleich zu SO4 eine erhöhte Virusresistenz festzustellen.

Tab. 12: Virusinokulation durch Pfropfung. Virustest mittels ELISA nach Überwinterung und Antreiben der Pfropfreben.

Sorte / Klon	Pfropfreben (n)	ELISA		
		+	-	- (%)
#142	2	2	0	0
#130	25	8	17	68
SO4	11	8	3	27

In Abb. 31 ist ein LMW Northern Blot mit ausgewählten, mittels ELISA getesteten Reben aus der Pfropfinokulation dargestellt. Die im ELISA virusnegativ getesteten Klone #130 (1-3) zeigten weder virale mRNA, noch eine Akkumulation von siRNA. Die bei Klon #130 (4) mittels ELISA nachgewiesene GFLV-Infektion wurde durch die Detektion viraler mRNA bestätigt. In dieser Probe konnte zudem siRNA nachgewiesen werden. Bei der Unterlage 26G+, die als Virusspender fungierte, wurde virale mRNA und siRNA detektiert. Diese Rebe war im ELISA-Test ebenfalls viruspositiv. Die beiden nicht inokulierten Reben #130 und SO4 (WT) ergaben kein MP-spezifisches Signal in der Northern-Analyse.

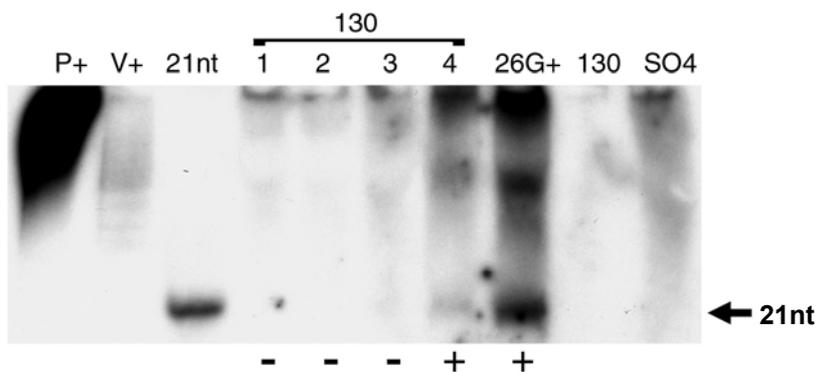


Abb. 31: Reben aus Virusinokulation mit GFLV über Pfropfung. Sonde gegen GFLV-MP-Sequenz. P+: Plasmidkontrolle des Transgens (50 ng), V+: Virusisolat GFLV (40 ng), Marker: synthetische siRNA 21 nt (1 ng), 1-4: Klon #130 aus Pfropftest, 26G+: Unterlage als Virusspender, 130 und SO4: gesunde Reben, +/-: Ergebnis der ELISA-Analyse.

4 Diskussion

Nach der Entdeckung von Virusresistenz in Pflanzen durch PTGS wurde versucht, gezielt „silencing“ zu induzieren. Durch die Nutzung von „defective interfering“ (DI)-Sequenzen aus TBSV konnte in *Nicotiana benthamiana* eine erhöhte Resistenz gegen mehrere, nah miteinander verwandte Viren erzielt werden (Rubio *et al.*, 1999). Resistenz gegen Potato virus Y in Tabak erfolgte durch PTGS über Transkription eines Transgens mit virusabgeleiteter Sequenz in „antisense“-Orientierung (Waterhouse *et al.*, 1998). Die höchste Effizienz, über PTGS Virusresistenz zu induzieren, wurde jedoch durch die Kombination virusabgeleiteter Sequenzen in „sense“- und „antisense“-Orientierung innerhalb eines sogenannten „inverted repeat“ (IR)-Konstrukts erreicht (Helliwell & Waterhouse, 2005, Kalantidis *et al.*, 2002, Waterhouse *et al.*, 1998, Wesley *et al.*, 2001). In Anlehnung an diese Strategien wurden Konstrukte zur Induktion von Virusresistenz gegen Nepoviren hergestellt und in Reben bzw. *N. benthamiana* transformiert (Jardak-Jamoussi *et al.*, 2003, Reustle *et al.*, 2005).

4.1 Resistenz gegen Nepoviren durch transgen-induziertes PTGS

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von „screening“-Methoden zur Identifikation virusresistenter Pflanzen, die mit verschiedenen Konstrukten transformiert wurden. Zur Induktion von Virusresistenz gegen die Nepoviren GFLV, ArMV und RpRSVg wurden IR-Konstrukte mit konservierten, gegenläufig angeordneten virusabgeleiteten Sequenzen aus den genannten Zielviren verwendet (Jardak-Jamoussi *et al.*, 2003, Reustle *et al.*, 2005). Konstrukte mit DI-Sequenzen aus TBSV in Kombination mit der abgeleiteten Sequenz von GFLV-MP induzierten Resistenz gegen GFLV (Jardak-Jamoussi *et al.*, 2003, Reustle *et al.*, 2005).

Um PTGS zu evaluieren, wurde neben Resistenztests auch ein Expressionsmodell mit GFP-Sensorkonstrukten zur Agrobakterien-Infiltration etabliert. Bei vielversprechenden transgenen Pflanzen wurde auf molekularbiologischer Ebene die Induktion von PTGS durch das Transgen überprüft. Ausgewählte transgene *N. benthamiana* sowie transgene Reben wurden molekulargenetisch charakterisiert. Für Reben wurde außerdem ein Inokulationssystem entwickelt, das den natürlichen Übertragungsweg durch Nematoden in einer *in vitro* Dualkultur nachempfunden.

4.2 Charakterisierung transgener *Nicotiana benthamiana*

Das Resistenzverhalten transgener *N. benthamiana* der T0-Generation war unter Gewächshausbedingungen nach mechanischer Virusinokulation inhomogen. Transgene Pflanzen, die unterschiedliche Konstrukte enthielten, zeigten eine voneinander abweichende Virusresistenz. Ein unterschiedlicher Grad an Virusresistenz zwischen verschiedenen Konstrukten war zu erwarten, da jedes Konstrukt ein eigenes, spezifisches Potential zur Induktion von PTGS beinhaltet. Dies hängt im wesentlichen von der Stabilität der Doppelstrangstruktur der mRNA ab. Basenpaarung von „sense“- und „antisense“-Sequenz ohne „mismatches“ bildet thermodynamisch stabile dsRNA, wodurch PTGS aktiviert wird. Helliwell & Waterhouse (2005) geben für IR-Konstrukte als optimale Fragmentlänge für die „sense“- bzw. „antisense“-Sequenz 300-800 bp an. Die Induktion von PTGS gelingt zwar auch mit kürzeren (50 bp) oder längeren (1 kb) Fragmenten, die Effizienz ist jedoch geringer. Je kürzer das verwendete Fragment, um so schwieriger ist die zuverlässige Etablierung von „silencing“ in der transgenen Pflanze (Helliwell & Waterhouse, 2005). Bei zu großen, gegenläufig angeordneten Fragmenten können Rekombinationen auftreten, die ebenfalls effizientes „silencing“ beeinträchtigen können (Helliwell & Waterhouse, 2005). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten IR-Konstrukt gegen GFLV war das virusabgeleitete Fragment 561 bp lang. Die Fragmentlänge der virusabgeleiteten Sequenz im Konstrukt IR-RpRSV betrug 362 bp. Die Größe dieser verwendeten Fragmente liegt damit in der als optimal angegebenen Größenordnung. Im Konstrukt IR-Nepo waren Fragmente aus GFLV (561 bp), RpRSV (362 bp) und ArMV (346 bp) kombiniert, wodurch ein Fragment mit der Gesamtlänge von 1269 bp entstand. Dieses Fragment lag über der genannten optimalen Größe, dennoch wurde in mehreren Transformanten PTGS induziert.

Die hier zur Verfügung stehenden DI-Konstrukte hatten eine Länge von 720 und 900 bp, können aber nicht direkt mit IR-Konstrukten verglichen werden. Die Bereiche mit stabilen Doppelstrangstrukturen in DI-Konstrukten umfassen nur Teile des Fragments. Rubio *et al.* (1999) konnte durch die Inokulation von DI-Konstrukten mit einer Länge von 404-679 bp erfolgreich PTGS induzieren. Diese Konstrukte enthielten jedoch nur die DI-Sequenz aus TBSV. Die in vorliegender Arbeit verwendeten DI-Konstrukte beinhalteten zusätzlich abgeleitete Sequenzen aus Nepoviren. Stabile dsRNA zur Induktion von PTGS wurde bevorzugt von der DI-Sequenz mit einer Länge von 339 bp bzw. von der Δ DI-Sequenz mit 157 bp Länge gebildet. In der nachfolgenden virusabgeleiteten „sense“-Sequenz war die Ausbildung von Doppelstrangstrukturen thermodynamisch instabil.

Unterschiedlich ausgeprägte Resistenz wurde auch zwischen voneinander unabhängig regenerierten Primärtransformanten, die das gleiche Konstrukt enthielten, festgestellt. Abweichendes Resistenzverhalten könnte auf den Integrationsort des Transgens im Pflanzengenom zurückzuführen sein. Dieser sogenannte Positionseffekt könnte einen Einfluss auf die Transkription des Transgens ausüben (Day *et al.*, 2000).

Die Anzahl der bei der Transformation integrierten Kopien des Transgens kann sich ebenfalls auf dessen Funktionalität auswirken. Pflanzen mit zwei oder mehr Kopien zeigten eine effizientere Virusresistenz, als Pflanzen mit nur einer Kopie (Kalantidis *et al.*, 2002). Entsprechendes konnte bei den mit Southern Blot überprüften Pflanzen der T1-Generation von Linie IR-Nepo13 bestätigt werden. Auch hier war die Pflanze mit einer Kopie virusanfällig, im Gegensatz zu der Pflanze mit zwei Kopien. Bei den T1-Pflanzen der Linie DI2.4 waren jedoch sowohl in der resistenten, als auch in der virusanfälligen Pflanze zwei Kopien des Transgens nachweisbar. Die Kopienzahl hatte in dieser Linie offensichtlich keine Auswirkung auf das Resistenzverhalten.

Letztendlich könnte auch die virusspezifische Aggressivität und Replikationseffizienz mitbestimmen, ob der PTGS-basierte Resistenzmechanismus der Infektion standhält. Während bei mit GFLV bzw. ArMV inokulierten transgenen Pflanzen häufiger eine Resistenz zu beobachten war, konnte sich bei mit RpRSVg inokulierten transgenen Pflanzen meist die Virusinfektion durchsetzen. Der zur Inokulation verwendete, aus Reben isolierte

RpRSV-Stamm „g“ war erfahrungsgemäß sehr aggressiv und hoch infektiös und konnte offensichtlich eine vorhandene Resistenz leichter überwinden.

Die Inhomogenität des Resistenzverhaltens zwischen genetisch identischen Klonen eines Regenerats, die zur gleichen Zeit inokuliert wurden, ließ sich hiermit jedoch nicht erklären. Die inokulierte Virusmenge könnte ein Faktor sein, der bei der Überwindung einer Resistenz eine Rolle spielen kann. Obwohl eine standardisierte mechanische Inokulation angestrebt wurde, war die Inokulation einer quantifizierten Virusmenge kaum möglich. Zudem konnten individuelle physiologische Unterschiede der Versuchspflanzen nicht ausgeschlossen werden, auch wenn sich die Pflanzen in einem vergleichbaren Entwicklungsstadium befanden. Zusätzlich nehmen Umweltfaktoren wie Temperatur, Lichteinstrahlung oder auch die Jahreszeit Einfluss auf die Infizierbarkeit von Pflanzen.

Die Etablierung von transgen-induziertem PTGS wurde auf RNA-Ebene an Primärtransformanten aus der *in vitro* Kultur analysiert. Bei fast allen Pflanzen wurde mRNA transgenen Ursprungs mittels RT-PCR detektiert. Die nachgewiesene mRNA deutete auf die Transkription des Transgens hin, gab aber noch keinen Hinweis auf die Induktion von „silencing“. In den Fällen, in denen keine mRNA nachgewiesen werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass bei diesen Pflanzen entweder keine Transkription des Transgens stattfand, oder aber die transkribierte mRNA durch PTGS direkt zu siRNA prozessiert wurde und mRNA unter der Nachweisgrenze lag. Etabliertes transgen-induziertes PTGS konnte durch die Detektion von transgen-spezifischer siRNA bei Pflanzen aus der *in vitro* Kultur bestätigt werden. Bei vielen analysierten Pflanzen mit nachweisbarer mRNA erfolgte oftmals auch die Akkumulation von siRNA (z. B. Δ DI2.30 und IR-RpRSV3). Diese Pflanzen zeigten demnach eine effiziente Transkription bei gleichzeitiger Prozessierung der mRNA zu siRNA. Bei einigen wenigen Pflanzen erfolgte die Akkumulation von siRNA, auch wenn keine mRNA detektierbar war (z. B. DI2.4 und IR-GFLV21). Eventuell transkribierten diese Pflanzen weniger mRNA des Transgens, oder die siRNA-Prozessierung war besonders effizient. Bei mehreren Pflanzen konnte keine siRNA nachgewiesen werden, obwohl mRNA transkribiert wurde (z. B. IR-GFLV14 und IR-Nepo16). Dies weist darauf hin, dass in diesen Pflanzen die Induktion von PTGS durch das Transgen wohl nicht erfolgte.

Um die Effizienz des etablierten „silencing“ *in vivo* zu überprüfen, wurden Klone der Primärtransformanten ins Gewächshaus überführt und mittels Agrobakterien mit einem GFP-Sensorkonstrukt infiltrierte. Über transgen-induzierte siRNA mit virusabgeleiteter Sequenz wird die komplementäre virusabgeleitete Sequenz der mRNA des Sensorkonstrukts erkannt und durch Spaltung inaktiviert. *N. benthamiana* WT und transgene Pflanzen ohne etabliertes PTGS zeigten ab dem zweiten Tag nach der Infiltration GFP-typische Fluoreszenz, während Pflanzen mit effizientem „silencing“ keine GFP-Fluoreszenz aufwiesen.

N. benthamiana WT und transgene Pflanzen, die GFP-Fluoreszenz nach der Agrobakterien-Infiltration aufwiesen, akkumulierten mRNA des Sensorkonstrukts ab dem ersten Tag nach der Infiltration. Ab dem zweiten Tag nach der Infiltration konnte eine in der Regel massive Akkumulation von siRNA bei gleichzeitiger Abnahme der mRNA nachgewiesen werden. In Proben vom siebten Tag nach der Infiltration konnte in keinem Fall mRNA oder siRNA des Sensorkonstrukts in infiltrierte Blättern detektiert werden. Es ist bekannt, dass bei massivem Auftreten von mRNA nach Agrobakterien-Infiltration mit einem Sensorkonstrukt „silencing“ ausgelöst wird (Voinnet *et al.*, 2003). So konnte Voinnet *et al.* (2003) in, mit GFP-Konstrukt infiltrierte und daraufhin fluoreszierende Blättern von *N. benthamiana* WT ebenfalls die Akkumulation von GFP-spezifischer siRNA nachweisen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Expression des GFP-Sensorkonstrukts ermöglicht und „silencing“ erst verzögert induziert wurde. Durch die starke Akkumulation invasiver mRNA könnte „RNA-directed RNA polymerase“ (RDR) aktiviert und die Synthese von dsRNA induziert worden sein. RDR würde in diesem Fall akkumulierte mRNA des GFP-Sensorkonstrukts als Template nutzen, um sekundäre dsRNA zu synthetisieren. Die sekundäre dsRNA würde anschließend über die gesamte Länge, einschließlich der GFP-Sequenz, durch „Dicer-like“ zu siRNA prozessiert werden. Für die Beteiligung einer RDR spricht diese nachgewiesene „transitive silencing“, da in den infiltrierte Blättern nicht nur siRNA mit virusabgeleiteter Sequenz zu finden war, sondern auch GFP-spezifische siRNA. Davon abweichende Ergebnisse wurden bei Johansen & Carrington (2001) beschrieben, die nach Infiltration ausschließlich mRNA ihres GFP-Sensorkonstrukts, jedoch keine siRNA detektierten.

Bei transgenen Pflanzen, die nach der Agrobakterien-Infiltration keine GFP-Fluoreszenz zeigten, konnte weder mRNA, noch siRNA des Sensorkonstrukts detektiert werden. Diese Feststellung war konsequent bei allen verwendeten Konstrukten zu beobachten und

reproduzierbar. Dies deutet darauf hin, dass der „silencing“-Prozess äußerst effektiv invasive mRNA abbaut, bevor es zu einer Akkumulation derselben kommen kann. In diesen Pflanzen lag auch siRNA des Sensorkonstrukts unterhalb der Detektionsgrenze. Dies würde bedeuten, dass siRNA transgenen Ursprungs unter den gegebenen Versuchsbedingungen in niedriger, nicht nachzuweisender Konzentration in aktivem RISC vorliegt. Der mit siRNA beladene RISC wäre demnach in der Lage, die mRNA des GFP-Sensorkonstrukts effizient zu spalten und zu inaktivieren. Da weder siRNA von der GFP-, noch von der virusabgeleiteten Sequenz akkumulierten, ist auch „transitive silencing“ nicht über die Detektion von siRNA nachweisbar. Die Synthese von sekundärer dsRNA durch RDR wäre hier zwar denkbar und würde den „silencing“-Prozess verstärken, dann sollte allerdings siRNA über die gesamte Sequenz des GFP-Sensorkonstrukts hinweg akkumulieren. Dies war wie bereits beschrieben bei den GFP-exprimierenden Pflanzen der Fall, nicht aber bei den Pflanzen, die keine GFP-Fluoreszenz aufwiesen. Entweder stand in diesen Pflanzen nicht ausreichend Template-RNA zur Induktion der dsRNA-Synthese zur Verfügung, oder RDR wurde erst gar nicht aktiviert.

In Bezug auf die Akkumulation von siRNA bildete ein Klon von Transformant IR-RpRSV3 eine Ausnahme. Nach der Infiltration des GFP-Sensorkonstrukts akkumulierte auch die Pflanze ohne GFP-Fluoreszenz siRNA mit virusabgeleiteter Sequenz und GFP-spezifische siRNA. In dieser Pflanze wurde demnach durch RDR dsRNA aus mRNA des GFP-Sensorkonstrukts synthetisiert, worauf „transitive silencing“ erfolgte.

In beiden analysierten Klonen Δ DI2.23 konnte mRNA des Transgens detektiert werden. Da in dem Klon, der keine GFP-Fluoreszenz nach der Infiltration zeigte, PTGS etabliert sein muss, sollte sich weder mRNA des Transgens, noch mRNA des GFP-Sensorkonstrukts anreichern. Die Akkumulation von mRNA des Transgens bei gleichzeitiger Abwesenheit von mRNA des GFP-Sensorkonstrukts in dieser Pflanze lässt sich in diesem Zusammenhang nicht erklären.

Letztendlich wurden durch Agrobakterien-Infiltration mit den verwendeten GFP-Sensorkonstrukten Pflanzen mit etabliertem „silencing“ von den GFP-exprimierenden Pflanzen visuell *in vivo* unterschieden. Dieses „screening“-System konnte auf alle in *N. benthamiana* transformierten Transgene angewandt werden.

Um zu zeigen, dass fehlende GFP-Fluoreszenz auf „silencing“ beruht, wurde der „silencing“-Suppressor p19 als Kontrollsystem eingesetzt, um PTGS zu inhibieren (Voinnet *et al.*, 2003). Co-Infiltration des GFP-Sensorkonstrukts mit dem p19-Konstrukt in dasselbe Blatt hatte ausnahmslos die Expression von GFP durch Blockierung von PTGS zur Folge. Hiermit wurde nachgewiesen, dass fehlende GFP-Fluoreszenz tatsächlich auf etabliertes PTGS in den transgenen Pflanzen zurückzuführen ist. In Anwesenheit von p19 konnte nach der Co-Infiltration auch bei den Pflanzen GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden, die bei alleiniger Infiltration des GFP-Sensorkonstrukts kein GFP exprimierten. Dies bedeutet, dass fehlende GFP-Fluoreszenz nach der Infiltration in diesen Pflanzen tatsächlich auf etabliertes PTGS zurückzuführen ist.

Zur Überprüfung der Korrelation von GFP-Fluoreszenz nach Infiltration und Virusanfälligkeit, wurden verschiedene transgene Linien der T1-Generation mit dem entsprechenden Virus inokuliert. Nach der Analyse mittels ELISA wurden die Pflanzen mit GFP-Sensorkonstrukt infiziert, zusätzlich erfolgte auch die Co-Infiltration mit GFP-Sensorkonstrukt und dem p19-Konstrukt an einem weiteren Blatt in ähnlichem Entwicklungsstadium. Bei Blättern, an denen die Co-Infiltration durchgeführt wurde, konnte in allen Fällen GFP-Fluoreszenz festgestellt werden. Bei der Mehrheit der virusresistenten Pflanzen war nach der Agrobakterien-Infiltration mit dem GFP-Sensorkonstrukt allein keine bzw. nur schwache GFP-Fluoreszenz nachweisbar. Dagegen war bei virusinfizierten Pflanzen in der Regel deutliche GFP-Fluoreszenz nach der Agrobakterien-Infiltration sichtbar. Die fehlende GFP-Fluoreszenz nach der Infiltration ergab zwar einen Hinweis auf Virusresistenz, eine 100%ige Korrelation lag jedoch nicht vor.

Bei der Untersuchung von apikalen Blättern dieser inokulierten Pflanzen mittels Northern Blot konnte bei den virusresistenten Pflanzen oftmals keine bzw. nur eine schwache Akkumulation von siRNA mit virusspezifischer Sequenz nachgewiesen werden. Einzige Ausnahme war die virusresistente Pflanze 113 der Linie IR-RpRSV3 mit deutlicher Akkumulation von siRNA des Transgens auch vor der Virusinokulation. Virusresistenz ohne nachweisbarer siRNA-Akkumulation des Transgens steht im Widerspruch zu der gängigen Theorie, dass Virusresistenz durch PTGS mit Akkumulation entsprechender siRNA des Transgens und des Virus korreliert. Diese Korrelation wurde zuvor in zahlreichen Publikationen an virusresistenten Pflanzen gezeigt (Dunoyer & Voinnet, 2005, Kalantidis *et*

al., 2002, Szitty *et al.*, 2003, Voinnet, 2001). Nach den hier vorliegenden Ergebnissen reicht ein „screening“ auf siRNA transgenen Ursprungs nicht aus, um Pflanzen als virusresistent einstufen zu können. Bei der Akkumulation von siRNA nach der Virusinokulation konnte nicht unbedingt auf eine Virusresistenz geschlossen werden. Diese Ergebnisse untermauern die zuvor beschriebenen Resultate der Infiltrationsexperimente mit den GFP-Sensorkonstrukten. Auch dort konnte bei den nach der Infiltration nicht-fluoreszierenden Pflanzen weder mRNA, noch siRNA des Infiltrats nachgewiesen werden, wohl aber bei Pflanzen mit GFP-Fluoreszenz nach der Infiltration. Dies würde bedeuten, dass bei virusresistenten Pflanzen PTGS sehr effizient ist und invasive Nukleinsäuren rapide abbaut, ohne eine mRNA- bzw. siRNA-Akkumulation zuzulassen. Somit wäre bei etabliertem, transgen-induziertem „silencing“ nicht notwendigerweise siRNA detektierbar.

In virusanfälligen transgenen Pflanzen wurde virale RNA stets nachgewiesen, siRNA akkumulierte, wenn überhaupt, nur geringfügig. Bei einigen dieser virusinfizierten Pflanzen war siRNA viralen Ursprungs mit CP-spezifischer Sequenz nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass RDR dsRNA der viralen RNA 2 synthetisierte und anschließend die CP-Sequenz zu siRNA prozessiert wurde. Ebenso könnte aber auch die bei der Virusreplikation auftretende dsRNA durch DCL zu siRNA prozessiert worden sein.

Die mittels ELISA virusnegativ getestete Pflanze IR-GFLV5 (103) akkumulierte siRNA und virale RNA. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass eine Virusinfektion vorlag, der Virustiter aber unterhalb der Nachweisgrenze für ELISA blieb. Bei dieser Pflanze ist zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine Übergangsphase in der Abwehr gegen die Virusinfektion anzunehmen. Es wurde siRNA der MP-Sequenz detektiert, die vermutlich transgenen und viralen Ursprungs war, CP-spezifische siRNA war nicht nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass durch das Transgen PTGS gegen die MP-Sequenz aktiviert wurde, aber nicht in der Lage war, das Virus frühzeitig zu eliminieren. In dieser Pflanze wurde bei der später erfolgten Agrobakterien-Infiltration durch PTGS die Expression von GFP des Sensorkonstrukts verhindert.

N. benthamiana WT akkumulierte bei Infektionen mit GFLV bzw. RpRSVg virale RNA, jedoch keine siRNA. Bei der Infektion mit ArMV hingegen wurde bei virusinfizierten *N. benthamiana* WT sowohl virale RNA, als auch siRNA detektiert. Dies bedeutet, dass im WT zur Abwehr von ArMV PTGS aktiviert wurde, die Virusinfektion aber nicht verhindert

werden konnte. Im direkten Vergleich mit GFLV und RpRSVg besteht hier ein Unterschied zu ArMV, das offensichtlich anfällig für die pflanzeigene Abwehr in *N. benthamiana* WT war. Zwar ist bei Nepoviren kein „silencing“-Suppressor bekannt, fehlende virale siRNA in GFLV- und RpRSVg-infizierten *N. benthamiana* WT könnte jedoch darauf hinweisen, dass PTGS durch diese Viren inhibiert oder zumindest beeinträchtigt werden könnte. Komponenten des „silencing“-Systems der Wirtspflanze könnten durch das Virus für dessen Replikation genutzt und dadurch die Effizienz von PTGS beeinträchtigt werden (Takeda *et al.*, 2005). Eine durch Infektion mit Nepoviren herabgesetzte Effizienz von PTGS könnte auch die relativ geringe Zahl an resistenten Pflanzen erklären, obwohl in der Literatur insbesondere mit IR-Konstrukten Resistenzen gegen z.B. Potato virus Y (Wesley *et al.*, 2001) von 80% erreicht wurden. Zu betonen ist hierbei, dass in diesen Fällen die Linien homogen Resistenz zeigten, während in vorliegender Arbeit innerhalb einer Linie resistente und anfällige Pflanzen identifiziert wurden.

Unstimmigkeiten im Resistenzverhalten und bei der GFP-Fluoreszenz könnten methodisch bedingt sein. Eine wirklich quantitativ definierte mechanische Inokulation ist kaum durchführbar, dies gilt ebenso für die Infiltration des GFP-Sensorkonstrukts mittels Agrobakterien. Die Quantität des eingebrachten Virus oder Infiltrats könnte jedoch darüber entscheiden, ob sich der etablierte „silencing“-Mechanismus der transgenen Pflanze durchsetzen kann. Außerdem stammen die Versuchspflanzen, wie bereits erwähnt, aus der genetisch uneinheitlichen T1-Generation, was unterschiedliches Resistenzverhalten nach sich ziehen kann. In mehreren hier untersuchten Transformanten aus der *in vitro* Kultur konnte, wie oben beschrieben, siRNA transgenen Ursprungs nachgewiesen werden. Bei entsprechenden Klonen, die unter Gewächshausbedingungen kultiviert wurden, war dieser Nachweis kaum noch zu reproduzieren. Umweltfaktoren und physiologischer Zustand der Pflanze haben demnach Auswirkungen auf die Effizienz von PTGS, wie auch von Kalantidis *et al.* (2002) und Szittyta *et al.* (2003) bereits gezeigt wurde. Sie untersuchten den Einfluss von Temperatur auf die Akkumulation von siRNA durch PTGS in transgenen Pflanzen. Bei höheren Temperaturen (27°C) akkumulierte deutlich mehr siRNA als bei niedrigen Temperaturen (15°C) (Szittyta *et al.*, 2003). Desweiteren wurde beschrieben, dass während der Entwicklung der Pflanzen je nach Alter siRNA unterschiedlich stark akkumulierte. Die Konzentration transgen-induzierter siRNA war bei *N. benthamiana* erst ab dem Sieben-Blatt-Stadium in der gesamten Pflanze konstant (Kalantidis *et al.*, 2002). Die Virusinokulation fand

standardgemäß an Pflanzen im Fünf-Blatt-Stadium statt, da in diesem Stadium WT-Pflanzen zuverlässig zu infizieren waren. Im Fünf-Blatt-Stadium könnte inokuliertes Virus möglicherweise nicht effizient durch PTGS eliminiert worden sein, da PTGS in transgenen Pflanzen dieses Entwicklungsstadiums noch nicht optimal ausgeprägt war.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen an der Modellpflanze *N. benthamiana* zeigten, dass alle hier verwendeten DI- und IR-Konstrukte PTGS induzieren können, auch wenn keine homogene Resistenz innerhalb einer Pflanzenlinie festzustellen war. Für den Nachweis von PTGS und möglicher Virusresistenz wurden GFP-Sensorkonstrukte entwickelt, die eine vorläufige Bewertung der Testpflanze *in vivo* ermöglichen. Mit Inokulationsexperimenten wurde bestätigt, dass transgen-induziertes PTGS zu Virusresistenz gegen GFLV, ArMV und RpRSVg führen kann.

4.3 Charakterisierung transgener Reben

Nach Bestätigung der Transgenität durch PCR und Southern Blot wurden zwischen den verschiedenen Transformanten Abweichungen bei der Akkumulation von mRNA des Transgens festgestellt. Während bei den Transformanten #141, #142 und #157 mit MPd-Konstrukt mRNA nachweisbar war, konnte bei Transformant #130 mit Δ DI2-Konstrukt keine mRNA detektiert werden. Bei keiner dieser Reben erfolgte eine Akkumulation von siRNA transgenen Ursprungs. Bei den Reben mit MPd-Konstrukt konnte somit eine Transkription des Transgens nachgewiesen werden, jedoch fand eine Prozessierung zu siRNA entweder nicht statt, oder die Akkumulation von siRNA blieb unterhalb der Nachweisgrenze. Bei Transformant #130 könnte transkribierte mRNA des Transgens unmittelbar zu siRNA prozessiert worden sein, ohne dass eine detektierbare Akkumulation von mRNA oder siRNA stattfand. Eine andere Möglichkeit wäre, dass keine Transkription des Transgens erfolgte und deshalb keine RNA detektiert werden konnte. Diese Ergebnisse erlauben hier noch keine sichere Aussage, ob die Konstrukte in den transformierten Reben PTGS induzieren, denn wie bereits an der Modellpflanze *N. benthamiana* festgestellt wurde, muss bei etabliertem „silencing“ nicht zwangsläufig transgensspezifische siRNA detektierbar sein.

Um PTGS *in vivo* zu untersuchen, wurde die Agrobakterien-Infiltration des GFP-Sensorkonstrukts an Reben etabliert. Durch Vakuum konnten Agrobakterien erfolgreich

infiltriert und in der Regel eine anschließende GFP-Fluoreszenz in Blättern von WT-Reben festgestellt werden. Aufgrund der den Blättern zugefügten Mikroverletzungen bzw. der Vorbehandlung mit Detergenz, um die Infiltrationseffizienz zu erhöhen, wurden verstärkt Nekrosen verursacht. Eine weitere Optimierung ist daher notwendig, um Agrobakterien-Infiltration als effizientes „screening“-System bei transgenen Reben einsetzen zu können. Mit diesem System könnten transgene Reben mit etabliertem „silencing“ frühzeitig identifiziert und einer weiterführenden Analyse hinsichtlich der Virusresistenz unterzogen werden.

Die mechanische Inokulation mit GFLV war bei Rebenblättern nicht möglich. Ebenso war eine Inokulation von Wurzeln nicht sicher reproduzierbar, um als Resistenztest angewendet werden zu können. Valat *et al.* (2003b) beschrieben die ebenfalls unzuverlässige biolistische Inokulation von Rebenblättern. Die Virusinokulation von Protoplasten aus Reben ist möglich (Valat *et al.*, 2000), aber sehr aufwändig und als „screening“-System ungeeignet. Lahogue *et al.* (1995) inokulierten Reben erfolgreich mit GFLV durch Pfropfung. Die Infektionsrate war jedoch sortenabhängig und darüber hinaus abhängig vom physiologischen Zustand sowie vom Entwicklungsstadium der verwendeten Testreben (Lahogue & Boulard, 1996). Zur Überprüfung von Virusresistenz gelten Pfropftests als nicht aussagekräftig, denn durch den sehr hohen Infektionsdruck könnte eine vorhandene Resistenz möglicherweise unerkant bleiben (Lahogue & Boulard, 1996, Valat *et al.*, 2003a). Bei der Virusinokulation durch Pfropfung gelangt Virus direkt in das vaskuläre System der Testrebe, eine auf Zellebene etablierte Resistenz könnte dadurch umgangen werden (Lahogue & Boulard, 1996). Diese Resistenz auf Zellebene wäre jedoch möglicherweise unter natürlichen Bedingungen ausreichend, um eine Virusinfektion durch Nematoden zu verhindern. Dennoch stellt die Pfropfinokulation neben aufwändigen Inokulationsversuchen mit Nematoden im Freiland und Gewächshaus eine, wenn auch eingeschränkte Möglichkeit dar, um Virusresistenz zu untersuchen (Valat *et al.*, 2003a).

Virusresistenz wurde durch Pfropfung transgener Reben auf bewurzelte, GFLV-infizierte Unterlagen untersucht. Nach neun Monaten Inkubationszeit waren 73% der nicht-transgenen Kontrollen (SO4) mit Virus infiziert. Von den Pfropfungen mit Klon #130, die das Konstrukt Δ DI2-GFLV-MPc enthielten, waren nur 32% infiziert, bei 68% konnte kein Virus mittels ELISA nachgewiesen werden. Beide gepfropften Reiser von Transformant #142 mit dem MPd-Konstrukt als Transgen waren mit GFLV infiziert. Da SO4 als Ausgangsmaterial für

Transformationen der hier getesteten transgenen Reben verwendet wurde, war ein direkter Vergleich im Resistenztest möglich. Lahogue *et al.* (1995) gaben bei Pfropftests mit GFLV-infizierten bewurzelten Unterlagen eine Infektionsrate von 51% für eine Inkubationszeit von fünf Monaten an, nach einem Jahr Inkubationszeit waren 89% der Pfropfreben virusinfiziert. Die in dieser Arbeit festgestellte Infektionsrate bei SO4 von 73% nach neun Monaten entspricht dieser Beobachtung. Obwohl bei Pfropfinokulation die Testreben einem hohen Infektionsdruck ausgesetzt wurden, waren nur 32% der Pfropfreise von Klon #130 infiziert. Diese niedrige Infektionsrate deutet auf eine erhöhte Virusresistenz hin.

Bei der Northern Blot-Analyse von Reben aus den Pfropfversuchen wurde festgestellt, dass bei ELISA-negativ-getesteten Pfropfreisen von Klon #130 weder virale RNA, noch siRNA nachweisbar war. Virusinfizierte Pfropfreise von Klon #130 bzw. SO4 hingegen akkumulierten sowohl virale RNA, als auch siRNA. Das Fehlen von siRNA bei gleichzeitiger Virusresistenz wurde zuvor schon an der Modellpflanze *N. benthamiana* gezeigt. Bei den getesteten Reben sind somit auf RNA-Ebene Parallelen zu *N. benthamiana* zu finden. Bei WT-Reben (SO4) wurde aber im Gegensatz zu *N. benthamiana* WT siRNA von GFLV detektiert. Dies bedeutet, dass in nicht-transgenen Reben PTGS zwar aktiviert wurde, sich aber nicht effizient gegen eine Infektion mit GFLV durchsetzen konnte. Durch die präventive Aktivierung von PTGS könnten transgene Reben durch effizienten Abbau invasiver viraler RNA eine Infektion verhindern. Bei den nicht infizierten Reisern von Transformant #130 könnte dies der Fall sein, auch wenn keine Akkumulation von siRNA nachgewiesen werden konnte. Beide Reiser von Transformant #142, die das MPd-Konstrukt als Transgen enthielten, waren mit GFLV infiziert. Offensichtlich wurde hier PTGS durch die virusabgeleitete „sense“-Sequenz des MPd-Konstrukts nicht induziert. Aufgrund der niedrigen verfügbaren Anzahl an Klonen von Transformant #142 im Experiment müsste dieses Ergebnis durch Wiederholung mit mehreren Pflanzen abgesichert werden.

Bei Reben, deren Resistenz auf „coat protein mediated resistance“ (CPMR) beruht, wird das CP des Zielvirus in den Pflanzenzellen akkumuliert (Gambino *et al.*, 2005, Krastanova *et al.*, 1995, Maghuly *et al.*, 2006, Mauro *et al.*, 1995, Spielmann *et al.*, 2000a, Vigne *et al.*, 2004). Zur Bildung von virusabgeleitetem CP in transgenen Reben werden Ressourcen im Stoffwechsel der Pflanzen beansprucht, die nicht zur Produktion von endogenen Proteinen zur

Verfügung stehen. Dies könnte einen negativen Einfluss auf Ertrag und Qualität der transgenen Reben haben. Eine Rekombination viraler RNA mit der virusabgeleiteten RNA des Transgens konnte bisher zwar nicht nachgewiesen werden, die Entstehung einer neuen Viruslinie durch Bildung von chimärer RNA nach Sequenzaustausch konnte bisher jedoch nicht ausgeschlossen werden (Vigne *et al.*, 2004). Die mögliche Bildung von rekombinanten neuen Virusstämmen stellt einen Unsicherheitsfaktor für den Weinbau dar.

Bei der Induktion von Virusresistenz durch PTGS wird virusabgeleitete mRNA des Transgens zu siRNA prozessiert. Da bei etabliertem PTGS weder virusabgeleitetes Protein, noch mRNA des Transgens in der Pflanze akkumuliert, kann eine Entstehung rekombinanter Viren ausgeschlossen werden. Für PTGS-basierte Virusresistenz spricht die Vermeidung der Akkumulation von virusabgeleitetem Protein durch Transgene sowie die kaum anzunehmende Entstehung von rekombinanten Viren. Der Angriff durch PTGS auf eine hochkonservierte und essentielle Sequenz des Zielvirus verhindert, dass sich das Virus durch Selektion bzw. Mutation dieser sequenzspezifischen Resistenz entzieht.

4.4 Virusinokulation durch Nematoden in der *in vitro* Dualkultur

Um die Feldresistenz für die Anwendung im Weinbau zu untersuchen, ist als Resistenztest die Übertragung von Virus auf natürlichem Weg durch Nematoden notwendig. Inokulationsversuche mit Nematoden im Gewächshaus oder im Freiland in kontaminierten Anlagen sind aufwändig und langwierig (Bouquet, 1981, Staudt, 1997, Valat *et al.*, 2003a, Vigne *et al.*, 2004, Walker & Wolpert, 1994). Transgene Reben, die das GFLV-CP exprimierten, wurden drei Jahre im Feldversuch auf Virusresistenz getestet. Nach dieser Inkubationszeit waren 70% der Kontrollpflanzen virusinfiziert, während in einigen transgenen Linien kein Virus nachweisbar war (Vigne *et al.*, 2004). In Feldversuchen konnten Walker & Wolpert (1994) eine um zehn Jahre verzögerte Virusinfektion bei putativ virusresistenten bzw. toleranten, klassisch gezüchteten Sorten feststellen.

Im Gewächshaus kultivierte Reben wurden durch Nematoden inokuliert, wobei eine Virusinfektion nach fünf Monaten in Blättern mittels ELISA nachweisbar war (Staudt, 1997). Symptome der Reisingkrankheit traten an Blättern infizierter Pflanzen erst nach mehreren Jahren auf (Staudt, 1997). Zur Überprüfung von Virusresistenz durch Inokulation mit

Xiphinema index standen bisher nur die beschriebenen Feld- und Gewächshausversuche zur Verfügung. Nachteilig war hier insbesondere die lange Versuchsdauer von mehreren Monaten oder sogar Jahren. Für Inokulationsversuche im Gewächshaus sind außerdem zahlreiche virulente Nematoden nötig. Bouquet (1981) verwendete für Inokulationsexperimente 50 bis 300 Individuen pro kg Erde. Zur Inokulation von Reben in 25 m³-Behältern wurden 100 bis 150 Nematoden pro kg Substrat verwendet (Valat *et al.*, 2003a). Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, sollten in Gewächshausversuchen mindestens zwanzig Reben pro Linie getestet werden (Staudt, 1997). Diese Vorgaben verdeutlichen den erheblichen Aufwand solcher Inokulationsexperimente, insbesondere bei einer Vielzahl von zu testenden Linien.

Durch die Entwicklung der *in vitro* Dualkultur ist es nun möglich, *in vitro*-Reben unter kontrollierten Bedingungen mit geringem Platzaufwand mittels Nematoden zu inokulieren und auf Virusresistenz zu prüfen. Die Inkubationszeit zur Virusinokulation verkürzt sich außerdem auf nur sechs Wochen. Über diesen Versuchszeitraum wurde eine hohe Überlebensrate der Nematoden bei gleichzeitig gutem Pflanzenwachstum erreicht. Wie bei Feldversuchen bzw. bei der Virusübertragung durch Nematoden im Gewächshaus ist die Inokulationseffizienz auch bei der *in vitro* Dualkultur von der Aktivität der Nematoden abhängig und stellte sich auch hier als limitierender Faktor für die Reproduzierbarkeit der Experimente heraus. Schwankungen bei der Reproduktion in den Nematodenzuchten ließen auf unterschiedliche Aktivitätsphasen der Nematoden schließen und wurden bereits von Kunde *et al.* (1968) und Staudt (1997) beobachtet.

Durch Befall mit *Xiphinema index* wird die Ausbildung von Wurzelgallen an Rebenwurzeln induziert (Brown *et al.*, 1995, Rumpfenhorst & Weischer, 1978, Wyss, 1988). Die Bildung von Wurzelgallen könnte demnach als Indiz für eine erfolgreiche Inokulation durch Nematoden verwendet werden (Staudt, 1997). Besonders interessant war aber die Feststellung, dass beim Parasitieren durch *X. index* an Wurzeln von *in vitro*-Reben nur selten Gallbildung induziert wurde und zudem keine Korrelation mit einer Virusinfektion vorlag. Bei den durch Nematoden mit GFLV infizierten *in vitro*-Reben konnten keine Wurzelgallen nachgewiesen werden. Der direkte Nachweis der Virusinfektion bleibt damit unverzichtbar. An parasitierten Reben aus der Gewächshauskultur konnte dagegen regelmäßig Gallbildung an den Wurzeln festgestellt werden. Die mangelnde Gallbildung an *in vitro*-Reben könnte auf einer

veränderten Physiologie der Pflanzen beruhen. Eventuell könnte die Gallbildung auch auf die Etablierung der Virusinfektion einen hemmenden Einfluss nehmen, denn bei *in vitro*-Reben mit Wurzelgallen konnte in keinem Fall Virus nachgewiesen werden. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass nicht-virulente *X. index* an diesen Pflanzen parasitierten und keine Virusübertragung stattfand. Durch Häutung verlieren Nematoden gebundene Viruspartikel und müssen sich erst an einer Virusquelle neu infizieren (Demangeat *et al.*, 2005). Nicht-virulente Nematoden, die durch Häutung das Virus verloren haben könnten, wurden vereinzelt in der Zucht nachgewiesen.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit einem GFP-Sensorkonstrukt konnte *in vivo* gezeigt werden, dass alle verwendeten IR- und DI-Konstrukte PTGS in *N. benthamiana* induzierten. Transgen-induziertes PTGS führte zu erhöhter Resistenz gegen die Nepoviren GFLV, ArMV und RpRSVg. Eine Korrelation von Virusresistenz mit Akkumulation von siRNA viralen bzw. transgenen Ursprungs konnte nicht festgestellt werden. Dies ergibt einen interessanten, neuen Aspekt für das anerkannte Modell, welches besagt, dass bei etabliertem PTGS siRNA akkumuliert wird. Durch weiterführende Versuche gilt es nun zu prüfen, wie die hier gezeigten Ergebnisse im PTGS-Modell eingeordnet werden können. Um die beteiligten „silencing“-Komponenten zu identifizieren, könnten z. B. verschiedene RDR und DCL gezielt inaktiviert werden, um deren Funktion genauer zu analysieren. Weitere Erkenntnisse über die Prozessierung von mRNA des Transgens, viraler RNA oder mRNA aus der Infiltration könnten damit gewonnen werden.

Um PTGS auch bei Reben *in vivo* nachweisen zu können, wurde die Grundlage für die Agrobakterien-Infiltration an Rebenblättern gelegt. Eine Überprüfung der Effizienz von transgen-induziertem PTGS mittels optimierter Agrobakterien-Infiltration würde eine frühzeitige Vorauswahl von Transformanten mit etabliertem PTGS ermöglichen.

Transgene Reben mit dem Konstrukt Δ DI2-GFLV-MPc weisen im Pfropftest auf eine eventuelle Virusresistenz hin, wobei siRNA nicht akkumulierten. Die im Pfropftest festgestellte Resistenz bei Klonen von Transformant #130 muss in weiterführenden Untersuchungen auf Dauerhaftigkeit und Zuverlässigkeit überprüft werden.

Um langwierige Inokulationsexperimente im Gewächshaus und Feldversuche zu vermeiden, wurde eine *in vitro* Dualkultur entwickelt, mit der Reben unter kontrollierten Bedingungen innerhalb eines kurzen Zeitraums auf Virusresistenz überprüft werden können. Es wurde festgestellt, dass Gallbildung nicht mit Virusinfektion bei *in vitro*-Reben korrelierte. Das Fehlen von Wurzelgallen bei parasitierten *in vitro*-Reben kann somit nicht als Hinweis für eventuelle Virus- oder Nematodenresistenz verwendet werden.

Die Virusresistenz transgener Reben muss auch unter natürlichen Bedingungen getestet werden, wozu letztendlich Freisetzungsversuche notwendig sind. In diesem Zusammenhang muss besonders auf die Auswirkung der Temperatur auf den „silencing“-Mechanismus geachtet werden. Die Temperatur im Boden könnte eine wichtige Rolle für die Effizienz von PTGS in Wurzeln spielen. Für die Virusresistenz stellt dies einen wichtigen Gesichtspunkt dar, denn Wurzeln sind die Eintrittspforten für die Infektion mit Nepoviren.

Die Reisigkrankheit konnte bisher nur durch vorbeugende Maßnahmen, wie die Verwendung von virusfreiem zertifiziertem Pflanzgut, kontrolliert werden. Die Bekämpfung der Vektornematoden ist nur über Bodenentseuchung möglich, die jedoch ökologisch bedenklich und außerdem in vielen Ländern nicht erlaubt ist. Da für klassische Züchtung keine geeigneten Resistenzgene bekannt sind, wurde mit Hilfe gentechnischer Methoden Virusresistenz induziert. Die verwendeten PTGS-induzierenden Konstrukte konnten bei transgenen *N. benthamiana* zu erhöhter Virusresistenz führen. Wird in weiterführenden Untersuchungen die Effizienz und Dauerhaftigkeit der Resistenz bestätigt, könnten in Zukunft virusresistente Reben für den Weinbau zur Verfügung stehen.

5 Zusammenfassung

Die durch Nepoviren verursachte Reissigkrankheit führt zu beträchtlichen Einbußen im Weinbau (Raski *et al.*, 1983). Um Resistenz durch „post transcriptional gene silencing“ (PTGS) gegen die Nepoviren Grapevine fanleaf virus (GFLV), Arabis mosaic virus (ArMV) und Raspberry ringspot virus (RpRSV) zu induzieren, wurden Reben mit „inverted repeat“-Konstrukten bzw. mit Konstrukten transformiert, die „defective interfering“-Sequenzen aus Tomato bushy stunt virus (TBSV) in Kombination mit konservierten viralen Sequenzen des Zielvirus enthielten (Reustle *et al.*, 2005). Die Induktion und Effizienz von PTGS durch die verschiedenen Konstrukte wurde an der Modellpflanze *Nicotiana benthamiana* untersucht. PTGS konnte über die Akkumulation von transgenspezifischer „small interfering“ (si)RNA in *N. benthamiana* nachgewiesen werden. Durch Agrobakterien-Infiltration eines GFP-Sensorkonstrukts wurde die Effizienz von etabliertem PTGS in transgenen *N. benthamiana* überprüft. GFP-exprimierende Pflanzen akkumulierten in den infiltrierten Blättern am ersten Tag nach der Infiltration mRNA des Infiltrats. Ab dem zweiten Tag nach der Infiltration wurde siRNA mit GFP- und virusspezifischer Sequenz detektiert. In Pflanzen, die keine GFP-Fluoreszenz zeigten, war weder mRNA, noch siRNA des infiltrierten Sensorkonstrukts nachweisbar. Bei virusresistenten Pflanzen konnte in der Regel keine GFP-Fluoreszenz nach der Agrobakterien-Infiltration festgestellt werden. Eine Korrelation von Virusresistenz mit der Akkumulation von viraler oder transgenspezifischer siRNA lag nicht vor.

Verschiedene Systeme zur Evaluierung von PTGS und Virusresistenz in Reben wurden überprüft. Eine Akkumulation von siRNA, die auf transgen-induziertes PTGS hinweist, konnte bei Reben nicht festgestellt werden. Durch Virusinokulation mittels Pfropfung der transgenen Reben auf virusinfizierte Unterlagen konnte zumindest eine verminderte Virusanfälligkeit einer transgenen Linie festgestellt werden. Virusinfizierte transgene Reben

und nicht-transgene Kontrollreben akkumulierten sowohl virale RNA, als auch siRNA. In transgenen Reben, die keine Virusinfektion zeigten, war weder virale RNA, noch siRNA zu detektieren. Eine etablierte Virusresistenz durch transgen-induziertes PTGS in transgenen *N. benthamiana* korrelierte nicht mit der Akkumulation von siRNA.

Resistenzanalysen über Inokulation durch Pfropfung sind schwierig zu interpretieren, da durch den hohen Infektionsdruck eine eventuell vorhandene Feldresistenz nicht festgestellt werden kann. Um PTGS an Rebenblättern *in vivo* zu überprüfen, wurde eine Methode zur Agrobakterien-Infiltration durch Vakuum etabliert. Zur Virusinokulation durch Vektornematoden von Reben stehen sehr aufwändige und langwierige Freiland- bzw. Gewächshausversuche zur Verfügung. Eine *in vitro* Dualkultur wurde zur Inokulation mit *Xiphinema index*, dem natürlichen Vektor für GFLV, entwickelt. Mit diesem Inokulationssystem ist es möglich, die Resistenz von Reben unter kontrollierten Bedingungen auf kleinem Raum innerhalb kurzer Zeit zu testen. Bei Kontrollreben wurde eine Virusinfektion schon nach sechs Wochen Inkubationszeit nachgewiesen.

6 Summary

Nepoviruses are the causal agent of the fanleaf disease which leads to severe loss in viticulture (Raski *et al.*, 1983). To induce virus resistance by post transcriptional gene silencing (PTGS) against Grapevine fanleaf virus (GFLV), Arabis mosaic virus (ArMV) and Raspberry ringspot virus (RpRSV), grapevine rootstocks were transformed with inverted repeat constructs or constructs containing sequences of the target virus and the defective interfering (DI) sequence of Tomato bushy stunt virus (Reustle *et al.*, 2005). The induction and efficiency of PTGS by different constructs were investigated on the model plant *Nicotiana benthamiana*. Transgene-induced PTGS was demonstrated by the detection of small interfering (si)RNA in *N. benthamiana*. Using *Agrobacterium* for infiltration of a GFP-sensor construct, consisting of the GFP expression cassette and the sequence of the target virus, the efficiency of established transgene-induced PTGS was investigated. GFP-expressing plants accumulated mRNA of the sensor construct after the first day post infiltration in infiltrated leaves. After the second day the accumulation of siRNA with GFP- and virus-specific sequences was detected. In plants, which did not show any GFP-fluorescence after infiltration, GFP or viral sequence specific siRNA were not detectable. Generally, in virus resistant plants GFP-fluorescence was absent after infiltration. A correlation of virus resistance and accumulation of virus- or transgene-specific siRNA was not found.

Several systems to evaluate PTGS and virus resistance in transgenic grapevine were tested. Transgenic grapevine did not accumulate transgene specific siRNA. An elevated resistance of transgenic grapevine was discovered by grafting experiments onto virus infected rootstocks. Whereas virus infected grapevine accumulated virus- and transgene-specific RNA and siRNA, in the non-infected grafts viral RNA was not detectable. Obviously, degradation of

viral RNA in resistant grapevine und *N. benthamiana* was rapid und highly efficient without leading to accumulation of siRNA.

However, due to the high inoculum pressure, grafting experiments are difficult to interpret and a possible field resistance against natural infection by the vector nematodes is probably not detectable. For investigation of PTGS in transgenic grapevine *in vivo* a system for vacuum infiltration to transfer the GFP-sensor construct into leaf tissue was established. For inoculation of grapevine using the natural GFLV vector nematode *Xiphinema index* an *in vitro* dual culture was developed. This space saving system allows analysis of resistance of grapevine under controlled conditions within a short time. An incubation time of about only six weeks was sufficient for the inoculation of control plants.

7 Literatur

- Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P., Stussi-Garaud, C. & Fuchs, M. 2004a. Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry. *J Plant Pathol* 86: 183-195.
- Andret-Link, P., Schmitt-Keichinger, C., Demangeat, G., Komar, V. & Fuchs, M. 2004b. The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology* 320: 12-22.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-97.
- Baulcombe, D. 1999. Viruses and gene silencing in plants. *Arch Virol* 15: 189-201.
- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-63.
- Baulcombe, D. C. 1996. Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. *Plant Cell* 8: 1833-1844.
- Baumberger, N. & Baulcombe, D. C. 2005. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11928-33.
- Bavaresco, L. & Walker, M. A. 1994. Techniques for Successfully Establishing *Xiphinema index* in Dual Culture with Grape. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 273-277.
- Belin, C., Schmitt, C., Demangeat, G., Komar, V., Pinck, L. & Fuchs, M. 2001. Involvement of RNA2-encoded proteins in the specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index*. *Virology* 291: 161-71.
- Bertioli, D. J., Harris, R. D., Edwards, M. L., Cooper, J. I. & Hawes, W. S. 1991. Transgenic plants and insect cells expressing the coat protein of arabis mosaic virus produce empty virus-like particles. *J Gen Virol* 72 (Pt 8): 1801-9.
- Boonrod, K., Galetzka, D., Nagy, P. D., Conrad, U. & Krczal, G. 2004. Single-chain antibodies against a plant viral RNA-dependent RNA polymerase confer virus resistance. *Nat Biotechnol* 22: 856-62.
- Bouquet, A. 1981. Resistance to Grape Fanleaf Virus in Muscadine Grape Inoculated with *Xiphinema index*. *Plant Dis.* 65: 791-793.

- Bouquet, A., Danglot, Y., Torregrosa, L., Bongiovanni, M. & Castagogne-Sereno, P. 2000. Breeding rootstocks resistant to Grape fanleaf virus spread, using *Vitis x Muscadinia* hybridization. *Acta Hort.* 528: 517-523.
- Bovey, R., Gärtel, W., Hewitt, W. B., Martelli, G. P. & Vuittenez, A. 1980. Virosen und virusähnliche Krankheiten der Rebe, pp. 181. Stuttgart: Eugen Ulmer.
- Brown, D. J., Robertson, W. M. & Trudgill, D. L. 1995. Transmission of Viruses by Plant Nematodes. *Ann Rev Phytopathol* 33: 223-249.
- Brown, D. J. & Trudgill, D. L. 1983. Differential transmissibility of arabis mosaic and strains of strawberry latent ringspot viruses by three populations of *Xiphinema diversicaudatum* (Nematoda: Dorylaimida) from Scotland, Italy and France. *Revue Nematol* 6: 229-238.
- Cakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saumonneau, A., Delrot, S. & Atanassova, R. 2003. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 2165-80.
- Chan, S. W., Zilberman, D., Xie, Z., Johansen, L. K., Carrington, J. C. & Jacobsen, S. E. 2004. RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science* 303: 1336.
- Chen, J., Li, W. X., Xie, D., Peng, J. R. & Ding, S. W. 2004. Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell* 16: 1302-13.
- Cindric, P., Korac, N. & Kovac, V. 2003. Grape Breeding for Resistance. *Acta Hort.* 603.
- Day, C. D., Lee, E., Kobayashi, J., Holappa, L. D., Albert, H. & Ow, D. W. 2000. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev* 14: 2869-80.
- De Jaeger, G., De Wilde, C., Eeckhout, D., Fiers, E. & Depicker, A. 2000. The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. *Plant Mol Biol* 43: 419-28.
- Demangeat, G., Voisin, R., Minot, J.-C., Bosselut, N., Fuchs, M. & Esmenjaud, D. 2005. Survival of *Xiphinema index* in Vineyard Soil and Retention of Grapevine fanleaf virus Over Extended Time in the Absence of Host Plants. *Phytopathol* 95: 1151-1156.
- Dunoyer, P. & Voinnet, O. 2005. The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. *Curr Opin Plant Biol* 8: 415-23.
- Ebel, R., Schnabel, A., Reustle, G. M., Krczal, G. & Wetzel, T. 2003. Complete nucleotide sequence of an isolate of the nepovirus raspberry ringspot virus from grapevine. *Virus Res* 97: 141-4.
- Edwards, K., Johnstone, C. & Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acids Res* 19: 1349.
- Franconi, R., Roggero, P., Pirazzi, P., Arias, F. J., Desiderio, A., Bitti, O., Pashkoulov, D., Mattei, B., Bracci, L., Masenga, V., Milne, R. G. & Benvenuto, E. 1999. Functional expression in bacteria and plants of an scFv antibody fragment against tospoviruses. *Immunotechnology* 4: 189-201.
- Fuchs, M. 2003. Transgenic resistance: States of the art and perspectives. Locorotondo, Italy: ICVG.

- Gaire, F., Schmitt, C., Stussi-Garaud, C., Pinck, L. & Ritzenthaler, C. 1999. Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA 2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology* 264: 25-36.
- Gambino, G., Gribaudo, I., Leopold, S., Scharl, A. & Laimer, M. 2005. Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: I. *Plant Cell Rep* 24: 655-62.
- Granett, J., Goheen, A. C., Lider, L. A. & White, J. J. 1987. Evaluation of Grape Rootstocks for Resistance to Type A and Type B Grape *Phylloxera*. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 298-300.
- Guo, H. S. & Ding, S. W. 2002. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J* 21: 398-407.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z. & Maliga, P. 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25: 989-994.
- Haley, B. & Zamore, P. D. 2004. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* 11: 599-606.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. & Baulcombe, D. 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 21: 4671-9.
- Hamilton, A. J. & Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-2.
- Hammond, S. M. 2005. Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett* 579: 5822-5829.
- Hannon, G. J., Jorgensen, R., Birchler, J. A., Pal-Bhadra, M., Bhadra, U., Matzke, A. J., Matzke, M., Mette, M. F., Kanno, T., Aufsatz, W., Ketting, R. F., Tijstermann, M., Plasterk, R. H., Zamore, P. D., McManus, M. T., Conklin, D. S., Martinissen, R., Volpe, T., Lippmann, Z., Gendrel, A.-V., Kidner, C., Rabinowicz, P., Colot, V., Nicholson, A. W., Huang, L., Gledhill, J., Cameron, C. E., Hall, I. M. & Grewal, S. I. S. 2003. RNAi - A Guide to Gene Silencing, Hannon, G. J. edn, pp. 436. New York: Inglis, J.
- Helliwell, C. A. & Waterhouse, P. M. 2005. Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants. *Methods Enzymol* 392: 24-35.
- Henningsen, M. 2003. Moderne Fungizide: Pilzbekämpfung in der Landwirtschaft. *Chemie in unserer Zeit* 37: 98-111.
- Herr, A. J. 2005. Pathways through the small RNA world of plants. *FEBS Lett* 579: 5879-88.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C. & Voinnet, O. 2003. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* 22: 4523-33.
- Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T. & Chilton, M. D. 1986. The hypervirulence region of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region outside of T-DNA. *J Bacteriol* 168: 1291-1301.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. & Fraley, R. T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.

- Hull, R. 2002. Matthews' Plant Virology, 4th ed. edn, pp. 1023. San Diego, CA: Academic Press.
- Jardak-Jamoussi, R., Bouamama, B., Wetzel, T., Mliki, A., Reustle, G. M. & Ghorbel, A. 2003. Evaluation of Different Gene Constructs for Production of Resistant Grapevines against Grapevine Fanleaf and Arabis Mosaic Viruses. *Acta Hort.* 1: 315-324.
- Johansen, L. K. & Carrington, J. C. 2001. Silencing on the Spot. Induction and Suppression of RNA Silencing in the Agrobacterium-Mediated Transient Expression System. *Plant Physiol* 126: 930-938.
- Jones, L., Hamilton, A. J., Voinnet, O., Thomas, C. L., Maule, A. J. & Baulcombe, D. C. 1999. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 11: 2291-301.
- Kalantidis, K. 2004. Grafting the way to the systemic silencing signal in plants. *PLoS Biol* 2: E224.
- Kalantidis, K., Psaradakis, S., Tabler, M. & Tsagris, M. 2002. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 826-33.
- Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M. & Angenon, G. 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient expression system for intact leaves. *Plant Science* 122: 101-108.
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A. & Carrington, J. C. 2003. P1/Hc-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev Cell* 4: 205-217.
- Kavi, H. H., Fernandez, H. R., Xie, W. & Birchler, J. A. 2005. RNA silencing in *Drosophila*. *FEBS Lett* 579: 5940-9.
- Krastanova, T., Perrin, M., P., B., G., D., Cornuet, P., Bardonnet, N., Otten, L., Pinck, L. & Walter, B. 1995. Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Rep* 14: 550-554.
- Kunde, R. M., Lider, L. A. & Schmitt, R. V. 1968. A test of *Vitis* resistance to *Xiphinema index* *Am. J. Enol. Vitic.* 19: 30-36.
- Lahogue, F. & Boulard, G. 1996. Recherche de gènes de résistance naturelle à deux viroses de la vigne: Le court-noué et l'enroulement. *Vitis* 35: 43-48.
- Lahogue, F., Boulard, G. & Schneider, C. 1995. Comparaison de différentes techniques de greffage vis-à-vis de leur efficacité de transmission virale sur vigne. *Vitis* 34: 177-183.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D. & Burgyan, J. 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J* 23: 876-84.
- Le Gall, O., Candresse, T., Brault, V. & Dunez, J. 1989. Nucleotide sequence of Hungarian grapevine chrome mosaic nepovirus RNA1. *Nucl Acids Res* 17: 7795-7807.
- Li, X. H., Heaton, L. A., Morris, T. J. & Simon, A. E. 1989. Turnip crinkle virus defective interfering RNAs intensify viral symptoms and are generated *de novo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9173-9177.
- Lider, L. A. 1957. *Phylloxera*-Resistant Rootstock Trials in the Coastal Valleys of California. *Am. J. Enol. Vitic.* 8: 58-67.

- Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M. & 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.
- Linsmaier, E. M. & Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18: 100-127.
- Llave, C., Kasschau, K. D., Rector, M. A. & Carrington, J. C. 2002. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14: 1605-19.
- Louis, F., Schmidt-Tiedemann, A. & Schirra, K.-J. 2002. Control of *Sparganothis pilleriana* Schiff. and *Lobesia botrana* Den. & Schiff. in German vineyards using sex pheromone-mediated mating disruption. *IOBC Bulletin* 25: pp.
- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W. X., Falk, B. W., Dawson, W. O. & Ding, S. W. 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 15742-7.
- Maghuly, F., Leopold, S., da Camara Machado, A., Borroto Fernandez, E., Ali Khan, M., Gambino, G., Gribaudo, I., Scharl, A. & Laimer, M. 2006. Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: II. *Plant Cell Rep*: 1-8.
- Mallory, A. C., Mlotshwa, S., Bowman, L. H. & Vance, V. B. 2003. The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. *Plant J* 35: 82-92.
- Mallory, A. C., Reinhart, B. J., Bartel, D., Vance, V. B. & Bowman, L. H. 2002. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15228-33.
- Mannini, F. 2000. Effect of Viruses on Grape Yield and Quality in Cool Climate Environment. *In* 5th International Symposium on Cool Climate and Viticulture, pp. 1-5. Melbourne, Australia.
- Mannini, F. 2003. Virus Elimination in Grapevine and Crop Performance. *In* 14th ICVG Conference, pp. 234-239. Locorotondo (Bari), Italy.
- Margis, R., Hans, F. & Pinck, L. 1993. VPg Northern-immunoblots as a means for detection of viral RNAs in protoplasts or plants infected with grapevine fanleaf nepovirus. *Arch Virol* 131: 225-32.
- Margis, R., Viry, M., Pinck, M., Bardonnet, N. & Pinck, L. 1994. Differential proteolytic activities of precursor and mature forms of the 24K proteinase of grapevine fanleaf nepovirus. *Virology* 200: 79-86.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P. & Zamore, P. D. 2005. Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes. *Cell* 123: 607-20.
- Mauro, M., Toutain, S., Walter, B., Pinck, L., Otten, L., Coutos Thévenot, P., Deloire, A. & Barbier, P. 1995. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Science* 112: 97-106.

- Mayo, M. A. & Robinson, D. J. 1996. Nepoviruses: molecular biology and replication. *In* The Plant Viruses, pp. 139-185. Edited by B. D. Harrison & A. F. Murant. New York: Plenum Press.
- Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. A. & Matzke, A. J. 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 19: 5194-201.
- Metzlaff, M. 2002. RNA-mediated RNA degradation in transgene- and virus-induced gene silencing. *Biol Chem* 383: 1483-9.
- Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, M. F., Matzke, M., Vaucheret, H., Ding, S. W., Pruss, G. & Vance, V. B. 2002. RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell* 14 Suppl: S289-301.
- Molnar, A., Csorba, T., Lakatos, L., Varallyay, E., Lacomme, C. & Burgyan, J. 2005. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J Virol* 79: 7812-8.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. & Summers, M. D. e. 1995. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. *In* Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology - Supplement* 10, pp. 586. Wien, New York: Springer-Verlag.
- Nakayashiki, H. 2005. RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. *FEBS Lett* 579: 5950-7.
- Napoli, C., Lemieux, C. & 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.
- Naumer, C. 2005. Evaluation of a Viral Vector System Based on a Defective Interfering RNA of Tomato bushy stunt virus for Protein Expression and the Induction of Gene Silencing. *In* *FB Biologie*, pp. 115. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität.
- Nölke, G., Fischer, R. & Schillberg, S. 2004. Antibody-based resistance in plants. *J Plant Physiol* 86: 5-17.
- Ooms, G., hooykaas, P., Van Veen, R., Van Beelen, P., Regensburg-Tunk, T. & Schliperoort, R. 1982. Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid* 7: 15-29.
- Papp, I., Mette, M. F., Aufsatz, W., Daxinger, L., Schauer, S. E., Ray, A., van der Winden, J., Matzke, M. & Matzke, A. J. 2003. Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol* 132: 1382-90.
- Pearson, R. C. & Riegel, D. G. 1983. Control of Botrytis Bunch Rot of Ripening Grapes: Timing Applications of the Dicarboximide Fungicides. *Am. J. Enol. Vitic.* 34: 167-172.

- Pelissier, T., Thalmeir, S., Kempe, D., Sanger, H. L. & Wassenegger, M. 1999. Heavy de novo methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucl Acids Res* 27: 1625-34.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F. A., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., John, B., Enright, A. J., Marks, D., Sander, C. & Tuschl, T. 2004. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304: 734-6.
- Pinck, M., Reinbolt, J., Loudes, A. M., Le Ret, M. & Pinck, L. 1991. Primary structure and location of the genome-linked protein (VPg) of grapevine fanleaf nepovirus. *FEBS Lett* 284: 117-9.
- Qiu, W., Park, J. W. & Scholthof, H. B. 2002. Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 269-80.
- Qu, F. & Morris, T. J. 2005. Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *FEBS Lett* 579: 5958-64.
- Rand, T. A., Petersen, S., Du, F. & Wang, X. 2005. Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation. *Cell* 123: 621-9.
- Raski, D. J., Goheen, A. C., Lider, L. A. & Meredith, C. P. 1983. Strategies Against Grapevine Fanleaf Virus and its Nematode Vector. *Plant Dis.* 67: 335-339.
- Ray, D. & White, K. A. 2003. An internally located RNA hairpin enhances replication of Tomato bushy stunt virus RNAs. *J Virol* 77: 245-57.
- Reimann-Philipp, U. 1998. Mechanisms of resistance. Expression of coat protein. *Methods Mol Biol* 81: 521-32.
- Renault, A. S., Deloire, A., Letinois, I., Kraeva, E., Tesniere, C., Ageorges, A., Redon, C. & Bierre, J. 2000. β -1,3-Glucanase Gene Expression in Grapevine Leaves as a Response to Infection With *Botrytis cinera*. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 81-87.
- Reustle, G. M., Ebel, R., Winterhagen, P., Manthey, T., Dubois, C., Baßler, A., Sinn, M., Cobanov, C., Wetzel, T., Jardak-Jamoussi, R., Ghorbel, A. & Krczal, G. 2005. Induction of Gene Silencing in Transgenic Grapevine *Vitis sp.* *Acta Hort.* 689: in press.
- Reustle, G. M., Wallbraun, M., Zwiebel, M., Wolf, R., Manthey, T., Burkhardt, C., Lerm, T., Vivier, M. & Krczal, G. 2003. Selectable Marker Systems for Genetic Engineering of Grapevine. *Acta Hort.* 2: 485-490.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212.
- Rogers, S. O. & Bendich, A. J. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. *In Plant Molecular Biology Manual*, pp. A6: 1-10.
- Roth, B. M., Pruss, G. J. & Vance, V. B. 2004. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res* 102: 97-108.
- Rubio, T., Borja, M., Scholthof, H. B., Feldstein, P. A., Morris, T. J. & Jackson, A. O. 1999. Broad-spectrum protection against tombusviruses elicited by defective interfering RNAs in transgenic plants. *J Virol* 73: 5070-8.

- Rumpfenhorst, J., Hans & Weischer, B. 1978. Histopathological and histochemical studies on grapevine roots damaged by *Xiphinema index*. *Revue Nematol* 1: 217-225.
- Scholthof, K. B., Scholthof, H. B. & Jackson, A. O. 1995. The effect of defective interfering RNAs on the accumulation of tomato bushy stunt virus proteins and implications for disease attenuation. *Virology* 211: 324-8.
- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M. & Burgyan, J. 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J* 21: 3070-80.
- Simon, A. E., Roossinck, M. J. & Havelda, Z. 2004. Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Ann Rev Phytopathol* 42: 415-37.
- Spielmann, A., Douet-Orhant, V., Krastanova, S. & Gugerli, P. 2000a. Resistance to nepoviruses in grapevine and *Nicotiana benthamiana*: Expression of several putative resistance genes in transgenic plants. *Acta Hort.* 528: 373-378.
- Spielmann, A., Krastanova, S., Douet-Orhant, V. & Gugerli, P. 2000b. Analysis of transgenic grapevine (*Vitis rupestris*) and *Nicotiana benthamiana* plants expressing an Arabis mosaic virus coat protein gene. *Plant Science* 156: 235-244.
- Staudt, G. 1997. A quick-test for screening resistance to transmission of grapevine fanleaf virus by *Xiphinema index*. *Vitis* 36: 155-156.
- Sultan, S. A. & Howard, F. 1991. The effect of soil moisture and soil particle size on the survival and population increase of *Xiphinema index*. *Revue Nematol* 14: 345-351.
- Sunkar, R. & Zhu, J. K. 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2001-19.
- Szittyá, G., Silhavy, D., Molnar, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Banfalvi, Z. & Burgyan, J. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J* 22: 633-40.
- Takeda, A., Tsukuda, M., Mizumoto, H., Okamoto, K., Kaido, M., Mise, K. & Okuno, T. 2005. A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO J* 24: 3147-3157.
- Tenllado, F., Llave, C. & Diaz-Ruiz, J. R. 2004. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Res* 102: 85-96.
- Thomas, M. R., Matsumo, P., Cain, P. & Scott, N. S. 1993. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 173-180.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. & Zamore, P. D. 2004. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306: 1377-80.
- Valat, L., Burrus, M., Fuchs, M. & Mauro, M.-C. 2003a. Review of Techniques to Inoculate Grapevines with Grapevine Fanleaf Virus: Lessons and Perspectives. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 279-285.
- Valat, L., Mode, F., Mauro, M. C. & Burrus, M. 2003b. Preliminary attempts to biolistic inoculation of grapevine fanleaf virus. *J Virol Method* 108: 29-40.

- Valat, L., Toutain, S., Courtois, N., Gaire, F., Decout, E., Pinck, L., Mauro, M. & Burrus, M. 2000. GFLV replication in electroporated grapevine protoplasts. *Plant Science* 155: 203-212.
- van der Wilk, F., Korsman, M. & Zoon, F. 1994. Detection of tobacco rattle virus in nematodes by reverse transcription and polymerase chain reaction. *Europ J Plant Pathol* 100: 109 - 122.
- Vaucheret, H., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Mourrain, P., Palauqui, J. C. & Vernhettes, S. 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J* 16: 651-9.
- Vigne, E., Komar, V. & Fuchs, M. 2004. Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus. *Transgenic Res* 13: 165-79.
- Voinnet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* 17: 449-59.
- Voinnet, O. 2005a. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* 6: 206-20.
- Voinnet, O. 2005b. Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Lett* 579: 5858-71.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. & Baulcombe, D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33: 949-956.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. & Baulcombe, D. C. 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95: 177-87.
- Walker, M. A. & Wolpert, J. A. 1994. Field Screening of Grapevine Rootstock Selections for Resistance to Fanleaf Degeneration. *Plant Dis.* 78: 134-136.
- Wang, S., Gergerich, R. C., Wickizer, S. L. & Kim, K. S. 2002. Localization of Transmissible and Nontransmissible Viruses in the Vector Nematode *Xiphinema americanum*. *Virology* 92: 646-653.
- Wassenegger, M. & Krczal, G. 2006. Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.*
- Wassenegger, M. & Pelissier, T. 1998. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Mol Biol* 37: 349-62.
- Waterhouse, P. M., Graham, M. W. & Wang, M. B. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13959-64.
- Waterhouse, P. M., Wang, M. B. & Finnegan, E. J. 2001a. Role of short RNAs in gene silencing. *Trends Plant Sci* 6: 297-301.
- Waterhouse, P. M., Wang, M. B. & Lough, T. 2001b. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411: 834-42.
- Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M. B., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., Robinson, S. P., Gleave, A. P.,

- Green, A. G. & Waterhouse, P. M. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27: 581-90.
- Wetzel, T., Meunier, L., Jaeger, U., Reustle, G. M. & Krczal, G. 2001. Complete nucleotide sequences of the RNAs 2 of German isolates of grapevine fanleaf and Arabis mosaic nepoviruses. *Virus Res* 75: 139-45.
- White, K. A. & J., M. T. 1999. Defective and defective interfering RNAs of minopartite plus-strand RNA plant viruses. *Current Top Microbiol Immunol* 239: 1-17.
- White, K. A. & Morris, T. J. 1994. Nonhomologous RNA Recombination in Tombusviruses: Generation and Evolution of Defective Interfering RNAs by Stepwise Deletions. *J Virol* 68: 14-24.
- Wienholds, E. & Plasterk, R. H. 2005. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 579: 5911-22.
- Wingard, S. A. 1928. Hosts and symptoms of ringspot, a virus disease of plants. *Journal of Agricultural Research* 37: 127-153.
- Wyss, U. 1988. Reaktion von Wurzelzellen auf die Saugtätigkeit des Nematoden *Xiphinema index*. In Publikationen zu wissenschaftlichen Filmen. Göttingen: Institut für den wissenschaftlichen Film.
- Wyss, U., Robertson, W. M. & Trudgill, D. L. 1988. Oesophageal bulb function of *Xiphinema index* - and associated root cell responses, assessed by video-enhanced contrast light microscopy. *Revue Nematol* 11: 253-261.
- Xie, Z., Fan, B., Chen, C. & Chen, Z. 2001. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6516-21.
- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E. & Carrington, J. C. 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2: E104.
- Yang, S. J., Carter, S. A., Cole, A. B., Cheng, N. H. & Nelson, R. S. 2004. A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 6297-302.
- Yoo, B. C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y. M., Lough, T. J. & Lucas, W. J. 2004. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* 16: 1979-2000.
- Zamore, P. D. 2004. Plant RNAi: How a viral silencing suppressor inactivates siRNA. *Curr Biol* 14: R198-200.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. & Anderson, T. A. 2006. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Dev Biol* 289: 3-16.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl Acids Res* 31: 3406-15.

Tab. 13: Verwendete Primerkombinationen

Primer	Sequenz 5' - 3'	Tm (C°)	PCR-Produkt (bp)	Zielssequenz	Verwendung
vv-ASR-100-forw	TACTCCGACACCAGCTATGC	63	458	V. <i>vulnifer</i> -ASR	qRT-PCR
vv-ASR-rew	GCATGCCGTCTAGAAAAAGATGGTGAATGC	68			
35S-forw-33	ACGACACTCTCGTCTACTCC	62	373	35S-Promotor	qRT-PCR
35S-rew-406	GAGGAAAGGGCTTGGCGAAGG	64			
A-CP2	AGTGGTAGTGCAGATTGATG	59	392	AnMV-CP	RT-PCR, Sondentemplate AnMV-CP
NW17-CP2	GCAAAAATTACCCTATGTACAG	53			
GCP1	TCCACAACATTTGAGTCTCC	59	1156	GFLV-CP	RT-PCR, Sondentemplate GFLV-CP
GFLV-3-XhoI	GACTGGGAAACTAGTTCTTCC	59			
RNA2-1400-1418f	CAAGTTCACCCTCAAAAAGCG	59	505	RpRSVg-a2/MP	RT-PCR, Sondentemplate RpRSVg-a2/MP
RRV-RNA2r	AGGACTCTATTTCAGAGCAGT	58			
AMPc-BcI1	TGATCAACGACAGTAAAGATCGGTCGG	68	352	AnMV-MPc	PCR, RT-PCR, Sondentemplate AnMV-MP
AMPc-BgI2	AGATCTGCTGCTCAAACCTGACATGAC	67			
MPc1	TACCGACTGGGACGAACACATTGG	68	298	GFLV-MPc	PCR, RT-PCR, qRT-PCR, Sondentemplate GFLV-MP
MPc2	AGATTCAAGCCTTGGTTCCTCCTG	68			
ch-K-BgI2	AGATCTCCCTGTGGCTCCGGGTTAAT	70	366	RpRSVg-NCR	PCR, RT-PCR, Sondentemplate RpRSVg-NCR
ch-K-Pst1	CTGCAGGGCTTAAGAACAATAAATAAAT	61			
Sma1-GFP-3	CCCGGGTTTTGTATAGTTTCATCCATGCC	67	712	mGFP5	PCR, Sondentemplate mGFP5
Sma1-GFP-5	CCCCGGTAAAGGAGAGAAGCACTTTTC	63			
MP2	CTAGATTTTAGGCTCAATGG	55	618	GFLV-MP	RT-PCR
MP4	GTTATCCACTTT	34			
Ind	GAGTCGTAACGTTTCTCGTCTATCAG	53	340	X. <i>index</i> -ITS1-Region	RT-PCR
GenR	ACGAAGCCGAGTGAATGCACCCGATTAAG	56			
nad1	TAGCCCGAACCCTAGTATGTTAA	72	803	NAD-Dehydrogenase	PCR
nad2	ATCACCGAAACCTGCACCTCAGGAA	74			
pBAR1	TCTGCACCATCGTCAACCACCTACA	67	322	BAR Markergen	PCR, qRT-PCR
pBAR2	GCAAGCCCGATGACAGCCGACCAC	72			
XhoI BamHI-GFLV-CPfor	CTCGAGGGATCCACAAAAAGAGTTGGCGGCAGAC	64	331	GFLV-CP	Klonierung GFP-Infiltrationskonstrukt
XhoI BamHI-GFLV-CPrew	CTCGAGGGATCCGCACAAATGTGCACCCCTTCC	65			
5-AnMV-BamHI	AAAGGATCCACGACAGTAAAGATCGGTC	65	349	AnMV-MPc	Klonierung GFP-Infiltrationskonstrukt
3-AnMV-BamHI	AAAGGATCCGCTGCTCAAACTGACATG	65			
5-RRV-BamHI	AAAGGATCCCCCTGTGGCTCCGGGTTAAT	70	363	RpRSVg-NCR	Klonierung GFP-Infiltrationskonstrukt
3-RRV-BamHI	AAAGGATCCGCTTAAAGAAACAAAATAAATAAAT	58			
5-MPc-BamHI	AAAAAGATCCCTCGAAGCCAAACACTAATGGCCCGCC	72	525	GFLV-MPc	Klonierung GFP-Infiltrationskonstrukt
3-MPc-BamHI	AAAAAGATCCCCAGGGGTTCTTGTCTCTCAAAC	70			
XhoI BamHI-GFLV-CP-for	CTCGAGGGATCCACAAAAAGAGTTGGCGGCAGAC	63	525	GFLV-CP	Klonierung GFP-Infiltrationskonstrukt
XhoI BamHI-GFLV-CP-rew	CTCGAGGGATCCGCACAAATGTGCACCCCTTCC	63			

Anhang

Tab. 14: Challenge Inokulation und Agrobakterien-Infiltration an transgenen T1-Pflanzen

transgene <i>N. benthamiana</i> (T1)			Virus-Inokulation		Agrobakterien-Infiltration		
Pflanze #	Konstrukt	Linie ²	ELISA (14 dpi)		Virus	Infiltrationskonstrukt	GFP-Expression ¹ (3dpi)
			ino	sys			
6	IR-Nepo	13(03/08.10)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
7 ³	IR-Nepo	13(03/08.10)	-	-	ArMV	GFP-ArMV-MPc	2
8	IR-Nepo	13(03/08.10)	+	+	RpRSVg	GFP-RpRSV-NCR	2
9	IR-Nepo	13(12/08.10)	-	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
10	IR-Nepo	13(12/08.10)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
11	IR-Nepo	13(12/08.10)	+	-	ArMV	GFP-ArMV-MPc	0
12 ⁴	IR-Nepo	13(12/08.10)	+	+	ArMV	GFP-ArMV-MPc	1
13	IR-Nepo	13(12/08.10)	+	+	RpRSVg	GFP-RpRSV-NCR	3
14	IR-Nepo	15(12/08.10)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
15	IR-Nepo	15(12/08.10)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
16	IR-Nepo	15(12/08.10)	+	+	ArMV	GFP-ArMV-MPc	2
17	IR-Nepo	15(12/08.10)	-	-	RpRSVg	GFP-RpRSV-NCR	2
18	IR-GFLVtun	C	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
19	IR-GFLVtun	C	-	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
20	ΔDI2-GFLV-MPc	13(69)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
21	ΔDI2-GFLV-MPc	13(69)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
22	ΔDI2-GFLV-MPc	13(69)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
23	ΔDI2-GFLV-MPc	13(69)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
24	ΔDI2-GFLV-MPc	15	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
25	ΔDI2-GFLV-MPc	15	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
26	ΔDI2-GFLV-MPc	15	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
27	ΔDI2-GFLV-MPc	2(23/9res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
28	ΔDI2-GFLV-MPc	2(23/9res)	-	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
29	ΔDI2-GFLV-MPc	2(23/9res)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
30	ΔDI2-GFLV-MPc	2(23/9res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
31	ΔDI2-GFLV-MPc	31(26/10res)	-	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
32	ΔDI2-GFLV-MPc	31(26/10res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
33	ΔDI2-GFLV-MPc	31(26/10res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
34	ΔDI2-GFLV-MPc	31(26/10res)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
35	ΔDI2-GFLV-MPc	31(26/10res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	-
36	ΔDI2-GFLV-MPc	31(26/10res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
37	ΔDI2-GFLV-MPc	31(23/20inf)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
38	ΔDI2-GFLV-MPc	31(23/20inf)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
39	ΔDI2-GFLV-MPc	31(23/20inf)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
40	ΔDI2-GFLV-MPc	11(23/3res)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
41	ΔDI2-GFLV-MPc	4(27/7res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	-
42	ΔDI2-GFLV-MPc	4(27/7res)	-	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
43	ΔDI2-GFLV-MPc	4(27/7res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
44	ΔDI2-GFLV-MPc	4(27/7res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
45	ΔDI2-GFLV-MPc	4(23/17res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
46	ΔDI2-GFLV-MPc	4(23/17res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
47	ΔDI2-GFLV-MPc	4(23/17res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	-
48	ΔDI2-GFLV-MPc	30	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	-
49	ΔDI2-GFLV-MPc	30	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
50	ΔDI2-GFLV-MPc	30	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
51	ΔDI2-GFLV-MPc	30	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
52	ΔDI2-GFLV-MPc	30	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
53	ΔDI2-GFLV-MPc	30	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
54	ΔDI2-GFLV-MPc	23	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
55	ΔDI2-GFLV-MPc	23	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
56	ΔDI2-GFLV-MPc	23	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
57	ΔDI2-GFLV-MPc	23(72sil)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
58	ΔDI2-GFLV-MPc	23(72sil)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
59	ΔDI2-GFLV-MPc	23(72sil)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
60	ΔDI2-GFLV-MPc	23(72sil)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
61	ΔDI2-GFLV-MPc	23(72sil)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	-
62	ΔDI2-GFLV-MPc	23(72sil)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	-
63	ΔDI2-GFLV-MPc	4(36sil)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2

Anhang

transgene <i>N. benthamiana</i> (T1)			Virus-Inokulation		Agrobakterien-Infiltration		
Pflanze #	Konstrukt	Linie**	ELISA (14 dpi)		Virus	Infiltrationskonstrukt	GFP-Expression* (3dpi)
			ino	sys			
64	ΔDI2-GFLV-MPc	4(36sil)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
65	ΔDI2-GFLV-MPc	4(36sil)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
66	ΔDI2-GFLV-MPc	4(36sil)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
67	ΔDI2-GFLV-MPc	4(36sil)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
68	ΔDI2-GFLV-MPc	4(36sil)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	-
69	ΔDI2-GFLV-MPc	4(36sil)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
70	ΔDI2-GFLV-MPc	4(36sil)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
71	ΔDI2-GFLV-MPc	4(36sil)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
72	DI2-GFLV-MPc	4(34)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
73	DI2-GFLV-MPc	4(34)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
74	DI2-GFLV-MPc	4(34)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
75 ⁴	DI2-GFLV-MPc	4(34)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
76	DI2-GFLV-MPc	19(62)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
77	DI2-GFLV-MPc	19(62)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
78	DI2-GFLV-MPc	19(62)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
79	DI2-GFLV-MPc	19(62)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
80	DI2-GFLV-MPc	19(62)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
81	DI2-GFLV-MPc	20(26/10res)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	3
82	DI2-GFLV-MPc	20(26/10res)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
83	DI2-GFLV-MPc	20(26/12res)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	3
84	DI2-GFLV-MPc	20(26/12res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
85	DI2-GFLV-MPc	20(26/12res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	3
86	DI2-GFLV-MPc	20(26/12res)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
87	DI2-GFLV-MPc	20(26/12res)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	3
88	DI2-GFLV-MPc	20(26/12res)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
89	DI2-GFLV-MPc	20(27/4res)	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
90	DI2-GFLV-MPc	20(27/4res)	-	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
91	DI2-GFLV-MPc	20(27/4res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
92	DI2-GFLV-MPc	20(27/4res)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
93	DI2-GFLV-MPc	20(23/6inf)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
94	DI2-GFLV-MPc	20(23/6inf)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	3
95	DI2-GFLV-MPc	20(23/6inf)	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	3
96	DI2-GFLV-MPc	20(23/6inf)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
97	IR-GFLV	2	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
98	IR-GFLV	2	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
99	IR-GFLV	2	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
100	IR-GFLV	5(26/9res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
101	IR-GFLV	5(26/9res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
102	IR-GFLV	5(26/9res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	3
103 ³	IR-GFLV	5(26/9res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	0
104	IR-GFLV	5(26/9res)	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
105	IR-GFLV	21	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
106	IR-GFLV	10	+	+	GFLV	GFP-GFLV-MPc	3
107	IR-GFLV	10	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
108	IR-GFLV	10	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
109	IR-GFLV	17	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	-
110	IR-GFLV	17	+	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	1
111	IR-GFLV	17	-	-	GFLV	GFP-GFLV-MPc	2
112	IR-RpRSV	3(161sil)	-	-	RpRSVg	GFP-RpRSV-NCR	0
113 ⁵	IR-RpRSV	3(161sil)	-	-	RpRSVg	GFP-RpRSV-NCR	0
114	IR-RpRSV	3(161sil)	-	+	RpRSVg	GFP-RpRSV-NCR	2
115 ⁵	IR-RpRSV	3(161sil)	+	+	RpRSVg	GFP-RpRSV-NCR	3
116	IR-RpRSV	3(161sil)	+	+	RpRSVg	GFP-RpRSV-NCR	1
117	IR-RpRSV	3(161sil)	-	-	RpRSVg	GFP-RpRSV-NCR	2

¹GFP-Expression: 0 = keine Expression, 1 =schwach, 2 = deutlich, 3 =stark, 4 =sehr stark

²Mutterpflanze T0: ELISA getestet: res = resistant, inf = infiziert; sil = silencing nach Infiltration; (Zahl) = # intern
 Grau unterlegte Pflanzen sind im Ergebnisteil dargestellt

Pflanzen mit Akkumulation von siRNA: ³ = MP, ⁴ = CP, ⁵ = NCR