

Institut für Pflanzenkrankheiten der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

**Phytopathologische Charakterisierung von Isolaten
des Gurkenmosaikvirus**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften

(Dr. agr.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am: 29. Juli 2004

von Dipl.-Ing. Agr. Nina Bölling

aus Marburg a.d. Lahn

Referent: Prof. Dr. H.-W. Dehne
Korreferent: Prof. Dr. G. Noga
Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2004
Gedruckt bei: ABI Copy & Druck, Bonn

Kurzfassung

Nina Bölling

Phytopathologische Charakterisierung von Isolaten des Gurkenmosaikvirus

Die Diversität von 9 CMV-Isolaten, darunter die hinreichend beschriebenen Isolate K, Fny und Q, wurden mittels RT-PCR, Wirtspflanzenreaktion, DAS- und TAS-ELISA in simultanen, standardisierten Versuchen verglichen. Dazu wurden *Nicotiana rustica*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii*, *N. tabacum* "Samsun-NN", *Lycopersicon esculentum* (Rheinlands Ruhm), *Capsicum annum* (Yolo Wonder B) und verschiedene Sorten von *Cucumis sativus* und *Valerianella locusta* mit Suspensionen definierter Viruskonzentration der gereinigten Isolate inokuliert.

Die RT-PCR mit zwei Untergruppen-spezifischen Primerpaaren erlaubte die Typisierung der Isolate in die Untergruppen S-I und S-II. Mittels RT-PCR mit generellen CMV-Hüllprotein-Primern und anschließendem MspI-Verdau konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Davon abweichende Muster wurden nicht gefunden. Die Assoziation aller Isolate mit Satelliten konnte in der RT-PCR mit generellen Primern für Satelliten-RNA nachgewiesen und mittels dsRNA-Analyse bestätigt werden, wobei die Stärke der Banden auf eine hohe Akkumulation der Satelliten in den infizierten Pflanzenzellen schließen ließ.

Die Vielfalt der durch CMV ausgelösten systemischen Symptome war sehr groß und reichte von keinen sichtbaren Veränderungen bis zu systemischer Nekrotisierung der kompletten Pflanze. Ein Zusammenhang mit der Untergruppenzugehörigkeit konnte nicht festgestellt werden. Weder zwischen den Isolaten derselben Untergruppe, noch zwischen denen beider Untergruppen, konnte in gemischten Infektionen eine signifikante synergistische oder antagonistische Wechselwirkung nachgewiesen werden. Die histologischen und zytologischen Untersuchungen verdeutlichten die Auswirkungen der Infektion auf das Wirtspflanzengewebe. Isolat- oder CMV-spezifische Veränderungen wurden nicht festgestellt.

Mittels ELISA wurden hohe Viruskonzentrationen sowohl in symptomlosen Pflanzen als auch in Pflanzen mit starken Virussymptomen nachgewiesen. Die Sensitivität beider ELISA-Verfahren war in allen Wirt-Virus-Systemen sehr gut. So wurde auch in Pflanzen Virus nachgewiesen, die nach der Inokulation keinerlei Anzeichen einer erfolgreichen Virusinfektion zeigten.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen, dass kein genereller Zusammenhang zwischen Wirtspflanzenbeeinträchtigung, der systemischen Verbreitung und Konzentration der Viren in der Pflanze sowie der Gruppenzugehörigkeit der Isolate besteht, und keiner dieser Merkmale einen zuverlässigen Hinweis auf das Schädigungspotential der verschiedenen CMV-Isolate geben kann.

Abstract

Nina Bölling

Phytopathological characterization of isolates of cucumber mosaic virus

The biodiversity of 9 isolates of cucumber mosaic cucumovirus (CMV), including the well known isolates K-, Fny- and Q-CMV, were compared by RT-PCR, dsRNA electrophoresis, host plant reaction, DAS- and TAS-ELISA under identical conditions. Therefore a purified virus suspension of defined concentration was used to inoculate *Nicotiana rustica*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii*, *N. tabacum* "Samsun-NN", *Lycopersicon esculentum* (Rheinlands Ruhm), *Capsicum annum* (Yolo Wonder B) and different varieties of *Cucumis sativus* and *Valerianella locusta*.

RT-PCR with two sets of primers specific for subgroup I (S-I) and subgroup II (S-II), allowed the classification of the isolates within S-I and S-II. RT-PCR with primers specific for CMV RNA 3 followed by digestion with MspI substantiated the above results. Distinct and different patterns were not found. Association of all isolates with satellites were detected by RT-PCR with primers specific for satellite-RNA and confirmed by dsRNA analysis, indicating a high level of accumulation in infected plant cells.

The isolates induced symptoms of different phenotype and severity, varying from complete systemic necrosis to no symptoms at all, but no correlation was found with subgroup type. In mixed infections, between two isolates within one subgroup or from subgroup S-I and S-II each, no synergistic or antagonistic effect was evident. Examinations of histological and cytological changes in infected host plant tissue elucidated the extent of damage caused by the infection but neither isolate- nor CMV-specific effects were observed.

There was no general relationship between the severity of systemic symptoms and virus accumulation. By ELISA high levels of virus accumulation were detected in plants with none or mild symptoms as well as in plants with severe symptoms. In all host species the sensitivity of both ELISA-variants was satisfactory. Virus was detected even in plants, which appeared to be not infected at all.

The results of the present work confirm, that there is no correlation between symptom expression, incidence and subgroup type of the CMV-isolates, and non of them are reliable guides to assess the actual amount of damage caused by infection.

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	6
2.1 Versuchsorganismen	6
2.1.1 Pflanzenarten und Sorten	6
2.1.2 Virus-Isolate	6
2.2 Anzucht	7
2.2.1 Vermehrungs- und Versuchspflanzen	7
2.2.2 Erhaltung und Vermehrung der CMV-Isolate	8
2.3 Inokulumgewinnung und Inokulation	8
2.3.1 Verwendete Puffer	8
2.3.2 Virusreinigung	9
2.3.2.1 Durchführung der Reinigung	9
2.3.2.2 Messung der Viruskonzentration und –qualität	10
2.3.3 Inokulation	10
2.3.3.1 Pflanzenpresssaft	10
2.3.3.2 Gereinigte Virussuspension	11
2.4 Erfassung der Wirtspflanzenbeeinträchtigung	11
2.4.1 Ausprägung der Symptome	12
2.4.2 Entwicklung der Pflanzen	12
2.4.2.1 Vegetatives und generatives Wachstum	12
2.4.2.2 Chlorophyllgehalt	12
2.5 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	13
2.5.1 Verwendet Puffer und Lösungen	13
2.5.2 Probenahme und Belegung	14
2.5.3 Durchführung eines direkten DAS-ELISA	15
2.5.4 Durchführung eines indirekten TAS-ELISA	16
2.5.5 Auswertung	16
2.6 Molekularbiologische Untersuchungen	17
2.6.1 Extraktion der Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe	17
2.6.2 Präparation doppelsträngiger RNA aus pflanzlichem Gewebe	18
2.6.3 Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	19
2.6.3.1 PCR-Primer	19
2.6.3.2 Reverse Transkription (RT)	19
2.6.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.6.3.4 Gel-Elektrophorese	20

2.7 Mikroskopische Untersuchungen	21
2.7.1 Anfertigung der Tropfenpräparate	21
2.7.2 Präparation der Gewebeproben	21
2.7.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen	22
2.7.2.2 Probenaufbereitung und Einbettung	22
2.7.2.3 Herstellung der Gewebeschnitte	23
2.7.3 Mikroskopie	23
2.8 Statistische Auswertung	24
3 Ergebnisse	25
3.1 Molekularbiologische Differenzierung	25
3.1.1 Typisierung der CMV-Isolate	25
3.1.2 Nachweis von Satelliten-RNA	26
3.1.3 Analyse doppelsträngiger RNA	27
3.2 Symptomatologie	28
3.2.1 Makroskopische Veränderungen	28
3.2.1.1 <i>Nicotiana</i> -Arten	28
3.2.1.2 Tomatenpflanzen	30
3.2.1.3 Paprikapflanzen	30
3.2.1.4 Gurkenpflanzen	31
3.2.1.5 Feldsalatpflanzen	31
3.2.2 Fein- und ultrastrukturelle Veränderungen	31
3.2.2.1 <i>Nicotiana rustica</i> und <i>N. tabacum</i> “Samsun-NN”	32
3.2.2.2 Tomatenpflanzen	34
3.3 Einfluss der Isolate auf die Wirtspflanzen	35
3.3.1 <i>Nicotiana</i> -Arten	35
3.3.1.1 Symptomausprägung	35
3.3.1.2 Wachstum	38
3.3.2 Tomatenpflanzen	40
3.3.2.1 Symptomausprägung	40
3.3.2.2 Wachstum	43
3.3.2.3 Chlorophyllgehalt	43
3.3.2.4 Einfluss der Inokulumdichte auf den Krankheitsverlauf	44
3.3.2.5 Einfluss der Jahreszeit auf den Krankheitsverlauf	45
3.3.3 Paprikapflanzen	46
3.3.3.1 Symptomausprägung	46
3.3.3.2 Wachstum	47
3.3.3.3 Chlorophyllgehalt	49
3.3.3.4 Fruchtbildung	52
3.3.4 Gurkenpflanzen	53
3.3.4.1 Symptomausprägung	53

3.3.4.2 Wachstum	57
3.3.5 Feldsalatpflanzen	59
3.4 Vermehrung der CMV-Isolate	61
3.4.1 Optimierung der Virusanreicherung	61
3.4.2 Serologische Untersuchungen der gereinigten Isolate	63
3.4.2.1 Einfluss der Antikörperreaktion auf die Nachweissicherheit	63
3.4.2.2 Antikörperreaktion der gereinigten Virussuspensionen	64
3.4.3 Einfluss der Wirtspflanzen auf die Virusvermehrung	68
3.4.3.1 <i>Nicotiana</i> -Arten	69
3.4.3.2 Tomatenpflanzen	71
3.4.3.3 Paprikapflanzen	72
3.4.3.4 Gurkenpflanzen	74
3.4.3.5 Feldsalatpflanzen	76
3.5 Bildtafeln	77
4 Diskussion	112
5 Zusammenfassung	134
6 Literaturverzeichnis	136

1 Einleitung

Viren sind Nucleoproteine mit der Fähigkeit Krankheiten zu verursachen (AGRIOS 1997). Sie können sich ausschließlich in lebenden Zellen reproduzieren und sind aufgrund ihrer Größe nur im Elektronenmikroskop und je nach Virus auch dort schwer aufzufinden. Viren können eine Vielzahl von Krankheiten in allen Lebensformen von einzelligen Mikroorganismen bis zu Pflanzen, Tieren und Menschen verursachen. Es gibt über 2000 bekannte Viren und beinahe jeden Monat kommen neue hinzu. Etwa ein Viertel aller bekannten Viren verursachen Krankheiten in Pflanzen. Pflanzenviren unterscheiden sich immens von allen anderen pflanzlichen Pathogenen. Eventuelle Symptome oder Beeinträchtigungen der Wirtspflanzen werden allein durch den Gebrauch des zellulären Apparates zur eigenen Reproduktion, die Akkumulation der Viren in den Zellen des Wirtes und den damit einhergehenden Störungen der normalen zellulären Stoffwechselprozesse des Wirtes, verursacht (AGRIOS 1997, HULL 2002). Kulturpflanzen können von zahlreichen Viren befallen werden, von denen viele ernsthafte Verluste an Ertrag und/oder Qualität verursachen. Einige Viren infizieren nur bestimmte Pflanzen und treten nur in begrenzten Regionen auf, während andere wie CMV einen großen Wirtspflanzenkreis haben und in allen Teilen der Welt vorkommen (TOMLINSON 1987, AGRIOS 1997).

Einige Symptome, wie z.B. Eichenblatt-Muster oder nekrotische Ringflecken sind eindeutig einer Virusinfektion zuzuschreiben. Die meisten Virus-induzierten Symptome sind aber leicht mit Störungen anderen Ursprung wie Mutationen, Nährstoffmangel, Toxinen, Luftverschmutzung, Schäden durch Insekten, Milben oder andere Pathogene und deren Kombinationen zu verwechseln (AGRIOS 1997, WATERWORTH & HADIDI 1998). Viele Viren sind in einigen ihrer Wirte latent vorhanden, können aber trotzdem Schäden in Form von Wuchshemmungen, Ertragsminderungen, Beeinträchtigungen der Fitness des Wirtes und anderen Effekten verursachen, welche jedoch nur im direkten Vergleich mit nicht infizierten Pflanzen offensichtlich sind (WATERWORTH & HADIDI 1998). Darum werden viele Virus-induzierten Verluste gar nicht als solche erkannt (TOMLINSON 1987, WATERWORTH & HADIDI 1998).

Das Ausmaß der Schäden kann auch bei einem bestimmten Wirt-Virus-Kombination von Jahr zu Jahr und von Region zu Region stark variieren (WATERWORTH & HADIDI 1998, GALLITELLI 2000). Daher ist es äußerst schwierig, die durch Viren verursachten Schäden zu quantifizieren und Prognosen zu erstellen (TOMLINSON 1987, WATERWORTH & HADIDI 1998). Die vorhandenen Informationen variieren zudem je nach Land bzw. den verfügbaren Möglichkeiten in Ausstattung und Personal; insbesondere in den Entwicklungsländern existiert diesbezüglich ein großes Defizit (WATERWORTH & HADIDI 1998, RYBICKI & PIETERSEN 1999). So besteht, obwohl Viren seit vielen Jahren Bestandteil intensiver Forschung sind, über die tatsächlich durch Viren verursachten Schäden noch große Unklarheit bzw. sind Viren höchstwahrscheinlich für wesentlich höhere ökonomische Verluste verantwortlich als bisherige Schätzungen vermuten lassen (TOMLINSON 1987, WATERWORTH & HADIDI 1998).

CMV (cucumber mosaic virus) ist das Typ-Virus der Gattung Cucumovirus (Fam. *Bromoviridae*), der auch PSV (peanut stunt virus) und TAV (tomato aspermy virus) angehören. Gurkenmosaikviren haben isometrische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 29 nm, deren Proteinhülle (Kapsid) aus 180 identischen Untereinheiten eines Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 24 kDa besteht (VAN REGENMORTEL *et al.* 1972, HABIL & FRANCKI 1974, ROOSSINCK *et al.* 1999a). CMV wird mechanisch und nicht persistent durch mehr als 75 verschiedene Aphiden-Arten übertragen (PALUKAITIS *et al.* 1992). Für verschiedene Kulturpflanzen und Unkräuter wurde auch eine Übertragung durch Samen nachgewiesen (TOMLINSON 1987, JONES & McJIRDY 1990, MEYER-KAHSNITZ 1993, YANG *et al.* 1997, ROOSSINCK *et al.* 1999a). Je nach epidemiologischen Bedingungen und gekoppelt mit anderen Übertragungsarten, wie z.B. Aphiden-Übertragung, welche für eine schnelle Ausbreitung in der Kultur sorgen, kann Saatgut-Übertragung als Quelle für Primärinfektionen im Bestand von größter Bedeutung sein (TOMLINSON 1987, CRESCENZI *et al.* 1993).

Das dreigeteilte Genom besteht aus den für eine Infektion erforderlichen drei positiven einzelsträngigen RNAs 1, 2 und 3. RNA 1 (3.3 kb) und RNA 2 (3.0 kb) sind jeweils in separate Partikel verpackt. RNA 3 (2,2 kb) ist zusammen mit der subgenomischen RNA 4 (1,1 kb) enkapsidiert. Die drei Partikelarten haben ungefähr die gleichen Dimensionen und Sedimentationseigenschaften. Bei einigen Isolaten ist eine weitere subgenomische RNA 4A enkapsidiert (PEDEN & SYMONS 1973, PALUKAITIS *et al.* 1992, DING *et al.* 1994, ROOSSINCK *et al.* 2001). Das Genom von CMV enthält fünf Gene bzw. ORFs (open reading frames). RNA 1 und 2 kodieren die Proteine 1a (111 kDa) bzw. 2a (97 kDa), die in die Virusreplikation involviert sind. Ein zweites den 2a ORF überschneidendes Gen auf RNA 2 kodiert das Protein 2b (15kDa), das von einer subgenomischen RNA 4A exprimiert wird. RNA 3 mit zwei ORFs kodiert direkt das Movement-Protein (30 kDa) und indirekt mittels der subgenomischen RNA 4 das Hüllprotein (24 kDa) (HAYES & BUCK 1990, PALUKAITIS *et al.* 1992, DING *et al.* 1994, ROOSSINCK *et al.* 1999a, ROOSSINCK *et al.* 2002). Alle fünf Genprodukte beeinflussen in einer Wirts-spezifischen Art und Weise die Ausbreitung des Virus in der Pflanze und somit auch die Virulenz (GAL-ON *et al.* 1994, 1996, 1997, HELLWALD & PALUKAITIS 1994, 1995, DING *et al.* 1995, KAPLAN *et al.* 1995, 1997, CANTO *et al.* 1997, CANTO & PALUKAITIS 2001, SOARDS *et al.* 2002, SALÁNKI *et al.* 2004). Zusätzlich zu den viralen RNAs können CMV-Isolate mit Satelliten-RNA assoziiert sein, mit einem dramatischen Effekt sowohl auf das Helfervirus als auch auf die Wirtspflanzen. Dieser Einfluss ist im starken Maße abhängig von der jeweiligen Konstellation aus Helfervirus, Satellit und Wirt, wobei die genauen Zusammenhänge noch nicht geklärt sind (MOSSOP & FRANCKI 1978, ROOSSINCK & PALUKAITIS 1991, ROOSSINCK *et al.* 1992, ROOSSINCK *et al.* 1997).

Die zahlreichen Isolate von CMV werden für gewöhnlich zwei großen Gruppen zugeordnet, die in der Vergangenheit, je nach zugrundeliegenden Bestimmungskriterien, unterschiedlich bezeichnet wurden, wie in PALUKAITIS *et al.* (1992) aufgelistet. In dieser Arbeit wird die Einteilung in die Untergruppen I und II, auf Basis der Nukleinsäure-Hybridisierung nach OWEN & PALUKAITIS (1988), verwendet. Je nach RNA-Segment

beträgt die Homologie der Nukleotidsequenz zwischen den Untergruppen 71 – 76 % und innerhalb jeder Gruppe über 92 %. Serologisch besteht, mit einem serologischen Differenzierungsindex (SDI) von 1 – 2, eine sehr enge Verwandtschaft zwischen den CMV-Untergruppen, von denen sich jede mit einem SDI von 6 – 7 von den Cucumoviren PSV und TAV unterscheiden (PALUKAITIS *et al.* 1992).

Seit den ersten Berichten über CMV als Verursacher einer Krankheit an Gurke (DOOLITTLE 1916, JAGGER 1916), wurde CMV vor allem in den gemäßigten, aber zunehmend auch in den tropischen Gegenden der ganzen Welt nachgewiesen (PALUKAITIS *et al.* 1992). CMV hat den größten Wirtskreis aller bekannten Viren. Die Anzahl der Pflanzen, die als Wirte von CMV identifiziert wurden, ist in den letzten Jahren stetig angestiegen und umfasst mittlerweile Pflanzen aus ca. 365 Gattungen und über 85 Familien (PALUKAITIS *et al.* 1992, ROOSSINCK *et al.* 1999a). Aufgrund des großen Wirtspflanzenkreises, der weltweiten Verbreitung und der nicht persistenten Übertragbarkeit durch zahlreiche Aphiden wird CMV zu den Pflanzenviren mit größter ökonomischer Bedeutung bzw. zu den wichtigsten Viren einjähriger Kulturen weltweit gezählt (TOMLINSON 1987, COHEN *et al.* 1988, LUIS-ARTEAGA *et al.* 1988, JONES & McLEAN 1989, RIST & LORBEER 1989, BOUHIDA & LOCKHART 1990, JONES & McKIRDY 1990, TIEN & WU 1991, PALUKAITIS *et al.* 1992, MEYER-KAHSNITZ 1993, ŠUTIĆ *et al.* 1999, GALLITELLI 2000, HORD *et al.* 2001, LIN *et al.* 2003). Zahlreiche Unkräuter gehören ebenfalls zu den Wirtspflanzen von CMV und in einigen ist das Virus Saatgut-übertragbar bzw. kann im Saatgut überdauern, was als Quelle für Primärinfektion zu Beginn der Vegetationsperiode ebenfalls von großer Bedeutung sein kann (TOMLINSON *et al.* 1970, TOMLINSON & WALKER 1973, BRUCKART & LORBEER 1976, RIST & LORBEER 1987, 1989, TOMLINSON 1987).

Aufgrund der ökonomischen Bedeutung gibt es zahlreiche Untersuchungen über Nachweis, Differenzierung und Charakterisierung von CMV-Isolaten. Nukleotid-Sequenz, Symptomausprägung, Pathogenität, Virulenz und viele andere Eigenschaften der unzähligen CMV-Isolate können ganz beträchtlich variieren, was die Einschätzung und Kontrolle CMV-induzierter Krankheiten erheblich erschwert (TOMLINSON 1987, PALUKAITIS *et al.* 1992, AGRIOS 1997, GALLITELLI 2000). Eine große Anzahl von CMV-Isolaten wurde bisher beschrieben und die Sequenz-Datenbanken enthalten ca. 60 verschiedene Hüllprotein-Sequenzen und die Sequenzen des kompletten Virusgenoms von 15 Isolaten (ROOSSINCK 2001). Die Zuweisung zahlreicher Eigenschaften auf die einzelnen RNAs oder bestimmte Kombinationen, wie der Induktion spezifischer Symptome (RAO & FRANCKI 1982, EDWARDS *et al.* 1983, LAKSHMAN & GONSALVES 1985, ROOSSINCK & PALUKAITIS 1990, SHINTAKU *et al.* 1992, ZHANG *et al.* 1994, HELLWALD *et al.* 2000), Temperatursensitivität (ROOSSINCK 1991), Einschränkungen des Wirtskreises (RAO & FRANCKI 1982, EDWARDS *et al.* 1983, ZHANG & PALUKAITIS 1993), Aphiden-Übertragbarkeit (ZITTER & GONSALVES 1991, LIU *et al.* 2002) und Satelliten-Replikation (ROOSSINCK & PALUKAITIS 1991, SLEAT *et al.* 1994, ROOSSINCK *et al.* 1997) konnten mittels Versuchen mit Pseudorekombinanten ermittelt werden. Dabei scheinen diese spezifischen Eigenschaften sowie deren Lokalisation auf dem Virusgenom im starken Maße anhängig zu sein

von dem jeweiligen CMV-Isolat und der Wirtspflanzenart. So ist z.B. die Fähigkeit von K-CMV im Gegensatz zu U-CMV Mais zu infizieren, auf der RNA 2, die zur Induktion lokaler Symptome an *Vicia faba*, auf der RNA 3 dieses Isolates festgelegt (RAO & FRANCKI 1982). Die Fähigkeit von Fny-CMV im Gegensatz zu LS-CMV Mais zu infizieren und systemische Symptome zu verursachen, wird der RNA 3 zugeordnet (ZHANG & PALUKAITIS 1993), während die Infektion von *Lactuca saligna* durch LS-CMV mit den RNAs 2 und 3 dieses Isolates assoziiert wird (EDWARDS *et al.* 1983).

Es gibt sehr viele Untersuchungen über Auftreten, Verbreitung und Zusammensetzung der CMV-Populationen in bestimmten Kulturen und begrenzten Regionen (BRUCKART & LORBEER 1976, AHMAD & SCOTT 1985, HAACK & RICHTER 1987, TOMLINSON 1987, LUIS-ARTEAGA *et al.* 1988, 1998, COHEN *et al.* 1988, FORD *et al.* 1988, GREEN *et al.* 1988, JONES & McLEAN 1989, RIST & LORBEER 1989, BOUHIDA & LOCKHART 1990, JONES & McKIRDY 1990, FLASINSKI *et al.* 1990, KEARNEY *et al.* 1990, YUDIN *et al.* 1990, ULLMAN *et al.* 1991, DANIELS & CAMPBELL 1992, JORDÁ *et al.* 1992, CRESCENZI *et al.* 1993, PERRY *et al.* 1993, ILARDI *et al.* 1995, RODRIGUEZ-ALVARADO *et al.* 1995, SINGH *et al.* 1995, HAQ *et al.* 1996, ALONSO-PRADOS *et al.* 1998, GILLASPIE *et al.* 1998, VARVERI & BOUTSIKA 1999, GARCÍA-ARENAL *et al.* 2000, HORD *et al.* 2001, LIN *et al.* 2003). Daraus ergeben sich unzählige Einzelinformationen über CMV-Isolate aus allen Teilen der Welt, die aber aufgrund unterschiedlicher Isolate, Versuchsbedingungen und Methoden, oft nicht oder nur bedingt für Vergleichszwecke herangezogen werden können.

Dabei ist der Biotest bzw. die Erfassung virus-induzierter Symptome, in den Anfängen der Virusforschung oft das einzige Mittel zur Identifizierung von Viruserkrankungen (AGRIOS 1997, HULL 2002), aufgrund der zahlreichen Innovationen bzw. neuen Möglichkeiten, etwas aus der Mode gekommen (ANONYMOUS 1998). Insbesondere bei einer so heterogenen Virusgruppe wie CMV sind aber genaue Analysen der virusinduzierten Wirtsreaktionen unverzichtbar zur Schließung der immer noch beträchtlichen Wissenslücken auf dem Gebiet der Wirt-Virus-Interaktion (MARTELLI & RUSSO 1985, PALUKAITIS *et al.* 1992, WATERWORTH & HADIDI 1998, ANONYMOUS 1998, GALLITELLI 2000, ZAITLIN & PALUKAITIS 2000, HULL 2002, PALUKAITIS & GARCÍA-ARENAL 2003). Die Kombination verschiedener Methoden unter möglichst standardisierten Bedingungen kann wichtige Informationen für Forschung, Diagnose, Pflanzenzüchtung und Epidemiologie liefern (ANONYMOUS 1998).

Zwar wird in einigen Untersuchungen auch eine biologische Differenzierung durchgeführt. Diese beschränkt sich aber häufig auf Wirtspflanzen-Restriktionen bzw. eingeschränkte lokale und/oder systemische Infektionen bestimmter Indikatorpflanzen oder die grobe, stark verallgemeinerte Einstufung in milde, moderate und schwere Symptome, ohne die Art der Wirtspflanzenbeeinträchtigung bzw. die tatsächliche Schädigung der infizierten Pflanzen zu berücksichtigen. So auch in einer der bisher umfangreichsten Untersuchungen, in der 44 CMV-Isolate aus der ganzen Welt unter ähnlichen Bedingungen und zur gleichen Zeit mittels verschiedener ELISA-Verfahren, Antiseren, RT-PCR und Biotests miteinander verglichen wurden, wobei letztere aufgrund des großen Pro-

benumfanges nur einmalig und an einer beschränkten Auswahl von Indikatorpflanzen durchgeführt wurden (ANONYMOUS 1998). Wie bei den meisten Untersuchungen wurden die Pflanzen zudem mit infiziertem Pflanzenpresssaft unbekannter Viruskonzentration inokuliert. Der Vergleich der Pathogenität und Virulenz verschiedener Virus-Isolate erfordert aber die Durchführung der Versuche unter möglichst standardisierten Bedingungen, d.h. auch die Verwendung von Inokula mit definierter Konzentration. Untersuchungen, in denen mit definiertem Inokulum gearbeitet wird, sind aufgrund des hohen Aufwandes selten und beschränken sich auf einige wenige Isolate und Wirtspflanzen (ROOSSINCK & PALUKAITIS 1990, ROOSSINCK 1991, HELLWALD *et al.* 2000).

Ziel dieser Arbeit war daher eine umfassende vergleichende Bewertung mehrerer CMV-Isolate bezüglich ihrer Schadwirkung und Entwicklung an verschiedenen Wirtspflanzen unter möglichst standardisierten Bedingungen. Dazu sollte in simultanen Versuchen mit definiertem Inokulum die Entwicklung von Wirt und Virus mittels Biotests, fein- und ultrastrukturellen Untersuchungen sowie ELISA-Tests untersucht und auf Zusammenhänge geprüft werden. Zur Interpretation der Ergebnisse wurde eine molekularbiologische Typisierung der Isolate und ein Nachweis eventuell vorhandener Satelliten-RNA durchgeführt. Durch die Einbeziehung von drei bekannten und hinreichend beschriebenen CMV-Isolaten in die Versuche sollte ein Vergleich der Untersuchungsergebnisse mit früheren Arbeiten ermöglicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsorganismen

2.1.1 Pflanzenarten und Sorten

Für die Versuche wurden CMV-empfindliche Pflanzen ausgewählt, die sich für die Inokulationsmethode sowie die Durchführung der Versuche im Gewächshaus in einem begrenzten Zeitrahmen eigneten. Die Auswahl der Indikator- und Vermehrungspflanzen erfolgte sowohl unter dem Aspekt der charakteristischen Symptomausprägung, als auch unter dem Gesichtspunkt einer guten Replikation des Virus in den Pflanzen. Durch eine regelmäßige Passage über *Nicotiana tabacum* L. cv „Samsun-NN“ oder „Xanthi-nc“ sollte eine mögliche Kontamination bzw. Mischinfektion mit TMV ausgeschlossen werden. Folgende Pflanzenarten und Sorten wurden verwendet:

Nicotiana-Arten: *Nicotiana rustica*

Nicotiana glutinosa

Nicotiana clevelandii

Nicotiana tabacum L. cv „Samsun-NN“¹

Nicotiana tabacum L. cv „Xanthi-nc“¹

Tomate: *Lycopersicon esculentum* L. Karst. ex Farw. „Rheinlands Ruhm“

Paprika: *Capsicum annum* L. var. Grossum (L.) SENDTN. „Yolo Wonder B“

Gurke: *Cucumis sativus* L. cv „Vorgebirgstraube“

Cucumis sativus L. cv „Pasamonte“²

Cucumis sativus L. cv „Boston“²

Cucumis sativus L. cv „Othello“²

Feldsalat: *Valerianella locusta* „Verte de Cambrai“

Valerianella locusta „Holländischer Breitblättriger“

Valerianella locusta „Vit“³

¹ Resistenzgen gegen das Tabakmosaikvirus

² Resistenz gegen Gurkenkrätze, Toleranz gegenüber Echtem Mehltau und CMV

³ Toleranz gegenüber Falschem Mehltau

2.1.2 Virus-Isolate

Für die Untersuchungen wurden ausschließlich Isolate des Gurkenmosaikvirus (CMV) verwendet (Tab. 1). Für eine bessere Übersicht bei der Versuchsdurchführung wurden die Isolate durchnummeriert und in dieser Arbeit durchgängig mit dieser Kennnummer bezeichnet. Die Isolate 1, 2, 4, 5, 10 und 11 wurden nach Vorversuchen aus insgesamt

12 dem Institut zur Verfügung stehenden CMV-Isolaten ausgewählt. Als Vergleichs-Isolate wurden zusätzlich die Isolate A, B und C bestellt.

Tab. 1: Für die Untersuchungen verwendete CMV-Isolate mit den zu Verfügung stehenden Informationen.

Kenn-Nr.	Original-Bezeichnung	natürlicher Wirt	Herkunft	Referenz
1	MAN	n.b.	Australien	HAMACHER, pers. Mitt.
2	S	n.b.	Südafrika	KAPER & WATERWORTH 1973; KAPER & DIAZ-RUIZ 1977
4	DIV	n.b.		HAMACHER, pers. Mitt.
5	AS	Paprika	Bonn	HAMACHER, pers. Mitt.
10	VKN	Stiefmütterchen	Bonn	HAMACHER, pers. Mitt.
11	ZMA	Zucchini	Rheinland	HAMACHER, pers. Mitt.
A	K	Kornblume	China	TIEN <i>et al.</i> 1982; HELLWALD & PALUKAITIS 1994
B	FNY	Zucchini	NY, USA	ROOSSINCK & PALUKAITIS 1990; PALUKAITIS <i>et al.</i> 1992
C	Q	<i>Capsicum sp.</i>	Australien	FRANCKI 1964; FRANCKI <i>et al.</i> 1966

n.b.: nicht bekannt

Die Isolate 5, 10 und 11 stammen aus der institutseigenen Sammlung. Die Isolate 1, 2, 4 und C wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSMZ) in Braunschweig, die Isolate A und B von Dr. K.-H. Hellwald vom Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Hohenheim zur Verfügung gestellt. Nach einem System, welches die CMV-Stämme zwei großen Untergruppen zuordnet (OWEN & PALUKAITIS 1988), sind die Isolate A, B, 1 und 4 in die Untergruppe I, die Isolate 2 und C in die Untergruppe II einzuordnen. Bei den restlichen Isolaten war die Untergruppenzugehörigkeit noch festzustellen.

2.2 Anzucht

2.2.1 Vermehrungs- und Versuchspflanzen

Die Vermehrungs- und Versuchspflanzen wurden nach Aussaat und Entfaltung der Keimblätter in 9 x 9 x 8 cm Töpfe mit Einheitserde (Fa. Klasmann, Geste-Groß-Hesete) und 2 g Plantosan/l Erde pikiert. Nur der Feldsalat wurde direkt in 7 x 7 x 6 Töpfe ausgesät und im Bedarfsfall später vereinzelt. Für die Düngungsversuche wurde die Erde mit 2 oder 4 g Plantosan/l Erde vermischt. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im klimagesteuerten Gewächshaus bei einer Temperatur von 20 ± 4 °C und einer relativen Luft-

feuchtigkeit von 60 – 70 %. Eine Zusatzbeleuchtung mit Natriumdampflampen Philips SGR 140 (Photosynthese-Belichtung mit erhöhtem Blaulicht) gewährleistete eine Photoperiode von 16 h und eine Mindestlichteinstrahlung von $300 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ über das gesamte Jahr hinweg.

2.2.2 Erhaltung und Vermehrung der CMV-Isolate

Die CMV-Isolate mussten zur Erhaltung in regelmäßigen Abständen auf junge Pflanzen übertragen werden. Dazu wurden *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii*, *N. tabacum* „Samsun-NN“ und *N. tabacum* „Xanthi-nc“ verwendet. Die beiden letzt genannten Arten besitzen eine Resistenz gegen das Tabakmosaikvirus, womit Kontaminationen bzw. Mischinfektionen verhindert werden sollten. Zur Sicherheit wurde zusätzlich CMV-infiziertes Pflanzenmaterial über Calciumchlorid (CaCl_2) getrocknet. In dieser Form können kleine Mengen virushaltigen Pflanzenmaterials bei 4°C über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden, ohne das die Viren ihre Infektiosität verlieren.

Für die Reinigung einzelner Virus-Isolate wurden größere Mengen stark virushaltigen Pflanzenmaterials benötigt. Als Inokulum diente virusinfiziertes Blattmaterial von *N. tabacum* „Samsun-NN“. In Abhängigkeit des jeweiligen CMV-Isolates wurden mittels Pflanzenpresssaft 50 bis 70 Pflanzen von *N. rustica*, *N. glutinosa* oder *N. tabacum* „Samsun-NN“ inokuliert. Nach 12 – 15 Tagen konnten die jüngeren, systemisch infizierten Blätter geerntet und direkt für die Reinigung weiterverarbeitet werden.

2.3 Inokulumgewinnung und Inokulation

2.3.1 Verwendete Puffer

Puffer A (pH 6,5 – 7):

0,5 M Natriumcitrat

5,0 mM Dinatrium EDTA

0,5 % Thioglycolsäure (unmittelbar vor Gebrauch zugeben)

Puffer B (pH 9,0):

5,0 mM Natriumborat

0,5 mM Dinatrium EDTA

2,0 % Triton-X-100

Puffer C (pH 9,0):

5,0 mM Natriumborat, pH 9,0

0,5 mM Dinatrium EDTA

Kaliumphosphat-Puffer:

Lösung A (1 M K_2HPO_4): 0,174 g K_2HPO_4 in 1 l A. bidest. lösen

Lösung B (1 M KH_2PO_4): 0,136 g KH_2PO_4 in 1 l A. bidest. lösen

612 ml Lösung A und 388 ml Lösung B miteinander mischen, pH 7,0

2.3.2 Virusreinigung

Es wurde eine partielle Reinigung ohne Dialyse, modifiziert nach SCOTT (1963), durchgeführt. Dabei sollten durch eine Reihe differentieller Zentrifugationszyklen eine weitest gehende Trennung der Viruspartikel von den Bestandteilen der Wirtspflanzen stattfinden. Die Zentrifugationen bei 6000 bis 10000 rpm erfolgten mit einer Laborzentrifuge (Beckmann AvantiTM J-25, Rotor-Typ Ja 14, Fa. Beckmann, München), die Zentrifugation bei 40000 rpm mit einer Ultrazentrifuge (Beckmann L 7, Rotor-Typ 45 Ti, Fa. Beckmann). Um ein optimales Reinigungsergebnis zu erzielen, wurden alle Arbeitsgänge bei 4 °C durchgeführt. Alle verwendeten Flüssigkeiten, Chemikalien und Arbeitsgeräte, einschließlich der Zentrifugenrotoren und -becher, wurden vorgekühlt. Zudem waren alle Utensilien zu autoklavieren oder mit Ethanol (75 %) zu desinfizieren.

2.3.2.1 Durchführung der Reinigung

Zur Extraktion der Viren aus den Pflanzenzellen wurde das infizierte Blattmaterial mit Puffer A und Chloroform im Verhältnis 1:1:1 (w/v/v) im Glashomogenisator (Fa. Milian SA, Genf) 30 sec niedertourig und 30 Sec hohtourig homogenisiert. Nach Abwiegen und Austarieren des Homogenats in Zentrifugenbecher folgte eine 11minütige Zentrifugation bei 10000 rpm und 4 °C. Die wässrige Phase wurde vorsichtig dekantiert und durch eine doppelte Mulltuchlage gefiltert. In Abhängigkeit von dem zu reinigenden CMV-Isolat musste dieser Schritt nach erneutem Waschen des Rückstandes mit Puffer A ein bis zweimal wiederholt werden, um die teilweise in großen Mengen in der organischen Phase verbliebenen Viruspartikel zu extrahieren.

Der aufgefangene Überstand war in Ultrazentrifugenbechern auszutarieren und 90 min bei 40000 rpm und 4 °C zu zentrifugieren. Das virushaltige Sediment konnte, nach Verwerfen des Überstandes, mit 5 – 10 ml Puffer B überschichtet und über Nacht zur Resuspendierung bei 4 °C aufbewahrt werden. Die klare Suspension wurde bei 6000 rpm und 4 °C für 11 min zentrifugiert. Nach Austarierung des Überstandes in Ultrazentrifugenröhrchen und Unterschichtung mit jeweils 10 ml einer 10 %igen Saccharoselösung erfolgte eine erneute Zentrifugation für 90 min bei 40000 rpm und 4 °C. Das verbleibende Virussediment wurde mit 1 – 2 ml Puffer C resuspendiert und zu gleichen Teilen mit Glycerin versetzt. Durch die Zugabe von Glycerin konnte die Virussuspension über längere Zeit bei –20 °C aufbewahrt werden, ohne an Infektiosität zu verlieren (HELLWALD, pers. Mitt.).

Da bei einigen Isolaten zunächst nur sehr unbefriedigende Reinigungsergebnisse erzielt werden konnten, wurden die zu verwerfenden Lösungen oder Sedimente in einigen Fällen aufbewahrt und im Elektronenmikroskop sowie durch Abstreichen auf Testpflanzen auf ihren Virusgehalt untersucht. Dadurch war es möglich, den Verlauf der Reinigung zu überprüfen, bzw. die Höhe der Virusverluste bei den einzelnen Reinigungsschritten zu erfassen. Durch einige Modifikationen, wie minimale Änderungen der Zentrifugationszeiten oder die Wiederholung eines Arbeitsschrittes, konnte daraufhin eine wesentliche Verbesserung des Reinigungsergebnisses erzielt werden (siehe Kap. 3.4.1).

2.3.2.2 Messung der Viruskonzentration und -qualität

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 10 µl der gereinigten Virussuspension, vor der Zugabe von Glycerin, mit 990 µl Puffer C vermischt. Die anschließende Messung der Verdünnung erfolgte in einem Spektrometer (UVIKON 933 Double Beam UV/VIS, Fa. Kontron Instruments, UK) jeweils bei 260 und 280 nm in Quarzküvetten 110 QS 10 nm (Fa. Hellma, Müllheim). Die Messung wurde 5 mal wiederholt und die Werte gemittelt. Bei Gurkenmosaikviren entspricht eine Konzentration von 1 mg Virus/ml einer Optischen Dichte $OD_{260} = 5,0$ bzw. ein Absorptionsindex von CMV bei 260 nm ($CMV A_{260\text{ nm}}$) von 5,0 entspricht 1 mg Virus/ml (FRANCKI *et al.* 1966). Durch die Division der Messwerte mit dem Wert „5,0“, konnte der Virusgehalt der gemessenen Suspension ermittelt werden. Als Reinheitskontrolle diente der Quotient $CMV A_{260\text{ nm}}/CMV A_{280\text{ nm}}$, welcher bei vollständig gereinigtem CMV dem Wert 1,7 entsprechen muss (BRUNT *et al.* 1997).

Die Suspensionen wurden nach der Messung aufgefangen und zur Überprüfung des Reinigungsergebnisses verwendet. Durch die Anfertigung von Tropfenpräparaten konnte elektronenmikroskopisch der Zustand der Viruspartikel sowie die Reinheit der Suspension untersucht werden. Zur Prüfung der Infektiosität mussten Teile der Suspensionen auf Pflanzen abgestrichen werden. Dazu wurden wiederum *Nicotiana*-Arten verwendet, wobei je nach Isolat diejenigen Pflanzen gewählt wurden, die nach Infektion üblicherweise deutliche Symptome zeigten. Des weiteren erfolgte eine serologische Untersuchung der gereinigten Isolate mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) zur Feststellung der Übereinstimmung der photometrisch gemessenen Viruskonzentrationen und der serologischen Nachweisempfindlichkeit.

2.3.3 Inokulation

2.3.3.1 Pflanzenpresssaft

Für die Virusvermehrung und –erhaltung sowie die Vorversuche dienten junge, symptomtragende Pflanzenblätter als Inokulum. Bei den Inokulationen mit Pflanzenpresssaft wurde virushaltiges Blattmaterial in einem Mörser mit 0,01 M Kaliumphosphatpuffer

(pH 7,0) homogenisiert und, nach Zugabe von Celite als Schleifmittel, mit dem Pinsel auf die Blätter der gesunden Pflanzen (3 – 4 Blattstadium) aufgetragen. Anschließend waren die inokulierten Blätter mit Wasser abzuspülen, um mögliche Celite-Rückstände zu entfernen und die Wundheilung zu beschleunigen. Alle Geräte wurden vor Gebrauch autoklaviert.

2.3.3.2 Gereinigte Virussuspension

Für die Untersuchungen der Wirt–Virus–Interaktionen musste gereinigte Virussuspension zur Inokulation verwendet werden, um das Aufbringen einer definierten Virusmenge auf die Versuchspflanzen zu ermöglichen. In diesem Fall war die Menge bzw. das Volumen des verfügbaren Inokulums beschränkt, was eine Abänderung der Inokulationsmethode erforderlich machte.

Neben der Inokulation mit einem Isolat, wurden auch Mischinokulationen mit jeweils zwei verschiedenen Isolaten durchgeführt, um eventuelle Wechselwirkungen feststellen zu können. Dabei sollte überprüft werden, ob die Kombination zweier Isolate eine signifikant schwächere oder stärkere Pflanzenreaktion hervorrief als die beiden entsprechenden Isolate, wenn sie einzeln inokuliert wurden.

Nach dem Bestäuben der Pflanzen mit Celite wurden 10 µl, bei den Mischinfektionen je 5 µl, der Virussuspension auf die beiden Keimblätter oder die ersten beiden Laubblättchen aufgetragen und im Anschluss mit einem abgeflachten Glasstab auf der Blattoberfläche verteilt. Danach erfolgte ebenfalls das Abspülen der Blätter mit Wasser. Der Glasstab musste nach jedem Inokulationsvorgang durch Eintauchen in Ethanol (96 %) und anschließendes Abflämmen desinfiziert werden. Aus dem bei –20 °C gelagerten Virus-Glycerin-Gemisch konnten kurz vor der Inokulation durch Zugabe von Kaliumphosphatpuffer die benötigten Inokulumdichten hergestellt werden. Inokuliert wurde je nach Versuchsfrage mit 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 und 0,00001 mg Virus/ml.

2.4 Erfassung der Wirtspflanzenbeeinträchtigung

Um einen Vergleich der Isolate zu ermöglichen, mussten die Versuche unter möglichst standardisierten Bedingungen durchgeführt werden. Daher wurden die Pflanzen eines Versuches alle von einer Person und zur gleichen Zeit inokuliert und ausgewertet. Die Versuchspflanzen standen von der Aussaat bis zum Abschluss der Versuche in einem klimagesteuerten Gewächshaus. Der Auswertungszeitraum orientierte sich an der Entwicklungsdauer der verschiedenen Wirtspflanzen. So konnten z.B. die Versuche mit Tomatenpflanzen in der Regel schon 40 Tage nach Inokulation abgebrochen werden, während sich eine Auswertung der Paprikapflanzen vor dem 50. Tag als nicht sinnvoll erwies. Teilweise wurde an mehreren Terminen bonitiert, um den Verlauf der Krankheit verfolgen zu können.

2.4.1 Ausprägung der Symptome

Die durch die CMV-Infektion an den Wirtspflanzen ausgelösten Symptome wurden visuell erfasst und mit einer Canon EOS 500 unter Tageslichtbeleuchtung photographisch dokumentiert. Lokale und systemische Symptome waren getrennt zu bonitieren. Bei der Auswertung der lokalen Symptome wurde neben der Art, die Anzahl sowie der Zeitpunkt des ersten Auftretens der Lokalläsionen festgehalten. Die systemischen Symptome wurden je nach Ausprägung bzw. Schwere der Pflanzenreaktion nach einem Schema von 0 – 10 (in ganzen Schritten) bewertet. Bei einem Boniturwert von 0 konnten keine Veränderungen im Vergleich zu den nichtinokulierten Pflanzen festgestellt werden. Der Boniturwert 10 wurde bei Welke und Absterbeerscheinungen vergeben bzw. wenn so starke Schäden auftraten, dass eine Erholung völlig auszuschließen war.

Aufgrund der großen Unterschiede in Symptomausprägung und Krankheitsverlauf musste für jede Versuchspflanzenart, nach Beobachtung und Analyse der auftretenden Symptome, ein individuelles Boniturschema erarbeitet werden. Eine detaillierte Beschreibung der Boniturwerte ist daher den entsprechenden Kapiteln zur Symptomausprägung im Ergebnisteil zu entnehmen. Während bei *Nicotiana* spp., Tomate und Paprika der Gesamteindruck der Pflanzen beurteilt wurde, musste bei den Gurkenpflanzen jedes Blatt einzeln bonitiert werden.

2.4.2 Entwicklung der Pflanzen

2.4.2.1 Vegetatives und generatives Wachstum

Als Parameter für das vegetative Wachstum der Pflanzen diente bei den Tomaten und Paprika die Länge in cm von der Stängelbasis bis zur Triebspitze. Bei den Gurken wurde stattdessen die Anzahl der Blätter pro Pflanze bestimmt. Zusätzlich wurde bei Gurke, *Nicotiana* spp. und Feldsalat die Biomasse bestimmt. Dazu waren die Pflanzen direkt über der Erde abzuschneiden, zur Bestimmung des Frischgewichtes zu wiegen und anschließend in Papiertüten je nach Menge und Feuchtigkeit 1 - 7 Tage bei 80 °C zu trocknen. Nach der Trocknung konnte durch erneutes Wiegen die Trockenmasse bestimmt werden. Zur Bestimmung des Einflusses der CMV-Infektion auf die Fruchtbildung wurden bei den Versuchen mit Paprika 84 Tage nach Inokulation die Früchte jeder Pflanze geerntet und einzeln gewogen. Früchte mit einem Gewicht unter 1 g wurden nicht berücksichtigt.

2.4.2.2 Chlorophyllgehalt

Der Einfluss der CMV-Isolate auf den Chlorophyllgehalt der infizierten Pflanzen wurde bei den Versuchen mit Tomaten, Paprika und Feldsalat durch Messungen mit einem Chlorophyll-Meter (SPAD-502, Minolta, Langenhagen) untersucht. Pro Versuchspflan-

ze wurden an den jungen, systemisch infizierten Blättern jeweils 10 Messungen durchgeführt und daraus der Mittelwert gebildet.

2.5 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Als serologische Nachweisverfahren wurden ein direkter DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich) nach CASPER & MEYER (1981) und ein indirekter TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich), modifiziert nach KOENIG & PAUL (1982), durchgeführt. Die ELISA-Varianten dienten zur Untersuchung des Einflusses der Wirtspflanzen auf die Vermehrung der CMV-Isolate bzw. des Zusammenhanges zwischen Pflanzenreaktion und Befall sowie der Überprüfung der gereinigten Virussuspensionen.

2.5.1 Verwendete Puffer und Lösungen

PBS-Stammlösung. (10fach):

80 g NaCl
2 g KH_2PO_4
29 g Na_2HPO_4
2 g KCL
mit A. bidest. auf 1 l auffüllen, pH 7,4

Waschpuffer:

PBS/2
0,05 % Tween 20, pH 7,4

Beschichtungspuffer:

1,59 g Na_2CO_3
2,93 g NaHCO_3
mit A. bidest. auf 1 l auffüllen, pH 9,6

Blockierungspuffer:

2 % Magermilch in PBS/2 und 1 - 2 Tropfen Tween 20
(Magermilchpulver bei 37 °C auflösen)

Konjugatpuffer:

PBS, pH 7,4
2 % PVP (Polyvinylpyrrolidon) 15.000 – 30.000 MG
2 % BSA (Rinderserumalbumin, IgG-frei)
0.05 % Tween 20

Extraktionspuffer für Tomate, Gurke, *Nicotiana* spp. und Feldsalat:
siehe Konjugatpuffer

Extraktionspuffer für Paprika:

- 0,1 M Tris-HCL-Puffer, pH 8,6
- 0,2 % PVP (Polyvinylpyrrolidon) 15.000 – 30.000 MG
- 0,4 % BSA (Rinderserumalbumin, IgG-frei)
- 0,1 % Tween 20

Substratpuffer:

- 97 ml Diethanolamin
- 800 ml A.bidest., pH 9,8

Substratlösung:

- 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in Substratpuffer

Die pH-Werte waren mit 1 M HCl oder 1 M NaOH einzustellen. Die Puffer wurden kurzfristig bei 4 °C gelagert oder vor Gebrauch frisch angesetzt, wodurch auf den Zusatz von Natriumazid (NaN_3), zur Verhinderung von pilzlichen oder bakteriellen Kontaminationen, verzichtet werden konnte.

2.5.2 Probenahme und Belegung

Bei der Probenahme für die Testung der Versuchspflanzen wurden 4 - 5 Stückchen der oberen systemisch infizierten Blätter entnommen, gewogen und direkt in verschweißbaren Extraktionsbeuteln (Universalbeutel mit Filterfolie, Fa. Bioreba, Reinach) im Verhältnis 1:5 (w/v) in Extraktionspuffer mit einem Handhomogenisator (Fa. Bioreba) homogenisiert. Mit Ausnahme einiger Versuche mit Gurkenpflanzen wurde zur Begrenzung des Probenumfangs nicht jede Pflanze einzeln getestet, sondern eine Mischprobe von allen Versuchspflanzen einer Variante zusammengestellt.

Zur Bestimmung des optimalen Probenpuffers wurde, wenn nicht bekannt, der pH-Wert des Pflanzenpresssaftes der jeweiligen Versuchspflanzen bestimmt. Bei Pflanzen mit sehr niedrigen pH-Wert wie Paprika (pH 5,8) erfolgte die Extraktion in einem Puffer mit pH 8,6, bei den Pflanzen mit einem pH-Wert um 7 in einem Puffer mit pH 7,4. Für die Untersuchungen mit gereinigten Virussuspensionen mussten nur die zu testenden Inokulumdichten durch Zugabe von Puffer C hergestellt werden.

Die für den ELISA verwendeten Polystyrol-Mikrotiterplatten (Nunc-PolySorpTM, Fa. NUNCTM, Wiesbaden) wurden mit je 100 µl der entsprechenden Suspension gefüllt. Um unerwünschte Randeffekte zu vermeiden, waren die Randkavernen ausschließlich mit Puffer zu füllen. In den verbliebenen 60 Kavernen pro Platte, konnten, mit jeweils einer Wiederholung, 29 Proben sowie eine Probenpufferkontrolle aufgetragen werden. Bei der Untersuchung von Pflanzenpresssäften wurden zudem Homogenate der entsprechenden nicht infizierten Versuchspflanzen als Negativ- oder Gesundheitskontrolle zur Feststellung unspezifischer Reaktionen von Pflanzenproteinen mit dem verwendeten Antiserum getestet.

Jede Platte war in der Regel mindestens zweimal mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen der Antikörper bei Beschichtung und Konjugatzugabe anzulegen. Die Antikörper wurden 1:500 und 1:1000, in einigen Fällen zusätzlich 1:1500, in Beschichtungs- bzw. Konjugatpuffer verdünnt, um eine optimale Kombination mit hohem positiven Farbwert bei gleichzeitig niedrigem unspezifischen Wert zu erreichen. Bei einer zu hoch gewählten Antikörperkonzentration bei der Beschichtung tritt eine Hemmung der homologen Reaktion und eine Förderung der unspezifischen Mitreaktion ein (CLARK und ADAMS 1977).

2.5.3 Durchführung eines direkten DAS-ELISA

Die hochgestellten Zahlen ⁽¹⁻⁸⁾ verweisen auf die schematische Darstellung eines DAS-ELISA in Abbildung 1.

Beschichtung (Anlagerung der Antikörper⁽³⁾ an die Unterlage⁽¹⁾): Belegung mit polyklonalen Antikörpern (CMV IgG*) in Beschichtungs-Puffer und anschließender Inkubation für 4 h bei 37 °C.

Probenzugabe (Andocken des Antigens⁽⁴⁾ bzw. der Viruspartikel an die kompatiblen Antikörper): Nach Zugabe der im Verhältnis 1:5 (w/v) in Probenpuffer homogenisierten Proben waren die Platten bei 4 °C über Nacht zu inkubieren.

Konjugatzugabe (Bindung der enzymgekoppelten Antikörper⁽⁷⁾ an die Viruspartikel): Auftragen der an alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper (CMV IgG AP-Konjugat*) in Konjugatpuffer und Inkubation für 4 h bei 37 °C. Waren keine Viren in den Proben enthalten, wurden die konjugierten Antikörper beim nachfolgenden Waschvorgang wieder aus den Kavernen gespült, deren Wände bereits mit Beschichtungs-Antikörpern belegt waren.

Substratzugabe: Enzymatische Spaltung⁽⁸⁾ des farblosen Substrates (1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in Substratpuffer) in Phosphorsäure und gelbes Nitrophenol. Inkubation bei Raumtemperatur und Messung der entstehenden Gelbfärbung zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

* Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSMZ), Braunschweig

Nach jedem Schritt erfolgte das Waschen der Platten in einem Plattenwaschgerät mit einem Waschkopf für 96 Kavernen (Tecan 96, Fa. TECAN, Crailsheim), um nicht gebundene Substanzen zu entfernen. Bei einem Waschvorgang wurde dreimal mit je 300 µl Waschpuffer und einer Einwirkungszeit von 10 Sec gespült. Während der Inkubationszeiten sollten die Platten eingetütet werden, um ein Austrocknen zu verhindern

2.5.4 Durchführung eines indirekten TAS-ELISA

Die hochgestellten Zahlen ⁽¹⁻⁸⁾ verweisen auf die schematische Darstellung eines TAS-ELISA in Abbildung 1.

Beschichtung, Proben- und Substratzugabe erfolgte wie bei der Durchführung des DAS-ELISA (siehe Kap. 2.5.3). Zusätzlich wurden nach der Beschichtung durch die Zugabe von 2 %iger Magermilchlösung (Inkubation 30 min bei 37 °C) eventuell noch freie Stellen an den Kavernenwänden belegt bzw. blockiert ⁽²⁾. Bei dem Schritt der Konjugatzugabe wurden zunächst monoklonale Maus-Antikörper ⁽⁵⁾ (MAB, aus Kulturüberstand*) 1:50 und 1:100 (v/v) in Konjugatpuffer aufgetragen. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C und Waschen der Platten wurden die Kavernen mit einem polyklonalen Antikörper ⁽⁶⁾ (RAM a.P., Rabbit Anti Mouse, Fa. DAKO Diagnostika, Hamburg) 1:1000 (v/v) in Konjugatpuffer belegt und ebenfalls 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschvorgang und dem Auftragen des Substrates erfolgte wiederum die Messung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inkubation bei Raumtemperatur.

* Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSMZ), Braunschweig

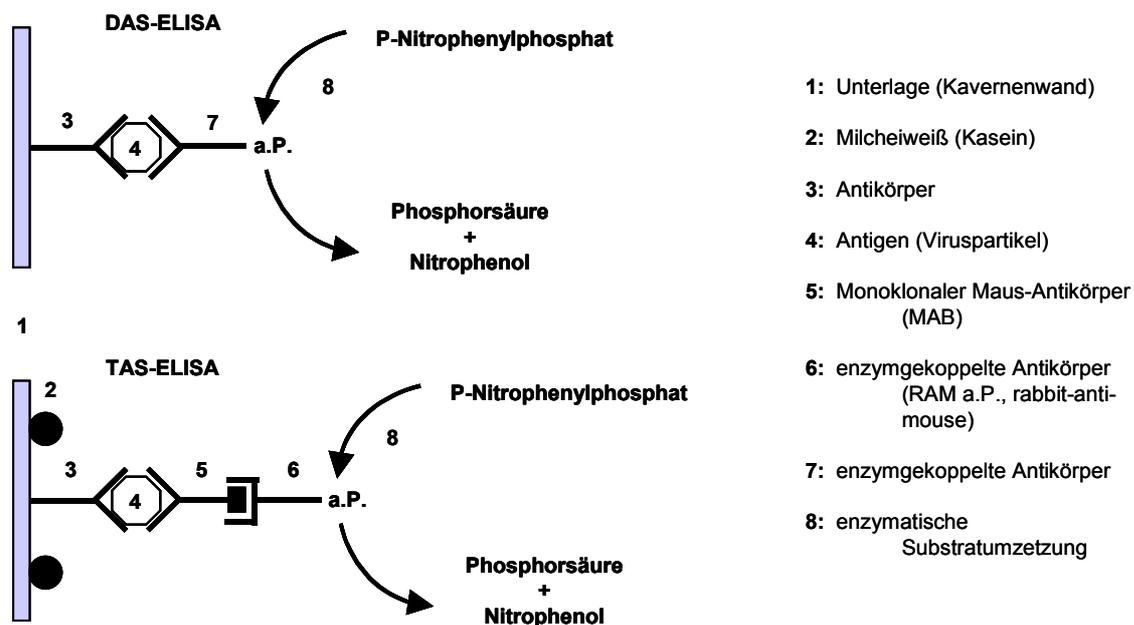


Abb. 1: Schematische Darstellung des direkten DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich) und indirekten TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich).

2.5.5 Auswertung

Nach Auftragen des Substrates erfolgte die Auswertung der Gelbfärbungsintensität mit einem SLT 400 AT ELISA-Reader (SLT, Crailsheim). Anzahl und Zeitpunkte der Messungen orientierten sich an der Geschwindigkeit der Substratumsetzung. Die Messungen

der Platten erfolgte in der Regel bei einem DAS-ELISA nach 10, 30, 60, 90, 120 min sowie 5 h, bei einem TAS-ELISA nach 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 min sowie 3 h nach Auftragen des Substrates und Inkubation bei Raumtemperatur. Dabei wurde ein Lichtstrahl mit 405 nm Wellenlänge durch jede der Kavernen geschickt und die Absorption durch das Substrat gemessen. Ein hoher Extinktionswert entsprach einer starken Gelbfärbung und damit einer hohen Viruskonzentration in der entsprechenden Kaverne. Bei einem Referenzfilter von 620 nm wurde die Absorption der Polystyrol-Platten gemessen und automatisch von den Messwerten abgezogen. Aus den bereinigten Messwerten konnte für jede Probe ein Mittelwert gebildet werden. Bei der Auswertung der Daten wurden bei den gereinigten Virussuspensionen die Extinktionswerte der Pufferkontrolle, bei den zu testenden Pflanzenpresssäften die Extinktionswerte der Gesundheitskontrolle von denen der Proben abgezogen.

2.6 Molekularbiologische Untersuchungen

Für die Isolierung der RNA aus pflanzlichem Gewebe wurden Proben systemisch infizierter Tabakblätter (*N. tabacum* „Samsun-NN“, *N. tabacum* „Turkish Samsun“) 10 – 14 Tage nach Inokulation mit den CMV-Isolaten verwendet. Die RT-PCRs mit Untergruppen-spezifischen Primerkombinationen sowie mit generellen CMV-Hüllprotein Primern und anschließender Restriktion dienten zur Typisierung der verwendeten Isolate. Eine weitere RT-PCR wurde zum Nachweis von CMV-Satelliten-RNA durchgeführt. Mittels Isolierung und Darstellung von dsRNA konnte die Replikationssituation der infizierten Pflanzen erfasst werden. Mit dieser Methode können alle für CMV typischen drei genomischen RNAs 1, 2 und 3 sowie die subgenomische RNA 4 sichtbar gemacht werden und auch die dsRNAs der viralen Satelliten sind als kleinere Moleküle gut in der Elektrophorese darstellbar (WINTER, pers. Mitt.).

Die RT-PCR mit Untergruppen-spezifischen Primern wurde am Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Hohenheim unter Leitung von Herrn Dr. K.-H. Hellwald, alle weiteren Untersuchungen unter Leitung von Herrn Dr. S. Winter an der BBA (Braunschweig) durchgeführt. Alle benötigten Utensilien und Reagenzien wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Da sich die Protokolle zur Gesamt-RNA Extraktion, Reverser Transkription, PCR und Gel-Elektrophorese jeweils sehr ähnelten, wurden sie hier allgemein beschrieben und auf Unterschiede hingewiesen.

2.6.1 Extraktion der Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe

Die Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe als Templates für die RT-PCRs wurde nach einer leicht modifizierten Methode von CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987) extrahiert. Dazu mußten 200 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit ca. 2 ml Guanidium-Extraktionspuffer (4 M Guanidiumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat pH 7,0, (20 mM EDTA), 0,5 % (w/v) N-Laurylsarcosin, 0,1 M 2-Mercaptoethanol, 1 % (w/v) lösliches Polyvinylpyrrolidon (PVP)) homogenisiert werden. Jeweils 400 µl des

Homogenats wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (äquibriert in 1 M Na-Acetat pH 4,5) versetzt, 20 sec gut geschüttelt (vortexen) und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 rpm (Centrifuge Eppendorf 5417R, München) konnte die RNA-haltige wässrige Phase in sterile Eppendorfgefäße überführt und zur Fällung der RNA auf 0,3 M Na-Acetat und 2,5 Vol% Ethanol (2,5-faches Volumen Ethanol_{abs}, 0,1-faches Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,3) eingestellt werden. Danach wurde die RNA 30 min auf Eis präzipitiert und 20 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Nukleinsäurepellets wurden in 70 % Ethanol gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge (Vacuum Concentrator, Bachofer, Reutlingen) getrocknet und in 50 µl sterilem Wasser resuspendiert. Von der extrahierten RNA konnten jeweils 1 – 2 µl als Template für die RT-PCR eingesetzt werden.

In Hohenheim wurden die Proben in RNA-Extraktionspuffer (50 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA, 2 % SDS (Sodiumdodecylsulfat)) homogenisiert, der Suspension zur Trennung der RNA von Proteinen und DNA das gleiche Volumen Phenol/Chloroform 1:1 (v/v) zugegeben und anschließend für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase war jeweils abzunehmen und der Vorgang noch zweimal zu wiederholen. Zur Fällung der RNA wurde die Suspension mit dem 5-fachen Volumen Ethanol (95%) und 1 Volumen 5 M Ammoniumacetat versetzt und über Nacht bei –80 °C gefällt.

2.6.2 Präparation von doppelsträngiger RNA aus pflanzlichem Gewebe

Die Isolierung und Analyse der dsRNAs wurde an der BBA in Braunschweig nach einer vereinfachten Methode von VALVERDE *et al.* (1986), basierend auf den Methoden von MORRIS & DODDS (1979) und JORDAN *et al.* (1983), durchgeführt. Die Methode basiert auf dem Prinzip einer unterschiedlichen Affinität von DNA, RNA, Proteinen bzw. ssRNA und dsRNA an einen Anionenaustauscher in Abhängigkeit von pH-Wert und Ionenstärke des Puffers. In diesem Fall wurde als Anionenaustauscher Cellulose CF-11 (Whatmann, Clifton, New Jersey, USA) verwendet, an die bei einem Gehalt des Puffers von 16 Vol% Ethanol nur die dsRNA bindet (WINTER, pers. Mitt.).

Zur Extraktion der RNA wurden 20 – 30 g systemisch infiziertes Blattmaterial in STE 2x (0,1 M Tris-Cl, 2 mM EDTA, 0,2 M NaCl pH 6,84), 2 % Mercaptoethanol, 1 % SDS (Sodiumdodecylsulfat) und 2 Vol Phenol/Chloroform 1:1 (v/w) homogenisiert und für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und gerührt. Danach wurde zur Phasentrennung für 20 min zentrifugiert, die wässrige Phase dekantiert, mit Ethanol_{abs} auf 16 % Ethanol eingestellt, mit ca. 2 g Cellulose CF-11 versetzt und zur Bindung der dsRNA an die Cellulose für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach einer Zentrifugation von 2 min bei 4000 rpm wurde die Flüssigkeit entfernt, ca. 25 ml STE16 (STE, 16 % Ethanol (v/v)) zugegeben und gut gemischt. Dieser Vorgang wurde 2 – 3 mal wiederholt, das Material in Säulen gefüllt und erneut mit 100 ml STE16 gewaschen. Danach wurden die Säulen getrocknet, die dsRNA mit 4 mal 6 ml STE eluiert, noch mal in die Säulen

gegeben mit 100 ml STE16 gewaschen, getrocknet und mit 3 mal 4 ml STE eluiert. Die RNA wurde wie in 2.6.1 beschrieben gefällt, gewaschen und resuspendiert. Zur Auswertung wurde die präparierte dsRNA auf einem 1,2 %igen Agarosegel bei 75 V für ca. 1 h elektrophoretisch getrennt.

2.6.3 Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

2.6.3.1 PCR-Primer

Für jedes zu amplifizierende Fragment wurden jeweils ein „downstream“-Primer (-), der zum 3'-Ende komplementäre (anti-sense) Primer für die cDNA-Synthese, und ein „upstream“-Primer, der zum 5'-Ende komplementäre (sense) Primer, verwendet (Tab. 2). Die Hüllprotein-Primer 3'CP (-) und 5'CP (+) basieren auf CMV-Q RNA3 und amplifizieren ein 870 bp Fragment aller CMV-Isolate, welches durch den anschließenden Verdau mit dem Restriktionsenzym MspI in für die Isolate der Untergruppe I und II spezifische Fragmente geschnitten werden kann (RIZOS *et al.* 1992). Die Primer LS 2.2 (-) und LS 0.8 (+), basierend auf einer Sequenz von CMV-LS RNA 2 (ANONYMOUS 1998), und FNY 1.8 (-), basierend auf einer Sequenz von CMV-FNY RNA 2 (K.-H. HELLWALD, pers. Mitt), wurden in einer Multiplex-PCR eingesetzt, wobei LS 2.2 (-)/LS 0.8 (+) ein Fragment von ca. 1400 bp der Isolate aus Untergruppe II und LS 2.2 (-)/FNY 1.8 (-) ein Fragment von ca. 400 bp der Isolate aus Untergruppe I amplifizieren (HELLWALD, pers. Mitt.). Die Primer CMVsat53S und CMVsat256C zum generellen Nachweis von CMV Satelliten-RNA amplifizieren ein Fragment von ca. 280 bp (WINTER, pers. Mitt.).

Tab. 2: Für RT-PCR verwendete Primer.

Primer (Polarität)	Sequenz	Position	Referenz
3' CP (-)	5'-GGCGAATTCGAGCTCGCCGTAAGCTGGATGGAC-3'	RNA 3	RIZOS <i>et al.</i> 1992
5' CP (+)	5'-CTCGAATTCGGATCCGCTTCTCCGCGAG-3'		
LS 2.2 (-)	5'-AGTTAGCGGTGTACTTCTTA-3'	RNA 2	REZAIAN <i>et al.</i> 1984; ANONYMOUS 1998
LS 0.8 (+)	5'-TTCTTATTCAAAGACCGAGG-3'		
FNY 1.8 (+)	5'-CACCGACCAATTCGAAAAGC-3'	RNA 2	HELLWALD, pers. Mitt.; ANONYMOUS 1998
CMVsat53S	5'-TCACTCGGCGGTGTGGGTTA-3'	Sat- RNA	WINTER, pers. Mitt.
CMVsat256C	5'-TTTTAGCCTCTCCCTGCGTG-3'		

2.6.3.2 Reverse Transkription (RT)

Nach Standardprotokoll für die Erststrang-cDNA-Synthese der Firma Roche (Mannheim) wurde zur Herstellung einer komplementären cDNA ein Mix von 5 µl der

Gesamt-RNA (ca. 1 µg/µl), 2,5 µl „downstream“-Primer (1 µg/µl) und 2,5 µl A.bidest für 2 min bei 70 – 80 °C inkubiert und dann zur Hybridisierung des Primer auf Eis abgekühlt. Davon wurden 2 µl mit 4 µl 5x Reverse Transkriptase Puffer, 4 µl dNTPs (2,5 mM), 1 µl Dithiothreitol (0,1 M DTT), 0,5 µl RNasin (RNase-Inhibitor), 0,25 µl MMLV-Reverse Transkriptase (50 u/µl) mit A.bidest auf 20 µl aufgefüllt und für 60 - 90 min bei 37 °C zur cDNA Synthese inkubiert.

2.6.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurden jeweils 1 µl der cDNA mit 5 µl 10x Reaktions-Puffer, 2,5 µl MgCl₂, 0,5 µl Taq-Polymerase (5 u/µl), 2,5 µl „upstream“-Primer (bei Multiplex-PCR jeweils 2,5 µl der beiden Primer) vermischt, mit A.bidest auf 50 µl eingestellt und in einen Thermocycler (MJ Research Inc., Watertown, Massachusetts, USA) gegeben, der die einzelnen Reaktionsschritte über die Temperatur reguliert. Die genauen Bedingungen der sich wiederholenden Amplifikations-Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung der Primer (Annealing) und Verlängerung der Primer (Elongation) sind in Tabelle 3 aufgeführt. Vor Beginn der Zyklen erfolgte eine initiale Denaturierung für 5 min bei 94 – 95 °C. Nach einer finalen Elongation für 5 min bei 72 °C zum Abschluss der PCR wurden die Proben auf 4 °C runtergekühlt.

Im Anschluß an die RT-PCR mit den generellen CMV-Primern (5'CP/3'CP) wurde ein Verdau mit dem Restriktionsenzym MspI durchgeführt. Durch den MspI-Verdau des amplifizierten Fragmentes entstehen spezifische Restriktionsmuster für CMV-Isolate der Untergruppe I mit zwei Fragmenten von ca. 540 und 340 bp und der Untergruppe II mit vier Fragmenten von ca. 250, 200, 160 und 130 bp (RIZOS *et al.* 1992).

Tab. 3: Zur Amplifikation der cDNA angewendete PCR-Bedingungen.

Primer-Kombination	Zyklen	Denaturierung	Annealing	Elongation
5' CP / 3' CP	40	94 °C, 30 sec	50 °C, 30 sec	72 °C, 30 sec
LS 2.2 / LS 0.8 / FNY 1.8	30	95 °C, 30 sec	54 °C, 30 sec	72 °C, 30 sec
CMVsat53S / CMVsat256C	40	94 °C, 30 sec	58 °C, 30 sec	72 °C, 30 sec

2.6.3.4 Gel-Elektrophorese

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde ein 1 – 2 %iges Agarosegel gegossen (1 %ig: 1 g Agarose auf 100 ml 1x TAE-Puffer (TAE 50x: 242 g Tris-Base, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 mit 1000 ml A. bidest auffüllen)) und in eine mit TAE-Puffer gefüllte Kammer plaziert. Jeweils 5 µl der PCR-Produkte wurde mit 5 µl Stop-Lösung (Bromphenolblau) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde bei der BBA Braunschweig ein λ DNA PstI-Marker (Fragmentgrößen 11500 -

250 bp), an der Universität Hohenheim ein λ DNA BstEII-Marker Eco 47III/Eco91I (Fragmentgrößen 20995 - 702 bp) verwendet. Nach einer Laufzeit von ca. 100 min bei 90 Volt wurden die Gele zur Anfärbung der Banden 15 min in einem Ethidiumbromid-Bad inkubiert, gewässert und im Anschluss unter UV-Licht photographiert. In CorelDraw[®] (Version 9.0 für Windows[®] 2000, Corel Corporation, Unterschleißheim) wurde eine Farbumkehrung der Bilder durchgeführt.

2.7 Mikroskopische Untersuchungen

Die Anfertigung und anschließende elektronenmikroskopische Untersuchung der Tropfenpräparate diente als schnelle Methode zur Kontrolle eventueller Virusverluste während der einzelnen Reinigungsschritte und zur Überprüfung von Kontaminationen oder Verunreinigungen der gereinigten Virussuspensionen sowie des Zustandes der darin enthaltenen Viruspartikel. Die Semi- und Ultradünnschnitte wurden zur Untersuchung CMV-induzierter fein- und ultrastruktureller Veränderungen infizierter Wirtszellen hergestellt.

2.7.1 Anfertigung der Tropfenpräparate

Durch Auflegen auf einen auf der Wasseroberfläche flotierenden Pioloform-Film (Fa. Plano, Wetzlar) wurden die verwendeten Kupfernetzchen (300 - 400 mesh, Agar-Scientific, Fa. Plano) befilmt und im Anschluss zur Stabilisierung des Films im Hochvakuum mit Kohle bedampft.

Die Kupfernetzchen wurden mit der befilmten Seite auf jeweils zwei Tropfen der zu testenden Suspension gelegt und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur mit ca. 40 Tropfen Aqua bidest gespült. Nach vorsichtigem Abtupfen auf Filterpapier wurden die Netzchen zur Kontrastierung für ca. 3 Sec mit 2 %igem Uranylacetat benetzt und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

2.7.2 Präparation der Gewebeproben

Für die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Gewebeschnitten wurden von *N. rustica* und *N. tabacum* „Samsun-NN“ 19 Tage nach Inokulation und von Tomatenpflanzen 14 Tage nach Inokulation gezielt Proben häufig auftretender, charakteristischer Blattsymptome entnommen. Für den Vergleich mit gesundem Pflanzengewebe wurden auch nicht inokulierte Pflanzen an jeweils identischen Blattstellen beprobt. Die Probenahme erfolgte immer am Vormittag, um assimilationsbedingte Stärkeanreicherungen bzw. Unterschiede in den Mesophyllzellen der Blätter zu reduzieren.

2.7.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Natriumcacodylatpuffer (0,2 M):

- 0,2 M Na-Cacodylat
- 4 mM CaCl₂, pH 7,35

Fixierlösung nach KARNOVSKY (1965):

- 1 Vol 8 %ige Formaldehydlösung
- 1 Vol 8 %ige Glutaraldehydlösung
- 2 Vol 0,2 M Natriumcacodylatpuffer

Osmiumteroxid-Fixierlösung nach DALTON (1955):

- 1 Vol 0,4 % KCr₂O₇
- 1 Vol 3,4 % NaCl
- 2 Vol 2% OsO₄

ERL-Harz nach SPURR (1969):

- 10 g ERL 4206 (Vinylcyclohexandioxid)
- 6 g D.E.R. (Diglycidylether von Polypropylenglycol)
- 26 g NSA (Nonenylsuccinatanhydrid)
- 0,4 g S-1 (Dimethylaminoethanol)

Bleicitratlösung nach REYNOLDS (1963):

- 1,33 g Pb(NO₃)₂
- 1,76 g Na₃(C₆H₅O₇) x 2 H₂O
- in 30 ml A. bidest
- mit ca. 8 ml NaOH auf pH 12,0 einstellen
- auffüllen auf 50 ml mit A. bidest)

2.7.2.2 Probenaufbereitung und Einbettung

Von makroskopisch sichtbaren Symptomen und den entsprechenden Kontrollvarianten wurden jeweils 3 – 4 Blattstückchen à 2 mal 4 mm² mit einem scharfen Rasiermesser herausgetrennt, sofort in eine Fixierlösung nach KARNOVSKY (1965) überführt und nach 30 min Infiltration unter leichtem Vakuum für weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen in 0,2 M Natriumcacodylatpuffer für jeweils 10 min und Inkubation bei 4 °C über Nacht wurden die Proben in Osmiumtetroxid-Fixierlösung nach DALTON (1955), modifiziert nach WOHLFAHRT-BOTTERMANN (1957), für 2 h bei Raumtemperatur nachfixiert bzw. vorkontrastiert.

In einer aufsteigenden Ethanol-Reihe, 15 und 30 % (jeweils 20 min), 50, 70, 90, 96 und 100 % (jeweils 2 mal 20 min) in A. bidest und einer letzten Stufe in Propylenoxid (2 mal 20 min) waren die Proben zu dehydrieren. Die Einbettung erfolgte in ERL-Harz nach SPURR (1969). Dazu wurden die Proben in einer aufsteigenden ERL-Harz-

/Propylenoxid-Reihe (1:3 über Nacht; 1:1 für 8 h, 3:1 über Nacht; 100 % ERL Harz für 1 – 2 Tage) bei 4 °C infiltriert. Die anschließende Polymerisation erfolgte in 100 % ERL-Harz in Flacheinbettungsschalen für 8 h bei 70 °C.

2.7.2.3 Herstellung der Gewebeschnitte

Die Anfertigung der Semi- und Ultradünnschnitte erfolgte auf einem Ultramikrotom (Ultracut E, Fa. Reichert-Jung, Wien). Vor dem Schneiden mussten die Harzblöcke mit einer scharfen Rasierklinge trapezförmig angetrimmt werden.

Für die Lichtmikroskopie wurden mit einem Glasmesser Semidünnschnitte in einer Dicke von 0,5 – 1,0 µm angefertigt, auf einen fettfreien Glasobjektträger in einen Tropfen *A. bidest* übertragen und auf einer Wärmebank bei 70 – 80 °C angetrocknet. Eine Übersichtsfärbung erfolgte durch Überschichten der Schnitte mit einer Färbelösung (1 % Toluidinblau in Phosphatpuffer, pH 6,0 – 8,0) (GERLACH 1984). Nach dem Spülen mit *A. bidest* und anschließendem Trocknen konnten die Schnitte durch Auflegen eines Deckglases mit einem Tropfen Entellan (schnell trocknende Kunststofflösung) luftdicht eingeschlossen werden.

Für die Elektronenmikroskopie wurden mit einem Diamantmesser (Fa. Diatom, Lichtenstein) Ultradünnschnitte in einer Dicke von 60 – 100 nm angefertigt (SITTE 1985) und nach dem Strecken der Schnitte mit Chloroform auf Polioform-beschichtete Kupferschlitzblenden (2 mm x 1 mm, Agar-Scientific, Fa. Plano) übertragen. Zur Verstärkung des Kontrastes durch die Anlagerung von elektronendichtem Material in Form von Schwermetallsalzen nach GEYER (1973) wurden die Schnitte mit 2 % Uranylacetat und einer wässrigen Bleicitratlösung nach REYNOLDS (1963) in einer lichtdichten Schale inkubiert bzw. nachkontrastiert.

2.7.3 Mikroskopie

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Semidünnschnitte stand ein mit fünf PL Fluotar Objektiven (5-, 10-, 20-, 40- und 100fache Vergrößerung) und einer digitalen Kamera Hitachi HV-C20A, Düsseldorf) ausgestattetes Leitz DMRP Photomikroskop (Leica, Bensheim) zur Verfügung. Die Feststellung der Zellgrößen bzw. des Vergrößerungsmaßstabes war mit Hilfe der Software Diskus (Version 4.20, Hilgers, Königswinter) möglich.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Tropfenpräparate und Ultradünnschnitte erfolgte mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop EM 109 (Fa. Zeiss, Jena). Zur Photographie wurden Kodak-Filme (Technical Pan, 25 ASA) verwendet.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung des Datenmaterials erfolgte mit dem Statistik-Programmpaket SigmaStat[®] (Version 2.0 für Windows[®] 95, NT&3.1, Jandel Scientific Software, USA). Die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede in den Graphiken erfolgte bei Vergleichen nur zweier Werte durch *, bei mehr als zwei Varianten durch unterschiedliche Buchstaben.

Die Werte wurden auf Normalverteilung und Varianzhomogenität geprüft und bei Erfüllung beider Bedingungen varianzanalytisch mit $p \leq 0,05$ verrechnet. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurden mit dem t-Test, bei mehr als zwei Varianten mit dem TUKEY-Test bestimmt.

Wenn die Voraussetzungen der Normalverteilung der Daten und/oder der Varianzhomogenität nicht erfüllt waren, erfolgte die varianzanalytische Verrechnung mit dem H-Test nach KRUSKAL-WALLIS mit $p \leq 0,05$. Bei mehrfachem Vergleich diente ein Multipler Rangsummentest nach STUDENT-NEWMAN-KEULS zur Berechnung signifikanter Unterschiede, bei nur zwei Varianten der MANN-WHITNEY-Rangsummentest (KÖHLER *et al.* 1996).

3 Ergebnisse

3.1 Molekularbiologische Differenzierung

Zur Typisierung der verwendeten CMV-Isolate wurde eine Multiplex-RT-PCR mit den Untergruppen-spezifischen Primerpaaren LS 2.2/FNY 1.8 (Untergruppe I) und LS 2.2/LS 0.8 (Untergruppe II) sowie eine RT-PCR mit den generellen CMV-Hüllprotein-Primern 5'CP/3'CP und anschließendem Verdau der PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym MspI durchgeführt.

Zur Überprüfung der Isolate auf eventuell vorhandene Satelliten-RNA wurde eine RT-PCR mit den Primern CMVsat53S/CMVsat256C zum generellen Nachweis von CMV Satellitensequenzen durchgeführt. Die Untersuchung von dsRNA Präparaten aus CMV-infizierten Pflanzen dienten zur Darstellung der Replikations-Intermediate in den infizierten Pflanzen. Des weiteren konnte der Nachweis der Satelliten-RNA mittels RT-PCR durch die Darstellung der dsRNA bestätigt werden.

3.1.1 Typisierung der CMV-Isolate

Die Multiplex-RT-PCR mit den Primern LS 2.2, FNY 1.8 und LS 0.8 ergab für alle getesteten Isolate eine spezifische Bande und ermöglichte eine Zuordnung der Isolate 1, 4, A und B in die Untergruppe I (amplifiziertes Fragment mit ca. 400 bp) und der Isolate 2, 5, 10, 11 und C in die Untergruppe II (amplifiziertes Fragment mit ca. 1400 bp) (Abb. 2).

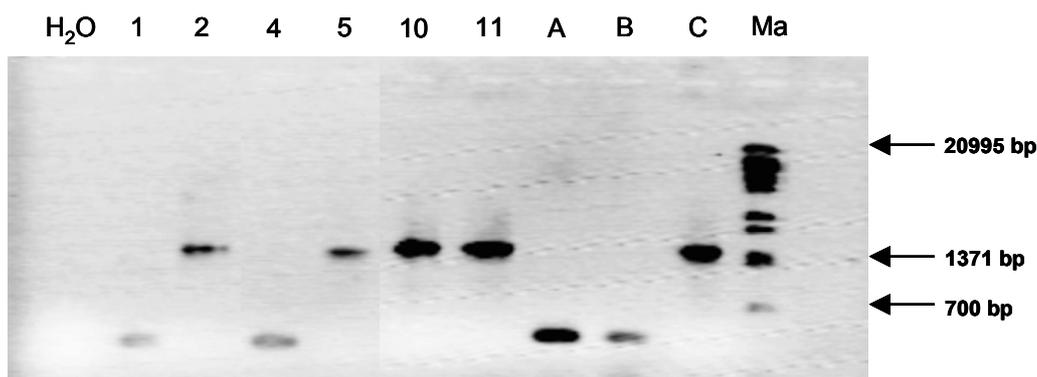


Abb. 2: Produkte einer Multiplex-RT-PCR mit den Untergruppen-spezifischen Primerpaaren LS 2.2/FNY 1.8 (Untergruppe I, ca. 400 bp) und LS 2.2/LS 0.8 (Untergruppe II, ca. 1400 bp) der CMV-Isolate 1, 2, 4, 5, 10, 11, A, B und C, Marker λ DNA BstEII Eco 47III/Eco91I (Ma), Negativkontrolle (H₂O) (Negativbild eines mit Ethidiumbromid gefärbten 1 %igen Agarosegels).

Bei der RT-PCR mit den Primern 5'CP/3'CP wurde für alle getesteten Isolate ein Produkt mit ca. 870 bp amplifiziert (Abb. 3, links). Die Restriktionsmuster nach MspI-Verdau bestätigten die Ergebnisse der Multiplex-PCR (Abb. 3, rechts). Bei den Isolaten 1, 4, A und B wurden zwei Restriktions-Fragmente mit ca. 540 bzw. 340 bp (spezifisch für Isolate der Untergruppe I) gebildet, während bei den Isolaten 2, 5, 10, 11 und C vier Fragmente mit ca. 250, 200, 160 und 130 bp (spezifisch für Isolate der Untergruppe II) entstanden. Bei letzteren lagen die zwei kleinsten Banden sehr eng beieinander, so dass nur eine breitere Bande zu sehen war. Unterschiede zwischen den Isolaten innerhalb der Untergruppen I und II konnten in dem Bandenmuster nicht erkannt werden.

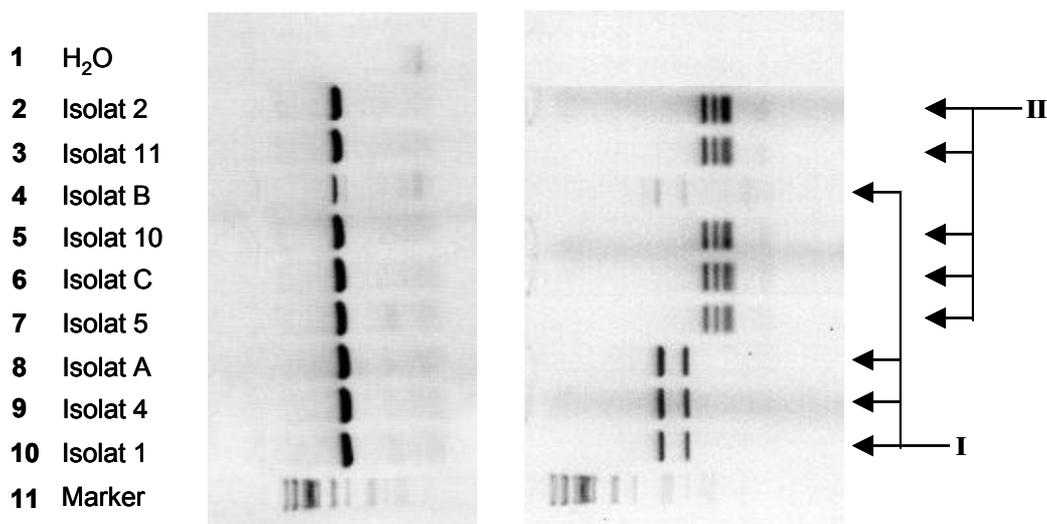


Abb. 3: Produkte einer RT-PCR mit generellen CMV-Primern 5'CP/3'CP (links) und für die CMV-Untergruppen I und II spezifische Fragmente nach Verdau mit dem Restriktionsenzym MspI (rechts) der CMV-Isolate 1, 2, 4, 5, 10, 11, A, B und C, Marker λ DNA PstI, Negativkontrolle(H₂O) (Negativbild eines mit Ethidiumbromid gefärbten 2 %igen Agarosegels).

3.1.2 Nachweis von Satelliten-RNA

Bei der RT-PCR mit den generellen Primern für CMV Satelliten-RNA CMVsat53S und CMVsat256C wurde für alle CMV-Isolate ein ca. 280 bp großes Fragment amplifiziert (Abb. 4). Da bei jedem Isolat die gleiche spezifische Bande auftrat wie bei der als Positivkontrolle verwendeten Probe (CMV mit Satelliten-RNA Carna5), war davon auszugehen, dass alle in den Versuchen eingesetzten CMV-Isolate mit Satelliten-RNA assoziiert waren. Um welche Satelliten-RNA es sich jeweils handelte, konnte mit den hier verwendeten Primern nicht geklärt werden.

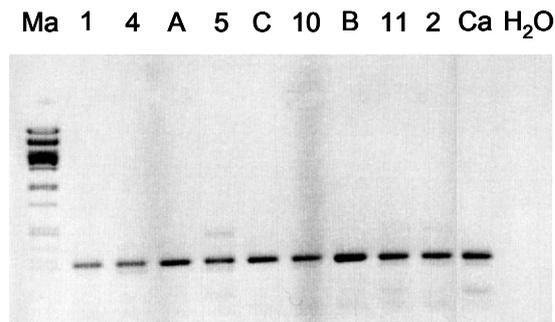


Abb. 4: Produkte einer RT-PCR mit Primern CMVsat53S/CMVsat256C zum Nachweis von CMV Satelliten-RNA der CMV-Isolate 1, 2, 4, 5, 10, 11, A, B und C, Marker λ DNA PstI (Ma), Positivkontrolle CMV mit Carna5 (Ca), Negativkontrolle (H_2O) (Negativbild eines mit Ethidiumbromid gefärbten 2 %igen Agarosegels).

3.1.3 Analyse doppelsträngiger RNA

Die Darstellung der dsRNA-Profile in der Elektrophorese gab die Replikationssituation in den CMV-infizierten Pflanzen gut wieder (Abb. 5). Mit Ausnahme von Isolat B waren die genomischen CMV-RNAs 1, 2 und 3 sowie die subgenomische RNA 4 der CMV-Isolate ausreichend in der Elektrophorese zu erkennen. Bei Isolat B zeigte sich ebenfalls das typische Bandenmuster, welches aber sehr schwach ausfiel und darum auf der Ablichtung des Gels kaum zu erkennen war. Die Satelliten wurden als kleinere Moleküle ebenfalls gut in der dsRNA Elektrophorese dargestellt, womit der positive Nachweis der Satelliten-RNA mittels RT-PCR bei allen Isolaten bestätigt werden konnte. Die im Vergleich zu den Banden viraler dsRNA wesentlich stärker ausgeprägten Banden für die dsSatelliten-RNA ließen zudem vermuten, dass sich die Satelliten in großen Mengen in den infizierten Tabakpflanzen akkumuliert hatten. Zwischen den Banden für RNA 4 und Satelliten-RNA wurde außer bei den Isolaten 1 und B bei allen Proben eine weitere dsRNA-Bande sichtbar, deren Ursprung unbekannt ist.

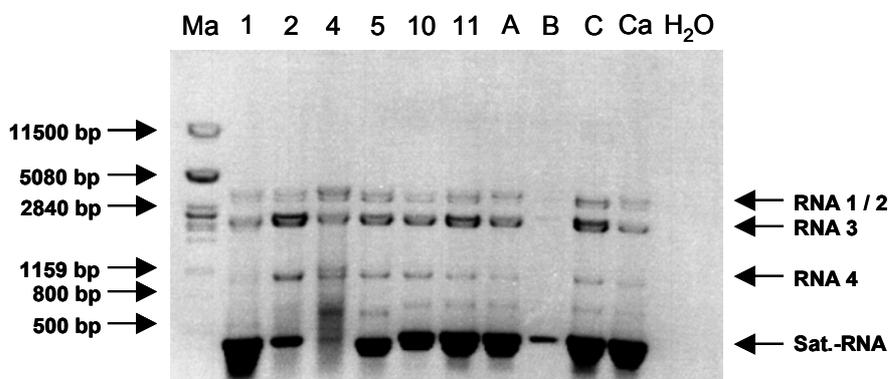


Abb. 5: Elektrophorese doppelsträngiger RNAs extrahiert aus mit den CMV-Isolaten 1, 2, 4, 5, 10, 11, A, B und C infizierten *N. tabacum* „Sammsun-NN“, Marker λ DNA PstI (Ma), Positivkontrolle CMV mit Carna5 (Ca), Negativkontrolle (H_2O) (Negativbild eines mit Ethidiumbromid gefärbten 1,2 %igen Agarosegels).

3.2 Symptomatologie

Die durch die CMV–Infektion auftretenden Symptome wurden an verschiedenen Wirtspflanzen erfasst und dokumentiert. Dabei war zu unterscheiden zwischen lokalen Symptomen am Ort der Inokulation und den systemischen Symptomen, welche nach Transport der Viren in den nachwachsenden Pflanzenteilen auftreten. Auf Paprika- und Tomatenpflanzen konnten in keinem Fall lokale Symptome beobachtet werden. Die inokulierten Laubblätter der *Nicotiana* - Arten sowie die fleischigen Keimblätter der Gurke zeigten dagegen oft deutliche Lokalläsionen.

Da diese mit bloßen Auge zu erkennenden (makroskopischen) Symptome in der Regel eine Folge virus-induzierter histologischer und zytologischer Veränderungen in den betroffenen Pflanzen ist, wurden von *N. rustica* und *N. tabacum* „Samsun-NN“ 19 Tage, von Tomatenpflanzen 15 Tage nach Inokulation Proben charakteristischer Symptome genommen und nach Anfertigung von Gewebeschnitten im Licht- und Elektronenmikroskop auf CMV-induzierte fein- bzw. ultrastrukturelle Veränderungen untersucht. Für den Vergleich mit gesundem Pflanzengewebe wurden auch nicht inokulierte Pflanzen an jeweils identischen Blattstellen beprobt.

3.2.1 Makroskopische Veränderungen

3.2.1.1 *Nicotiana*-Arten

Bei den Pflanzen der Gattung *Nicotiana* konnte als Reaktion auf die Virusinfektion eine große Vielfalt an Veränderungen beobachtet werden. Dabei waren sowohl die lokalen als auch die systemischen Symptome häufig charakteristisch bzw. konnten je nach CMV-Isolat äußerst unterschiedlich ausfallen.

An den inokulierten Blättern von *Nicotiana rustica* traten entweder keine lokalen Symptome oder runde Chlorosen verschiedener Größe auf (Bildseite I, Bild b). Nur ein Isolat induzierte eckige, ungleichmäßig umrissene Chlorosen (Bildseite I, Bild c). Nekrosen jeglicher Art wie bei den anderen *Nicotiana*-Arten konnten nicht festgestellt werden. Als erstes systemisches Symptom zeigte sich häufig eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Adernaufhellung (Bildseite I, Bild d). Die darauf folgenden Symptome fielen in Abhängigkeit des inokulierten Isolates sehr unterschiedlich aus. Einige Pflanzen zeigten interkostale Chlorosen, die ölig glänzten (Bildseite I, Bild e). Blattform und Habitus der Pflanzen blieben erhalten und Unebenheiten der Blattoberfläche (Bildseite I, Bild f) waren selten. In anderen Fällen traten blasige Auftreibungen in unterschiedlichen Größen und Stärken auf (Bildseite I, Bilder g – h; II, a, c und d). Der charakteristische Wechsel von chlorotischen Blattbereichen mit Arealen, die eine ungewöhnlich dunkle Grünfärbung, sog. „dark green islands“, aufwiesen, konnte dabei unterschiedlich stark ausfallen. Während einige Pflanzen ansonsten im Vergleich mit nicht infizierten Pflanzen in ihrem Wachstum nicht stark gestört schienen (Bildseite II, Bild d), zeigten andere zusätzlich starke Blatt- und Wuchsdeformationen (Bildseite II,

Bilder a und c). Die Blattränder waren gewellt, die Blätter schmäler und teilweise extrem eingeschnürt. Durch eine Verschmälerung am Blattgrund, waren die Blätter kleiner und es entstand der Eindruck untypisch langer Blattstiele.

Eine charakteristische lokale Reaktion von *Nicotiana tabacum* „Samsun-NN“ auf die CMV-Inokulation waren mehr oder weniger konzentrisch angeordnete kleine Nekrosen (Ringflecken) (Bildseite III, Bild a und b). Selten wurden auch kleine, ungleichmäßig umrissene Chlorosen beobachtet (Bildseite III, Bild c). Lokale Symptome konnten aber auch vollständig ausbleiben. Als erste systemische Reaktion auf die Infektion wurde oft eine Aufhellung der Blattadern beobachtet (Bildseite III, Bild d). Ein typisches Symptom an *N. tabacum* „Samsun-NN“ waren großflächige interkostale Chlorosen. Diese konnten entweder ganz deutlich (Bildseite III, Bild f) oder eher durchscheinend und nur gegen das Licht zu erkennen sein (Bildseite III, Bild e). Blasige Auftreibungen (Bildseite III, Bild g) traten nur selten und im Vergleich mit *N. rustica* in abgeschwächter Form auf. Einige Pflanzen zeigten wiederum ausgeprägte Blatt- und Wuchsabnormalitäten. Neben Einschnürungen (Bildseite III, Bild h), kam es durch eine Verschmälerung der Blätter insbesondere am Blattgrund, zu einer Reduktion der Blattfläche (Bildseite III, Bild g). Seltener konnte auch eine unnatürlich aufrechte Stellung der oberen Blätter beobachtet werden.

Als lokale Symptome an *Nicotiana glutinosa* konnten nekrotische Ringflecken oder kleine runde Chlorosen auftreten. Häufig war aber auch keine lokale Reaktion auf die Virusinokulation festzustellen. Typische systemische Symptome waren Adernaufhellung und Chlorosen, die sich in der Regel entlang der Blattadern entwickelten (Bildseite IV, Bilder a – c). Blasige Auftreibungen sowie besonders dunkelgrün gefärbte Blattbereiche, wurden ebenfalls beobachtet (Bildseite IV, Bilder d – f). Während manche Pflanzen in ihrem Wachstum kaum behindert schienen (Bildseite IV, Bild h), konnten in einigen Fällen starke Blatt- und Wuchsdeformationen festgestellt werden (Bildseite IV, Bilder e – g). Die Blattränder waren gewellt und eingerollt, die Blätter in ihrer Blattspreite extrem reduziert (Schmalblättrigkeit). Des Weiteren zeigten die Pflanzen teilweise verlängerte Blattstiele und Internodien. Anders als bei *N. rustica* und *N. tabacum* „Samsun-NN“ konnten bei *N. glutinosa* extreme Wuchsdepressionen als Reaktion auf die CMV-Infektion auftreten (Bildseite IV, Bilder i und j).

Bei *Nicotiana clevelandii* konnten als lokale Reaktion auf die Virusinokulation in erster Linie Chlorosen beobachtet werden (Bildseite V, Bild a). In seltenen Fällen zeigten die betroffenen Blätter später Welkeerscheinungen und starben ab (Bildseite V, Bild d). Etwas weniger differenziert und ausgeprägt als bei den anderen *Nicotiana*-Arten, traten auch bei *N. clevelandii* die üblichen systemischen Blattsymptome auf (Bildseite V, Bilder a, c und d). Die Blätter zeigten Chlorosen, blasige Auftreibungen, gewellte Blattränder sowie Schmalblättrigkeit. Daneben konnten als Reaktion der Pflanzen auf die Virusinfektion vor allem deutliche Wuchsdepressionen festgestellt werden (Bildseite V, Bild e).

3.2.1.2 Tomatenpflanzen

Als leichte Blattsymptome traten Chlorosen, eingerollte Blätter, dunkle Blattadern und eine rot-violette Verfärbung der Blattunterseite auf, wobei letztere weniger intensiv auch bei nicht inokulierten Pflanzen beobachtet wurden (Bildseite VI, Bilder a - d). Starke Blattdeformationen zeigten sich als Blattverschmälerungen bis hin zur Reduktion der Blattspreite auf die Mittelrippe (Fadenblättrigkeit) (Bildseite VI; Bild e), wobei die ganze Pflanze oder nur einzelne Seitentriebe betroffen sein konnten. Häufig zu beobachten waren Stängelnekrosen und das darauf folgende Abknicken der Triebspitze (Bildseite VI, Bild f). Als deutliche Wuchsdeformation zeigten einige Pflanzen Symptome der sogenannten Buschigkeit. Dabei kam es durch das Verkümmern oder Absterben der Triebspitze bei verstärktem Austrieb der Seitenknospen zu einem Verlust der typischen Form der Pflanzen (Bildseite VII, Bild b). Weniger stark betroffene Pflanzen zeigten nur einzelne verdrehte Blätter und Blattstängel.

Sehr häufig waren auch mehr oder weniger starke Wuchsdepressionen zu beobachten, die bei einigen Pflanzen ohne sonstige Symptome oder Veränderungen des Pflanzenhabitus auftraten (Bildseite VII, Bilder a, c). Während die Wuchsdepressionen teilweise nur im unmittelbaren Vergleich mit nicht inokulierten Kontrollpflanzen zu erkennen waren, stellten stark betroffene Pflanzen ihr Wachstum schon zu einem frühen Stadium vollständig ein. Im Extremfall traten starke Wachstumshemmungen und Nekrosen auf, welche schließlich zur Welke und zum Zusammenbruch der ganzen Pflanze führten (Bildseite VII, Bilder d, e). An den nekrotisierten oder verwelkten Pflanzenteilen war häufig ein Besatz von Sekundärparasiten zu erkennen.

3.2.1.3 Paprikapflanzen

Ein typisches Blattsymptom an Paprikapflanzen war die Rauhblättrigkeit. Dabei kommt es zu einer deutlichen Hervorhebung der Blattaderung, die Blattoberfläche ist leicht gewellt und verliert den für Paprikablätter typischen Glanz (Bildseite VIII, Bild a). Des weiteren waren Chlorosen (Bildseite VIII, Bilder a – e) und eine starke Adernaufhellung zu beobachten (Bildseite VIII, Bild b). Seltener zeigten die Blätter blasige Aufwölbungen (Bildseite VIII, Bilder b und e) und intensiv dunkelgrüne Blattareale, sog. „dark green islands“ (Bildseite VIII, Bild b), wie sie häufig an Tabakblättern durch CMV-Infektion ausgelöst wurden. Stärkere Symptome zeigten sich in verschiedenen Blattdeformationen, die sich aufgrund einer Verschmälerung der Blattspreite bildeten (Bildseite VIII, Bilder c – e). Je nach Intensität traten eingeschnürte oder nur ungewöhnlich schmale Blätter sowie im Extremfall die Reduktion der Blattspreite auf die Mittelrippe (Fadenblättrigkeit) auf, wobei, anders als bei Tomatenpflanzen, nie das ganze Blatt, sondern immer nur die Blattspitze betroffen war. Aufgrund einer Virus-induzierten Verkürzung der Internodien konnten auch starke Wuchsdepressionen bis hin zum Rosettenwachstum auftreten (Bildseite IX, Bilder a und b). Bei starker Stauchung hatten die Pflanzen ihr Wachstum weitestgehend eingestellt und kaum noch Ähnlichkeit mit gesunden Paprikapflanzen. Die betroffenen Pflanzen bildeten ungewöhnlich viele

Blüten, welche sich aber nur selten zu Früchten weiter entwickelten. Nekrosen und Welkeerscheinungen wie bei den Tomatenpflanzen traten an Paprikapflanzen nicht auf.

3.2.1.4 Gurkenpflanzen

Lokale Symptome traten in Form von Chlorosen auf den inokulierten Keimblättern auf. Schärfe, Größe und Form der Läsionen konnten je nach CMV-Isolat oder Gurkensorte recht unterschiedlich ausfallen. Die Größe variierte von dem Umfang einer Bleistiftspitze bis zu einem Durchmesser von fünf Millimetern. Die Lokalläsionen konnten rund, oval oder eckig sein und traten bei einigen Pflanzen als deutlich umrissene, chlorotische Flecken hervor während bei anderen Pflanzen eher unscharfe, durchscheinende Flecken auftraten. Als typische systemische Blattsymptome an Gurkenpflanzen wurden, neben dem klassischen Mosaik, kleine Chlorosen, Chlorosen entlang der Blattadern sowie Adernaufhellungen beobachtet werden. Einige Pflanzen waren zwergwüchsig, d.h. es waren nicht nur die Internodien verkürzt, sondern alle Pflanzenorgane waren in ihrem Wachstum reduziert. Blatt- und Wuchsdeformationen sowie Nekrosen oder Welke traten nicht auf. Insgesamt waren die durch die CMV-Infektion induzierten Schäden an den Gurkenpflanzen wesentlich geringer als bei Tomaten- und Paprikapflanzen.

3.2.1.5 Feldsalatpflanzen

Obwohl mittels ELISA in einigen Fällen eine erfolgreiche Infektion nachgewiesen werden konnte, waren an den Feldsalatpflanzen mit bloßem Auge keine durch die CMV-Isolate hervorgerufenen Veränderungen zu erkennen. In sehr seltenen Fällen konnte eine leichte Blattkräuselung beobachtet werden, welche aber wegen ihres unregelmäßigen Auftretens nicht sicher auf die Virusinokulation zurückzuführen war. In ihrem Wachstum schienen sich die Pflanzen ebenfalls nicht zu unterscheiden.

3.2.2 Fein- und ultrastrukturelle Veränderungen

Zur Untersuchung CMV-induzierter histologischer und zytologischer Veränderungen an *N. rustica* wurden von den in einer zeitliche Abfolge auftretenden charakteristischen Symptomen Proben genommen. Dazu gehörte neben den lokal auftretenden Chlorosen die in der Regel bei allen Isolaten als erstes systemisches Symptom auftretende Adernaufhellung der Blätter. Von den zu einem späteren Zeitpunkt erscheinenden isolatspezifischen systemischen Symptomen wurden blasige Auftreibungen, dunkelgrüne Blattareale (dark green islands), hellere bzw. chlorotische Blattbereiche sowie Stellen mit einer ölig glänzenden Oberfläche histologisch untersucht. Bei CMV-infizierten *N. tabacum* „Samsun-NN“ waren neben den lokal auftretenden Ringflecken vor allem Chlorosen in ihrer unterschiedlichen Ausprägung von Interesse. An Tomaten wurden Chlorosen, Fadenblättrigkeit sowie Stängelnekrosen und Welkeerscheinungen mikroskopisch untersucht.

3.2.2.1 *Nicotiana rustica* und *N. tabacum* „Samsun-NN“

In zytologischen Untersuchungen lokaler Chlorosen an *N. rustica* zeigten alle Chloroplasten starke Degenerationserscheinungen. Die Chloroplasten waren aufgebläht und sowohl Grana- als auch Stromathylakoide stark reduziert. Häufig traten cytoplasmatische Einschlüsse oder Invaginationen mit granulärem Inhalt sowie eine starke Vesikulierung des Stromas (peripheres Retikulum) auf. Auch zahlreiche größere Plastoglobuli konnten in der Regel beobachtet werden (Bildseite X, Bilder c und d). Dagegen waren Stärkekörner nicht größer oder zahlreicher als in Zellen nicht inokulierter Pflanzen (Bildseite X, Bild a). Leichtere Degenerationserscheinungen der Chloroplasten, wie Stärkeakkumulationen, konnten vereinzelt und in abgeschwächter Form auch in nicht infizierten Pflanzen festgestellt werden (Bildseite X, Bild b). In allen Proben waren die Zellkerne teilweise extrem stark gelappt (Bildseite X, Bild f), was in den Kontrollproben in keinem Fall beobachtet werden konnte (Bildseite X, Bild e). Obwohl in Cytoplasma und Vakuolen infizierter Zellen vermehrt granuläre Partikel festgestellt wurden, waren eindeutig als Viren zu identifizierende Partikel nur in den Gewebeproben der mit dem Isolat 4 inokulierten Pflanzen zu sehen. In diesem Fall zeigten sich aber in beinahe allen Zellen Viren bzw. Virusaggregate in Vakuole und Cytoplasma, wobei es in den Vakuolen häufig zu einer Zusammenlagerung der Viren zu größeren amorphen und kristallinen Aggregaten kam (Bildseite XI, Bilder a - d).

Bei dem Symptom der Adernaufhellung an *N. rustica* zeigten die Mesophyllzellen in der Umgebung der Leitbündel ähnliche Veränderungen wie in chlorotischen Blattbereichen. Die Chloroplasten waren teilweise kollabiert oder wiesen sehr große Stärkekörner auf, welche Thylakoidmembranen und Stroma völlig verdrängt hatten (Bildseite XI, Bild e). In anderen Fällen war in den Chloroplasten vermehrt peripheres Retikulum bzw. eine starke Vesikelbildung und Aufweitung der Thylakoidmembranen festzustellen (Bildseite XI, Bild f). Stark gelappte Zellkerne sowie dunkel kontrastierte Aggregate oder granuläres Material im Cytoplasma traten ebenfalls verstärkt auf. In einigen Zellen konnten erweiterte Plasmodesmen mit einer Verlängerung in das Zelllumen bzw. tubulären Plasmodesmenausstülpungen und Zellwandauflagerungen beobachtet werden. Dabei war in einzelnen Fällen der Transport von virus-ähnlichen Partikeln deutlich zu erkennen (Bildseite XII, Bild a). Sehr auffällig war auch das Auftreten von Vesikeln entlang der Tonoplasten vieler Zellen, welche in der Regel fibrilläres Material beinhalteten (Bildseite XII, Bild a). Mit Ausnahme vereinzelter Tracheiden mit einer Ansammlung von degeneriertem Chloroplastenmaterial (Bildseite XI, Bild g), konnten in Xylem und Phloem CMV-infizierter Pflanzen keine Veränderungen gegenüber nicht infiziertem Pflanzengewebe festgestellt werden.

Bei den für *N. rustica* charakteristischen dunkelgrünen, blasigen Auftreibungen und chlorotischen Verfärbungen systemisch infizierter Blätter konnten schon im Lichtmikroskop auffällige Unterschiede zu gesundem Blattgewebe beobachtet werden (Bildseite XII, Bilder b - d). Sowohl in den dunkelgrünen als auch den chlorotischen Blattbereichen waren alle Zellen kleiner als in nicht infiziertem Gewebe (Bildseite XII, Bild c und d). Das Gewebe wies kaum Interzellularräume auf. Palisaden- und teilweise auch

Schwammparenchymzellen enthielten ungewöhnlich viel Cytoplasma. In den Epidermiszellen konnten ebenfalls des öfteren vermehrt Plasma festgestellt werden. Palisadenparenchymzellen zeigten zudem nicht die typisch langgestreckte Form, sondern waren abgerundet und lagen in den dunkelgrünen Gewebeproben in mehreren Reihen übereinander (Bildseite XII, Bild c). Während sich das Gewebe in den dunkelgrünen, aufgewölbten Bereichen in der Dicke der Blattspreite nicht von dem Gewebe gesunder Blätter unterschied, konnte bei den helleren oder chlorotischen Blattproben eine eindeutige Reduktion der Blattdicke festgestellt werden (Bildseite XII, Bild d). Diese histologischen Veränderungen vermittelten insgesamt den Eindruck eines unvollständig ausdifferenzierten juvenilen Gewebes.

In den dunkelgrünen Blattbereichen konnten im Elektronenmikroskop keine zusätzlichen Veränderungen gegenüber nicht infizierten Pflanzen beobachtet werden. Die zahlreich vorhandenen Chloroplasten zeigten zwar oft primär Stroma- und weniger Granathylakoide, waren aber in einem zytologisch funktionalem Zustand und zeigten die typische abgeflachte ellipsoide Form. Anzahl und Größe der Stärkekörner und Plastoglobuli unterschieden sich nicht von denen gesunder Pflanzen. Die Thylakoidmembranen waren gleichmäßig mit einzelnen Granastapeln über das Stroma verteilt (Bildseite XII, Bild e). Bei den helleren oder chlorotischen Blattbereichen konnten teilweise Chloroplasten mit ersten Degenerationserscheinungen beobachtet werden. Sie waren aufgebläht und enthielten vermehrt größere Stärkekörner und Plastoglobuli. Im Cytoplasma einiger Zellen konnten zahlreiche dunkel kontrastierte Aggregate sowie eine zunehmende Vesikulierung beobachtet werden (Bildseite XII, Bild f). Des weiteren enthielt das Cytoplasma viel raues ER sowie freie Ribosomen bzw. granuläres Material. In fast allen Zellen traten wiederum die charakteristischen Tonoplast-assoziierten Vesikel auf. Dabei schien die Ausstülpung und anschließende Abschnürung von Teilen des Tonoplasten der Verlagerung von Material aus dem Cytoplasma in die Vakuole zu dienen (Bildseite XIII, Bild a).

Obwohl die ölig glänzenden Blattareale an *N. rustica* immer auch eine chlorotische Farbveränderung aufwiesen, waren die üblichen degenerativen Veränderungen der Chloroplasten nicht festzustellen. Neben einigen kollabierten oder degenerierten Zellkernen traten wiederum in vielen Zellen die charakteristischen Vesikel entlang des Tonoplasten sowie dunkel kontrastierte Aggregate im Cytoplasma auf (Bildseite XIV, Bild a). Auffällig war ein vermehrtes Vorkommen von Epidermiszellen mit deformierten bzw. gestauchten, antiklinalen Zellwänden. In diesen Bereichen konnten verstärkt Zellwandauflagerungen mit und ohne Beteiligung tubulärer Plasmodesmenausstülpungen beobachtet werden. Die äußere Zellwand der oberen Epidermis war zudem dünner als bei nichtinfizierten Pflanzen (Bildseite XIII, Bilder b und c).

Die lokalen Ringflecken an *N. tabacum* „Samsun NN“ sowie die als primäres systemisches Symptom auftretenden interkostalen Chlorosen zeigten alle dieselben zytologischen Veränderungen von Chloroplasten, Zellkernen und Cytoplasma, wie sie oben für die chlorotischen Blattbereiche von *N. rustica* beschrieben wurden. Neben Tonoplast-assoziierten Vesikeln (Bildseite XIV, Bild d), waren auch in vielen Zellen wieder

erweiterte Plasmodesmen in Verbindung mit tubulären Verlängerungen ins Cytoplasma zu sehen (Bildseite XIV, Bild c). Die zahlreich vorkommenden Mitochondrien waren oft stark verformt bzw. invaginiert, so dass der Eindruck von Cytoplasma-Einschlüssen entstand (Bildseite XIV, Bilder b und d). Auch die schon beschriebene mangelnde Entwicklung und Differenzierung des Gewebes einschließlich der Reduktion der Blattdicke konnte beobachtet werden.

3.2.2.2 Tomatenpflanzen

Anders als bei *N. rustica* und *N. tabacum* „Samsun-NN“ konnten bei systemischen Chlorosen CMV-infizierter Tomatenpflanzen im Lichtmikroskop keine Veränderungen festgestellt werden. Die Zellen unterschieden sich in Größe und Form nicht von denen nicht infizierter Pflanzen. Im Elektronenmikroskop zeigten sich die gleichen degenerativen Veränderungen der Chloroplasten wie sie auch in chlorotischem Gewebe der beiden *Nicotiana*-Arten beobachtet werden konnten (Bildseite XV, Bilder c und d). Oft waren die Chloroplasten schon vollständig zerfallen und deren Überreste lagen frei im Cytoplasma (Bildseite XV, Bild e). In beinahe allen Zellen konnten zahlreiche Partikel in Cytoplasma und Vakuole beobachtet werden, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um CMV-Partikel handelte, welche allerdings auch in der Vakuole nie als Kristalle, sondern im lockeren Verband vorlagen (Bildseite XV, Bilder d, f, g). Dabei war ein gehäuftes Auftreten der virusähnlichen Partikel im Cytoplasma auffällig oft in der Nähe zerstörter Chloroplasten oder zwischen den membranösen Überresten bereits zerfallener Chloroplasten festzustellen (Bildseite XV, Bilder d und f). Die Zellkerne und Mitochondrien unterschieden sich nicht von denen nicht infizierter Pflanzenzellen. Auch die für *N. rustica* und *N. tabacum* „Samsun-NN“ so charakteristischen Tonoplast-assoziierten Vesikel waren in keiner der untersuchten Proben zu finden.

Gewebeproben von systemisch infizierten Tomatenblättern, die stark in ihrer Blattspreite reduziert waren (Fadenblättrigkeit), zeigten alle Merkmale eines undifferenzierten, juvenilen Gewebes. Epidermis- und Mesophyllzellen waren wesentlich kleiner als diejenigen nicht infizierter Pflanzen und wiesen ungewöhnlich viel Cytoplasma auf. Insbesondere die Palisadenparenchymzellen hatten keine oder nur sehr kleine Vakuolen. Dabei waren die Zellen so dicht gepackt, dass kaum Interzellularräume auftraten. Obwohl die betroffenen Blätter in der Regel ein mehrreihiges Palisadenparenchym aufwiesen, war auch die Dicke der Blätter geringer als bei denen gesunder Pflanzen (Bildseite XVI, Bilder a und b). Aufgrund sehr dünner Zellwände konnten Zellabgrenzungen teilweise nur schwer erkannt werden (Bildseite XVI, Bilder d und f). Die Chloroplasten wiesen fast ausschließlich Stroma- und kaum Granathylakoide auf (Bildseite XVI, Bilder d und e). Im Vergleich zu nicht infiziertem Gewebe war das Cytoplasma ungewöhnlich dunkel kontrastiert bzw. angereichert mit endoplasmatischem Retikulum, freien Ribosomen oder anderen Bestandteilen dieser Größenordnung und auch in den Vakuolen zeigten sich in fast jeder Zelle dunkel kontrastierte Strukturen (Bildseite XVI, Bilder d – f). Während bei den meisten Proben nur punktuell im Elektronenmikroskop nekrotisierte bzw. kollabierte Zellen beobachtet werden konnten (Bildseite XVI,

Bild f), zeigten sich bei einer Probe schon im Lichtmikroskop Stellen im Blattgewebe an denen das Mesophyll schon vollständig abgebaut war (Bildseite XVI, Bild c). In den Stängeln und Mittelrippen der betroffenen Fiederblättchen waren weder im Licht- noch im Elektronenmikroskop eindeutige Veränderungen gegenüber nicht infizierten Pflanzen zu erkennen.

Die strukturellen Veränderungen bei Stängelnekrosen und Welkeerscheinungen infizierter Tomatenpflanzen waren schon im Lichtmikroskop ausreichend deutlich zu erkennen. Im Vergleich zu den Stielen und Stängeln nicht infizierter Pflanzen (Bildseite XVII, Bilder a und b) konnte eine großflächige Nekrotisierung des infizierten Gewebes festgestellt werden. Dabei kam es zunächst zum Zusammenbruch aller Zellen des Phloems sowie der kambialen Zellen. Mark, Epidermis und Teile des Rindenparenchyms erschienen häufig noch intakt. Dort, wo auch das Rindenparenchym schon vollständig kollabiert war, kam es zur Bildung tiefer Furchen (Bildseite XVII, Bild c). Bei fortgeschrittener Nekrotisierung waren alle Gewebe außer den ohnehin abgestorbenen und verholzten Tracheiden des Xylems sowie den meisten Epidermiszellen kollabiert (Bildseite XVII, Bild d). Im Elektronenmikroskop konnte ebenfalls nur zerstörtes Gewebe betrachtet werden.

3.3 Einfluss der Isolate auf die Wirtspflanzen

Verschiedene Pflanzen wurden mit den CMV-Isolaten inokuliert, um festzustellen, inwieweit sich die Isolate in ihrer Wirkung auf die jeweiligen Versuchspflanzen unterscheiden. Durch Mischinokulationen mit je zwei Isolaten sollten eventuelle Wechselwirkungen festgestellt werden. Dabei sollten mögliche synergistische oder antagonistische Effekte nur genauer überprüft werden, wenn die Inokulation zweier Isolate eine signifikant schwächere oder stärkere Pflanzenreaktion induzierte als eines der beiden verwendeten Isolate in den Einzelinokulationen. Durch die Erfassung verschiedenster im folgenden aufgeführten Parameter und das Prüfen einiger Faktoren, welche den Krankheitsverlauf beeinflussen können, sollte ein umfassendes Bild über die Wirtspflanzenbeeinträchtigung durch die CMV-Isolate entstehen.

3.3.1 *Nicotiana*-Arten

3.3.1.1 Symptomausprägung

Die Versuche mit Pflanzen der Gattung *Nicotiana* sollten in erster Linie zeigen, ob sich die Virus-Isolate in der Art der auftretenden Symptome wesentlich unterscheiden. Die Untersuchungen ergaben eine große Vielfalt an Symptomen, wobei je nach CMV-Isolat deutliche Unterschiede insbesondere bei den systemischen Symptomen auftraten. Die Einschätzung der Symptomstärke, als Grad der Beeinträchtigung der Versuchspflanzen durch die Virusinokulation, wurde dadurch etwas erschwert.

Die lokalen Symptome konnten schon 3 bis 4 Tage nach Inokulation oder wesentlich später auftreten und außerdem nach einiger Zeit wieder verschwinden. Dabei schienen weder der Zeitpunkt noch die Dauer des Auftretens der Lokalläsionen vom dem verwendeten CMV-Isolat als vielmehr von anderen Faktoren, wie dem Alter der Wirtspflanzen und jahreszeitlichen Einflüssen abhängig zu sein und fielen von Versuch zu Versuch, innerhalb derselben Wirt-Isolat-Kombination, sehr unterschiedlich aus. Daher wurde das Auftreten lokaler Symptome 5, 6, 8, 10, 11, 13 und 14 Tage nach Inokulation geprüft und die Ergebnisse aus mehreren Versuchen zusammengefasst (Tab. 4). An *N. rustica* traten runde Chlorosen mit einem Durchmesser von 3 bis 7 Millimeter auf (Bildseite I, Bild b). Nur Isolat B verursachte eckige, ungleichmäßig umrissene Chlorosen (Bildseite I, Bild c) und bei den Isolaten A und 11 konnten in keinem der Versuche Lokalläsionen beobachtet werden. Alle Isolate der Untergruppe II verursachten auf *N. tabacum* „Samsun-NN“ deutliche Ringflecken (Bildseite III, Bilder a und b). Die mit Isolaten der Untergruppe I inokulierten Pflanzen zeigten oft keine Lokalläsionen. Wenn Symptome auftraten, handelte es sich bei den Isolaten 1 und 4 um undeutliche Ringflecken, bei den Isolaten A und B um vereinzelte eckige Chlorosen (Bildseite III, Bild c). Bei keinem der Versuche konnte beobachtet werden, dass die Isolate der Untergruppe I lokale Läsionen an *N. glutinosa* hervorriefen. Die Isolate 2, 5 und 10 induzierten runde Chlorosen, die Isolate 11 und C wiederum Ringflecken. *N. clevelandii* zeigte als lokale Reaktion auf die Virusinokulation häufig eine Vielzahl kleiner Chlorosen (Bildseite V, Bild a). Nur nach Inokulation mit den Isolaten A, B und C traten in keinem Fall lokale Symptome auf.

Tab. 4: Ausprägung lokaler Symptome an verschiedenen *Nicotiana*-Arten nach Inokulation mit den CMV-Isolaten der Untergruppe I: 1, 4, A, B und II: 2, 5, 10, 11, C (Boniturzeitraum 5 bis 14 Tage nach Inokulation).

Isolat	<i>N. rustica</i>	<i>N. t.</i> „Samsun-NN“	<i>N. glutinosa</i>	<i>N. clevelandii</i>
1	Chlorosen	Ringflecken	-	Chlorosen
4	Chlorosen	Ringflecken	-	Chlorosen
A	-	Chlorosen	-	-
B	Chlorosen	Chlorosen	-	-
2	Chlorosen	Ringflecken	Chlorosen	Chlorosen
5	Chlorosen	Ringflecken	Chlorosen	Chlorosen
10	Chlorosen	Ringflecken	Chlorosen	Chlorosen
11	-	Ringflecken	Ringflecken	Chlorosen
C	Chlorosen	Ringflecken	Ringflecken	-

-: keine Symptome

Auch bei den systemischen Reaktionen der Wirtspflanzen konnte die Geschwindigkeit der Symptomentwicklung unabhängig von dem jeweiligen CMV-Isolat bei den Versuchen sehr verschieden ausfallen. Außerdem war eine zeitliche Abfolge von unterschiedlichen systemischen Symptomen zu beobachten. Um den Krankheitsverlauf verfolgen zu können, wurden die Pflanzen daher 8, 11, 14 und 19 Tage nach Inokulation bonitiert.

Bei den Versuchen mit *N. rustica* wurden deutliche Untergruppen-spezifische Unterschiede in der Art der auftretenden Symptome festgestellt. Unabhängig von Isolat und Untergruppe trat als erste systemische Reaktion eine Aufhellung der Adern auf (Bildseite I, Bild d). Darauf folgend induzierten die Isolate der Untergruppe I dunkelgrüne blasige Auftreibungen (Bildseite II, Bild c und d), die insbesondere bei den Isolaten 1 und 4 in einem auffälligen Kontrast zu chlorotischen Blattbereichen standen (Bildseite I, Bilder g und h). Zusätzlich verursachten die Isolate 4 und B teilweise starke Blatt- und Wuchsdeformationen (Bildseite VI, Bilder a und c). Bei allen Isolaten der Untergruppe II folgten auf die Adernaufhellung interkostale Chlorosen mit einem fettigem Glanz (Bildseite V, Bild e). Nur bei dem Isolat 10 konnten in einigen Fällen auch leichte Unebenheiten der Blattoberfläche beobachtet werden (Bildseite V, Bild f).

Bei *N. tabacum* „Samsun-NN“ konnten keine so deutlichen Unterschiede zwischen den Isolaten bzw. den Untergruppen festgestellt werden. Auf die ebenfalls als erstes systemisches Symptom erscheinende Adernaufhellung (Bildseite III, Bild d), folgten mehr oder weniger stark ausgeprägte interkostale Chlorosen (Bildseite III, Bilder e und f). Blasen und Blattdeformationen traten in abgeschwächter Form nur nach Inokulation der Isolate A und B auf (Bildseite III, Bilder g und h).

Die Symptome an *N. glutinosa* waren denen an *N. rustica* sehr ähnlich (Bildseite IV), aber es wurden keine so offensichtliche Unterschiede zwischen den Isolaten bzw. Untergruppen festgestellt. Blasige Auftreibungen und Blattdeformationen traten auch nach Inokulation mit den Isolaten der Untergruppe II auf (Bildseite IV, Bilder e und f). Starke Wuchsdeformationen schienen allerdings nur durch das Isolat 4 verursacht zu werden (Bildseite IV, Bild g). Des weiteren traten insbesondere nach Inokulation mit den Isolaten der Untergruppe II, mit Ausnahme von Isolat C, starke Wuchsdepressionen auf (Bildseite IV, Bilder i und j).

Wie bei *N. glutinosa* waren bei den Versuchen mit *N. clevelandii* keine deutlichen Unterschiede zwischen den Isolaten in der Art der Symptome festzustellen. Blasige Auftreibungen und Blattdeformationen schienen zwar bei den Isolaten der Untergruppe I häufig stärker ausgeprägt (Bildseite V, Bilder a und c), traten aber auch nach Inokulation mit den Isolaten der Untergruppe II auf. Starke Wuchsdepressionen induzierten wiederum die Isolaten 2, 5, 10, und 11 der Untergruppe II sowie das Isolat A der Untergruppe I (Bildseite V, Bilder d und e).

Trotz der oben genannten Probleme aufgrund der sich stark unterscheidenden Symptome wurde versucht, anhand eines vergleichsweise unspezifischen Boniturschemas (Abb. 6), die Stärke der Beeinträchtigung der Pflanzenentwicklung durch die Virusin-

okulation festzustellen. Die Versuche wurden mit *N. rustica*, *N. tabacum* „Samsun-NN“ und *N. glutinosa* durchgeführt und 16 Tage nach Inokulation ausgewertet. Parallel zu Blatt- und Wuchsabnormalitäten wurde die Beeinträchtigung des Pflanzenwachstums bonitiert.



Abb. 6: Klassifizierung der Symptome an Pflanzen der Art *Nicotiana* (Zunahme der Symptome von links nach rechts; Oben: Boniturwerte; Mitte: Einfluss auf das Pflanzenwachstum; Unten: Einfluss auf den Pflanzenhabitus).

Auch in der Schwere der induzierten Symptome ließen sich Unterschiede zwischen den Isolaten feststellen (Abb. 7). In allen Versuchen verursachten die Isolate der Untergruppe I auf *N. rustica* mit Boniturwerten von 6 - 8 signifikant stärkere Symptome als die Isolate der Untergruppe II. Innerhalb der Untergruppe II zeigten sich bei dem Isolat 2 mit Boniturwerten von 4 - 5 stets die deutlichsten Symptome. Bei Verwendung von *N. tabacum* „Samsun-NN“ als Wirtspflanzen ergab sich insgesamt ein ähnliches Bild, mit Ausnahme von Isolat B, welches deutlich schwächere Symptome induzierte. Nach Inokulation von *N. glutinosa* konnten keine so eindeutigen Unterschiede festgestellt werden, doch ergaben sich bei den Isolaten A und B (Untergruppe I) und 5, 10 und 11 (Untergruppe II) stets die höchsten Boniturwerte. Dabei verursachten die Isolate 5, 10 und 11 vor allem extreme Wuchsdepressionen, während für die Isolate A und B deutliche Blattsymptome und -deformationen charakteristisch waren. An allen *Nicotiana*-Arten zeigte sich nach Inokulation mit dem Isolat C ein wesentlich langsamerer Krankheitsverlauf als bei den anderen CMV-Isolaten.

3.3.1.2 Wachstum

Um den Einfluss der CMV-Infektion auf das Wachstum der Pflanzen genauer zu untersuchen, wurden 16 Tage nach Inokulation die Pflanzen direkt über der Erde abgeschnitten und zur Bestimmung der Trockenmasse weiterverarbeitet (Abb. 8). Die Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen der Symptomauswertung. Weder bei *N. rustica* noch bei *N. tabacum* „Samsun-NN“ konnte ein signifikanter Einfluss der Virusinfektion auf das Pflanzenwachstum festgestellt werden. Bei den Versuchen mit *N. glutinosa* zeigten nur die mit den Isolaten A, 5, 10 und 11 inokulierten Pflanzen eine signifikante Reduktion des Wachstums im Vergleich zu den nicht inokulierten Kontrollpflanzen.

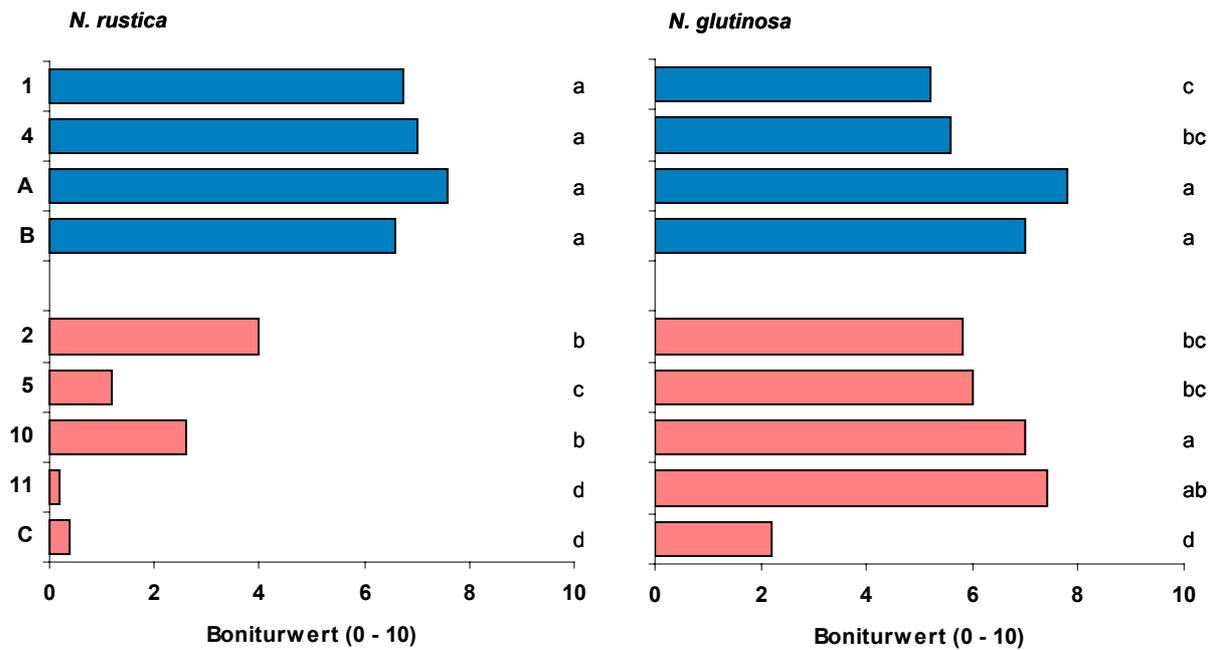


Abb. 7: Einfluss der CMV-Isolate auf die Symptomausprägung an *N. rustica* und *N. glutinosa*, 16 d p.i., n = 5 (Inokulation mit 0,1 mg Virus/ml; Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

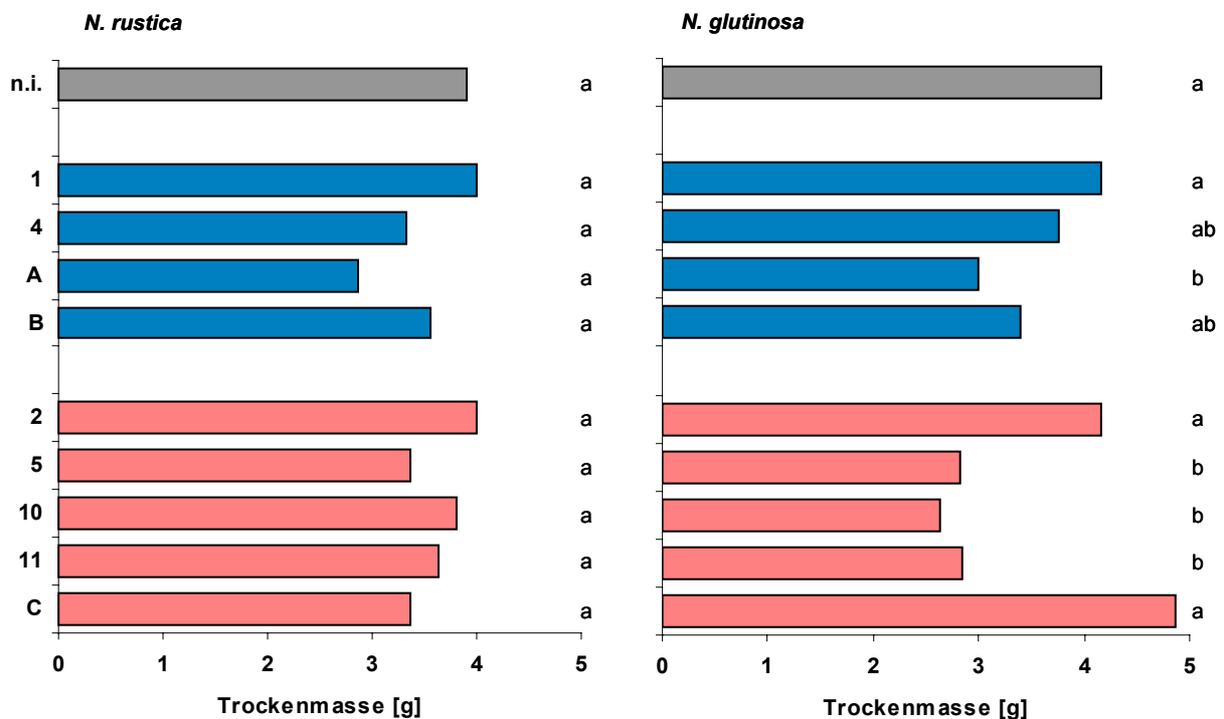


Abb. 8: Einfluss der CMV-Isolate auf die Trockenmasse von *N. rustica* und *N. glutinosa*, 16 d p.i., n = 3 (Inokulation mit 0,1 mg Virus/ml; Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); nicht inokuliert (n.i.); verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (Tukey-Test, $p \leq 0,05$)).

3.3.2 Tomatenpflanzen

3.3.2.1 Symptomausprägung

Die Stärke der Symptome an Tomatenpflanzen wurden 21 und 38 Tage nach Inokulation ausgewertet. Es konnten Blatt- und Wuchsdeformationen sowie Wuchsdepressionen auftreten (Bildseiten VI und VII). Aus diesen Beobachtungen wurde ein Schema entwickelt, um Unterschiede in der Schwere der auftretenden Symptome zu untersuchen (Abb. 9). Bei Auftreten von Stängelnekrosen, die schließlich zum Absterben der Pflanzen führten, wurde der Boniturwert 10 vergeben. Leichtere Symptome (Boniturwerte 1 bis 4) waren teilweise nur schwer zu erkennen bzw. von Veränderungen anderer Natur zu differenzieren und wuchsen sich im Laufe der Versuche oft wieder aus.

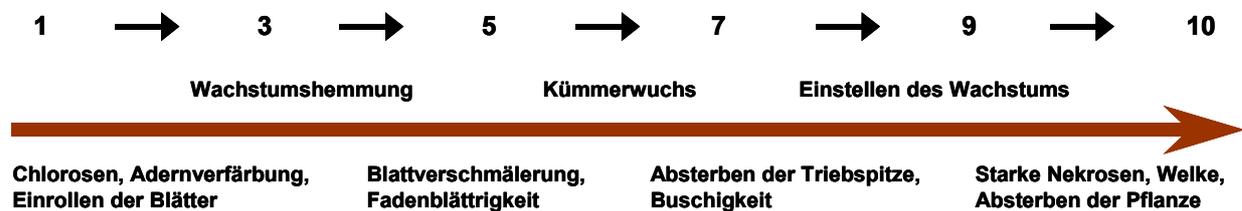


Abb. 9: Klassifizierung der Symptome an Tomatenpflanzen nach CMV-Infektion (Zunahme der Symptome von links nach rechts; Oben: Boniturwerte; Mitte: Einfluß auf das Pflanzenwachstum; Unten: Einfluß auf den Pflanzenhabitus).

Sowohl in der Art der Symptome als auch in der Stärke ihrer Ausprägung konnten eindeutige Unterschiede zwischen den CMV-Isolaten beobachtet werden. Bei einer Inokulumsdichte von 0,1 mg Virus/ml zeigten die mit den Isolaten 10, 11, C (Untergruppe II) und A, B (Untergruppe I) inokulierten Pflanzen 38 Tage nach Inokulation signifikant die stärksten Symptome (Abb. 10). Ähnlich verhielt es sich mit allen Mischinfektionen, bei denen ein oder zwei dieser Isolate beteiligt waren. Bei allen betroffenen Pflanzen konnten deutliche Wuchshemmungen beobachtet werden (Bildseite VII, Bild a). Dabei behielten die mit Isolat A infizierten Pflanzen teilweise ihre natürliche Form bei (Bildseite VII, Bild c). Meistens traten aber schwere Wuchsdeformationen auf (Bildseite VII, Bilder b, d, e). Alle anderen Isolate induzierten signifikant mildere Symptome. Bei Isolat 4 und Mischinokulationen mit diesem Isolat wurden starke Blattdeformationen beobachtet (Bildseite VI, Bild e), aber keine auffällige Hemmung des Wachstums. Die Isolate 2 und 5 induzierten nur Blattverfärbungen (Bildseite VI, Bilder a und d). Einen sehr geringen Einfluss auf die Wirtspflanzen zeigte das Isolat 1 und die Mischinokulation mit den Isolaten 2 und 5, wobei letztere sich in Versuchswiederholungen nicht signifikant von den Inokulationen mit den Isolaten 2 oder 5 unterschieden.

Bei einer Inokulumsdichte von 0,01 mg/ml kam es insgesamt zu einer leichten Abschwächung der Symptome. Die Isolate 10, 11 und C riefen eine nahezu unvermindert starke Reaktion bei den Wirtspflanzen hervor. Ähnlich verhielten sich

auch die meisten Mischinokulationen mit den Isolaten 11 und 10. Bei allen anderen Isolaten und Kombinationen konnte kein signifikanter Unterschied mehr untereinander festgestellt werden. Diese Versuche verdeutlichten die übermäßig starke Reaktion der Pflanzen auf die Isolate 10 und 11 im Vergleich zu den anderen Isolaten.

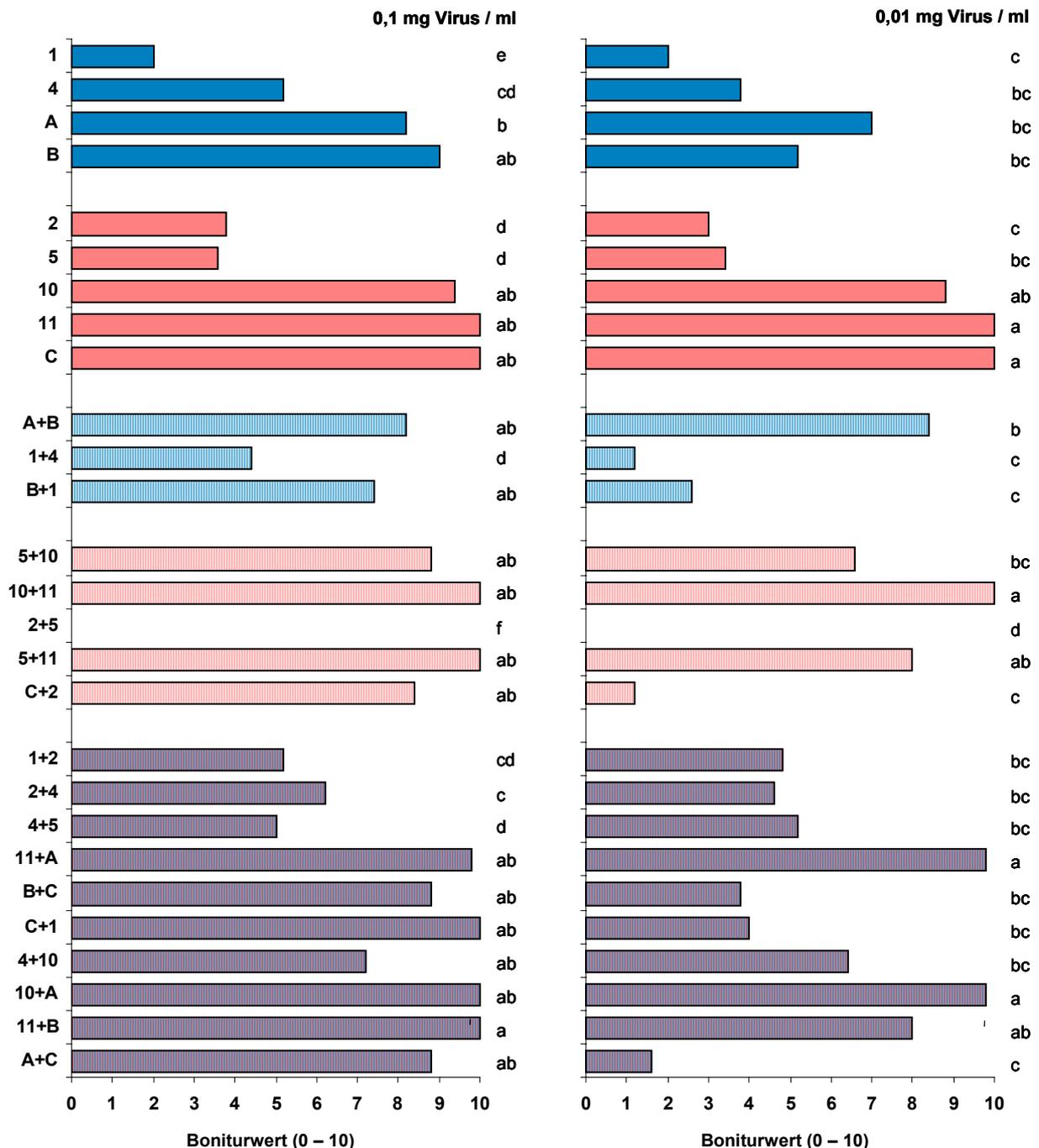


Abb. 10: Einfluss der CMV-Isolate auf die Symptomausprägung an Tomatenpflanzen, 38 d p.i., n = 5 (Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); Mischinfektionen mit je zwei Isolaten der Untergruppe: I (blau gestreift), II (rot gestreift), I und II (blau/rot gestreift); Inokulation mit 0,1 und 0,01 mg Virus/ml; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

Eine frühere Auswertung 21 Tage nach Inokulation (Abb. 11) eignete sich weniger, um Unterschiede zwischen den Isolaten festzustellen, ermöglichte aber die Untersuchung des Krankheitsverlaufes.

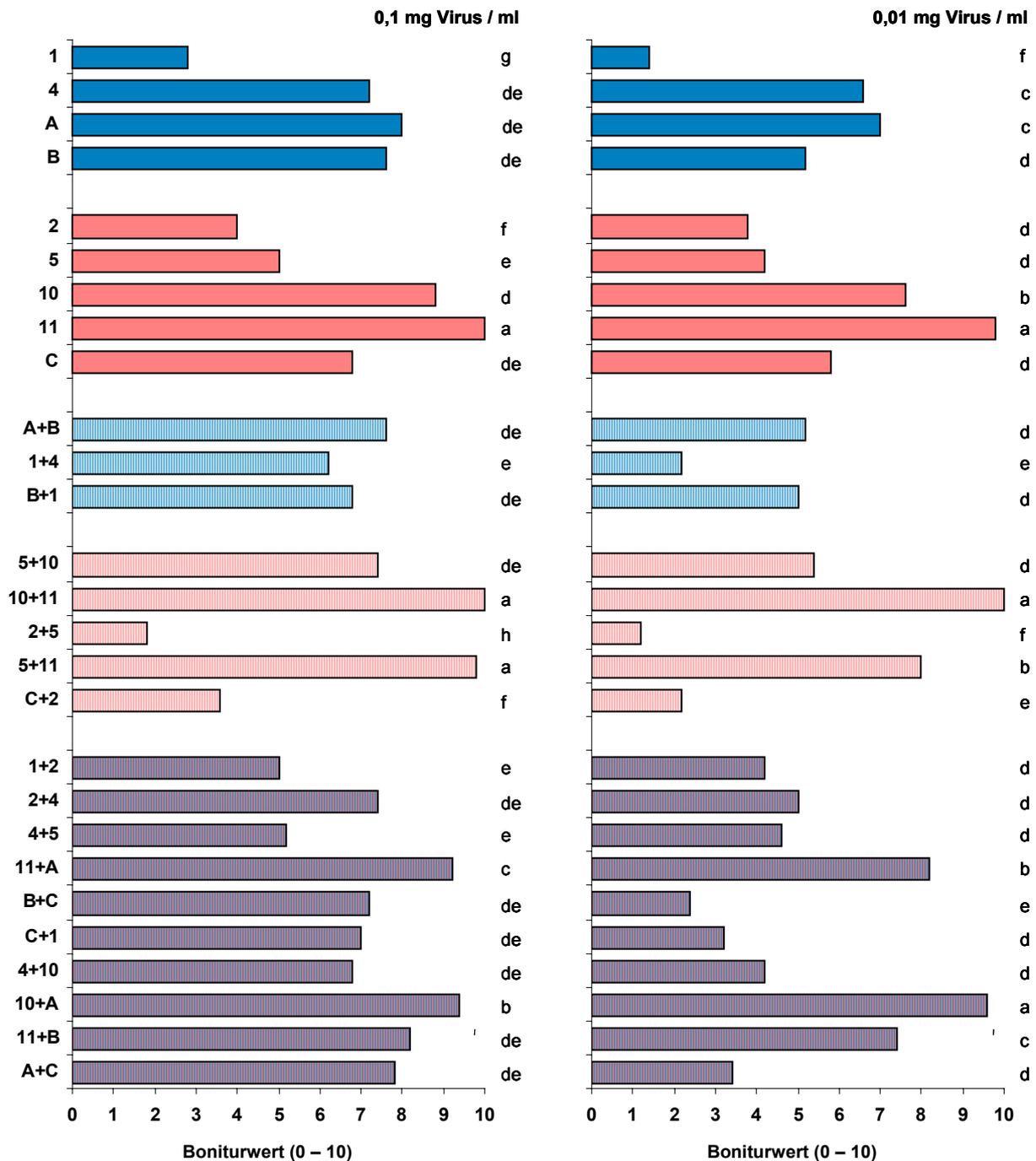


Abb. 11: Einfluss der CMV-Isolate auf die Symptomausprägung an Tomatenpflanzen, 21 d p.i., n = 5 (Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); Mischinfektionen mit je zwei Isolaten der Untergruppe: I (blau gestreift), II (rot gestreift), I und II (blau/rot gestreift); Inokulation mit 0,1 und 0,01 mg Virus/ml; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

Während bei manchen, später stark betroffenen Pflanzen das volle Ausmaß der Schädigung noch nicht sichtbar war, wuchsen sich bei anderen Pflanzen Symptome bis zu einem späteren Boniturtermin wieder aus. So wurde zu diesem Termin noch kein signifikanter Unterschied der Isolate A, B und C zu den Isolaten 4 und 5 festgestellt. Die mit Isolat 10 und 11 infizierten Pflanzen zeigten allerdings schon 21 Tage nach Inokulation die schwersten Symptome. Im Gegensatz zu allen anderen Isolaten verursachten diese Isolate auch schon 10 Tage nach der Inokulation mit 0,1 und 0,01 mg Virus/ml deutliche Reaktionen bei den Wirtspflanzen.

Bei den Mischinokulationen konnte weder eine signifikante Abschwächung noch eine Verstärkung der Pflanzenreaktion im Vergleich zu den jeweils verwendeten Isolaten festgestellt werden, wobei die Kombinationen meistens in ihrer Wirkung eher dem Isolat glichen, welches die stärkeren Symptome verursachte. Eine Ausnahme bildet bei den hier dargestellten Versuchen die Mischinokulation mit den Isolaten 2 und 5. Dieses Ergebnis konnte aber nicht reproduziert werden, und ein möglicher antagonistischer Effekt konnte auch in Versuchen mit anderen Kombinationen dieser Isolate nicht bestätigt werden.

3.3.2.2 Wachstum

Um den Einfluss der Virusinfektion auf das Wachstum von Tomatenpflanzen zu untersuchen, wurde 35 - 38 Tage nach Inokulation die Länge der Pflanzen gemessen (Abb. 12). Bei beiden Inokulumdichten zeigten die Isolate 1, 4, 2, 5 und alle Mischinokulationen, in denen nur diese Isolate enthalten waren, keinen signifikanten Einfluss auf das Längenwachstum der Wirtspflanzen. Bei allen anderen Varianten war eine signifikante Reduktion der Pflanzenlänge zu beobachten. Dabei waren die mit den Isolaten 10, 11 und C infizierten Pflanzen besonders schwer betroffen, aber auch die Isolate A und B verursachten starke Wuchshemmungen. Bei den Mischinfektionen wurden wiederum keine synergistischen oder antagonistischen Wechselwirkungen festgestellt.

Die Unterschiede zwischen den Varianten nahmen mit der Zeit noch zu, da sehr stark betroffene Versuchspflanzen ihr Wachstum schon vorher vollständig eingestellt hatten, während andere auch zum Auswertungszeitpunkt noch weiter wuchsen. Bei dem Isolat 11 und der Kombination 11 und 10 kam es schon sehr früh zum Wachstumsstillstand und die Pflanzen zeigten 38 Tage nach Inokulation mit 0,1 und 0,01 mg Virus/ml schon ausgedehnte Nekrosen und starke Welkeerscheinungen.

3.3.2.3 Chlorophyllgehalt

Der Chlorophyllgehalt wurde 27 und 33 Tage nach Inokulation gemessen. Ein Einfluss der Virusinfektion auf den Chlorophyllgehalt der Pflanzen konnte nicht festgestellt werden.

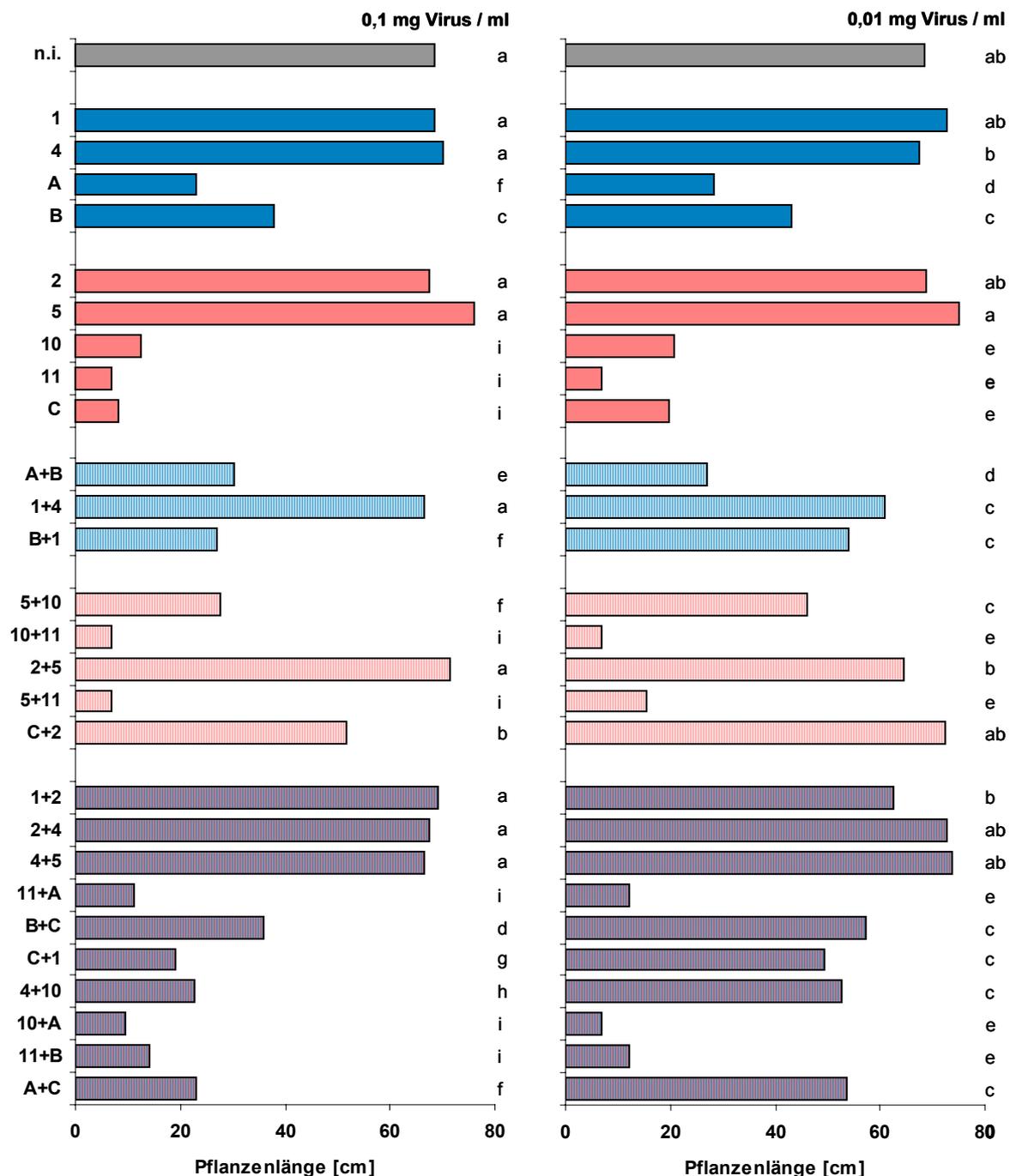


Abb. 12: Einfluss der CMV-Isolate auf das Längenwachstum von Tomatenpflanzen, 38 d p.i., n = 5 (Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); Inokulationen mit je zwei Isolaten der Untergruppe: I (blau gestreift), II (rot gestreift), I und II (blau/rot gestreift); Inokulation mit 0,1 und 0,01 mg Virus/ml; nicht inokuliert (n.i.); verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

3.3.2.4 Einfluss der Inokulumdichte auf den Krankheitsverlauf

Zur Untersuchung des Einflusses der Inokulumdichte auf den Krankheitsverlauf wurden Tomatenpflanzen mit 0,1, 0,001, 0,0001 und 0,00001 mg Virus/ml inokuliert. Die Isolate 1, 4, 2 und 5 zeigten auch bei einer Inokulumdichte von 0,1 mg Virus/ml keinen

signifikanten Einfluss auf das Längenwachstum der Versuchspflanzen, während die mit den Isolaten A, B, 10, 11 und C inokulierten Pflanzen alle stark beeinträchtigt waren. Bei diesen Isolaten wurde auch bei einer Inokulumsdichte von 0,01 mg Virus/ml keine wesentliche Abschwächung der Reaktion beobachtet (siehe Kap. 3.3.2.2). Bei einer Inokulumsdichte von 0,001 mg Virus/ml induzierten nur noch die Isolate 10 und 11 eine signifikante Reduktion der Wuchslänge (Abb. 13). Die genaue Betrachtung der Boniturnwerte zeigte, dass bei den Inokulumsdichten 0,01 und 0,001 mg Virus/ml innerhalb einer Variante einzelne Pflanzen unvermindert stark betroffen waren, während andere überhaupt keine Symptome ausbildeten. Somit schien schon ab einer Inokulumsdichte von 0,01 mg Virus/ml der Infektionserfolg merklich abzunehmen. Die Bonitur der Symptomstärke ergab ein ähnliches Bild. Bei einer Inokulumsdichte von 0,0001 mg Virus/ml wurde bei keinem Isolat mehr ein Einfluss auf die Tomatenpflanzen festgestellt.

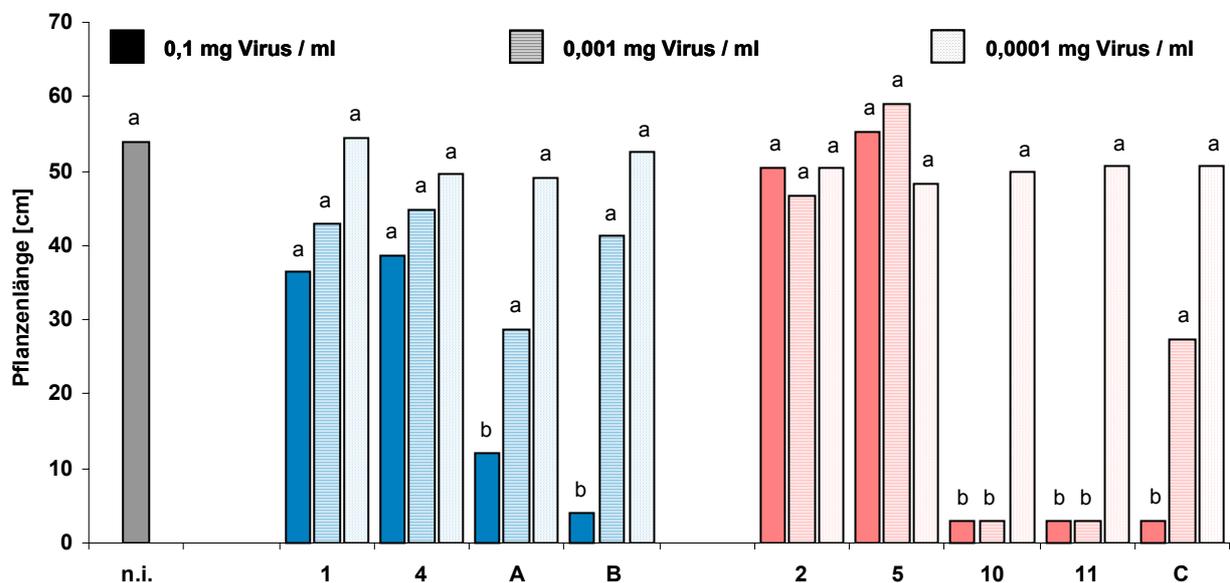


Abb. 13: Einfluss der Inokulumsdichte der CMV-Isolate auf den Krankheitsverlauf an Tomatenpflanzen, 35 d p.i., n = 5 (Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); Inokulation mit 0,1, 0,001 und 0,0001 mg Virus/ml; nicht inokuliert (n.i.); verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

3.3.2.5 Einfluss der Jahreszeit auf den Krankheitsverlauf

Trotz Durchführung der Versuche in einem Gewächshaus mit Klima-Steuerung, wurde ein Effekt der Jahreszeit zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung auf den Krankheitsverlauf festgestellt (Abb. 14). Bedingt durch eine geringere Lichtintensität im Winter, die auch durch die Zusatzbeleuchtung nicht vollständig ausgeglichen werden konnte, wurde sowohl eine Verzögerung der Pflanzenentwicklung als des Krankheitsverlaufs nach CMV-Inokulation festgestellt. Keine signifikanten Unterschiede traten bei den Isolaten A, 10 und 11 auf. Die mit den Isolaten 10 und 11 inokulierten Pflanzen zeigten auch im Dezember 21 Tage nach Inokulation schon irreversible Schäden.

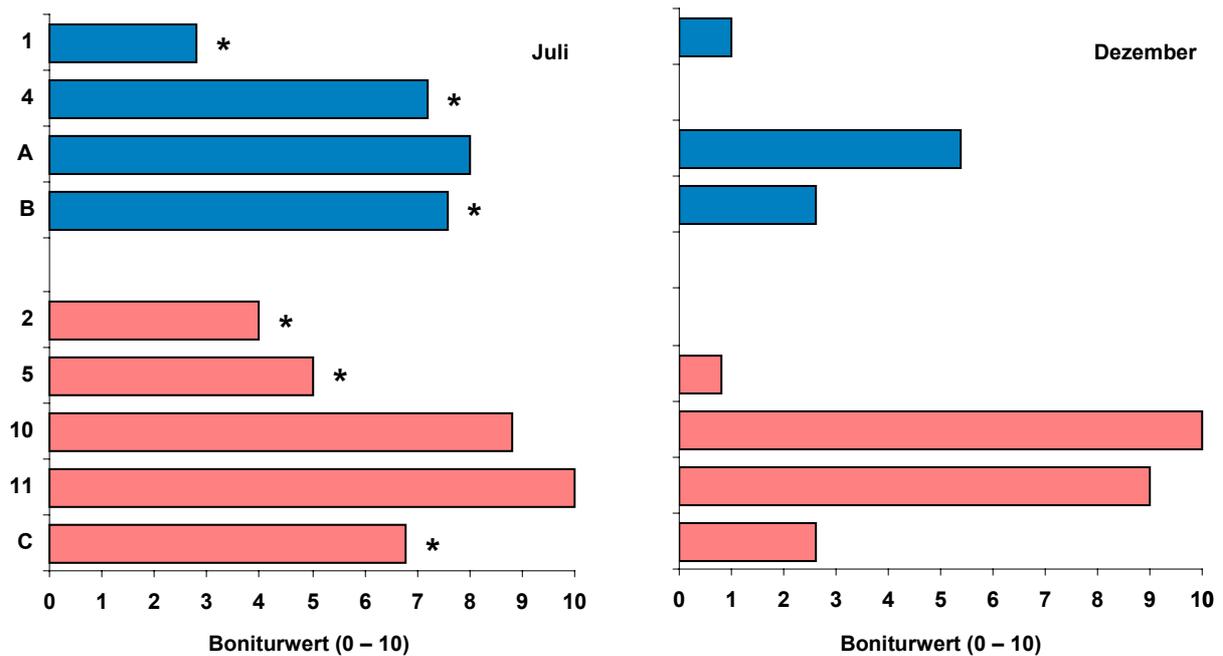


Abb. 14: Einfluss der Jahreszeit auf die Symptomausprägung an Tomatenpflanzen nach Inokulation mit CMV-Isolaten der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot), 21 d p.i., n = 5 (Inokulation mit 0,1 mg Virus/ml; Sternchen zeigen signifikante Unterschiede bei einem paarweisen Vergleich der entsprechenden Isolate (Mann-Whitney, $p \leq 0,05$)).

3.3.3 Paprikapflanzen

3.3.3.1 Symptomausprägung

Die Stärke der Symptome an Paprikapflanzen wurde 58 Tage nach Inokulation ausgewertet. Es traten Blattverfärbungen und -deformationen sowie Stauchungen bis hin zur Rosettenbildung auf (Bildseite VIII und IX). Basierend auf den beobachteten Symptomen wurde ein Boniturschema erstellt, um Unterschiede in der Stärke der auftretenden Veränderungen auszuwerten (Abb. 15).

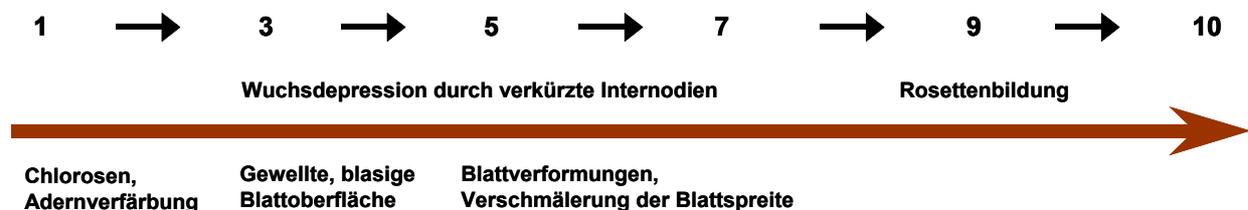


Abb. 15: Klassifizierung der Symptome an Paprikapflanzen nach CMV-Infektion (Zunahme der Symptome von links nach rechts; Oben: Boniturwerte; Mitte: Einfluss auf das Pflanzenwachstum; Unten: Einfluss auf den Pflanzenhabitus).

Bei den Experimenten mit Paprikapflanzen traten sehr deutliche untergruppen-spezifische Unterschiede in der Symptomausprägung auf. Die mit Isolaten der Untergruppe II inokulierten Pflanzen zeigten in einigen Fällen eine leichte Scheckung oder Rauhlblättrigkeit, in der Regel aber keine eindeutigen Symptome im Vergleich zu den nicht inokulierten Kontrollpflanzen. Innerhalb dieser Gruppe waren nach Inokulation mit dem Isolat 2 noch am häufigsten leichtere Symptome zu beobachten. Dagegen führte die Inokulation mit den Isolaten der Untergruppe I zu sehr starken Veränderungen der entsprechenden Wirtspflanzen (Abb. 16).

Die signifikant stärkste Beeinträchtigung der Pflanzenentwicklung wurde durch die Isolate A und 4 induziert. Die mit diesen Isolaten infizierten Paprikapflanzen zeigten neben leichteren Blattsymptomen, wie einer gewellten und gescheckten Blattoberfläche (Bildseite VIII, Bilder a und b), auch starke Blattdeformationen (Bildseite VIII, Bilder c – e) und Stauchungen (Bildseite IX, Bilder a und b). Die mit den Isolaten 1 und B inokulierten Pflanzen reagierten ebenfalls mit Blattverfärbungen und –deformationen, aber die Pflanzenlänge war wesentlich weniger beeinträchtigt (Bildseite IX, Bild a). Die Verwendung einer geringeren Inokulumdichte von 0,01 mg Virus/ml führte zu keiner wesentlichen Abschwächung der Pflanzenreaktionen.

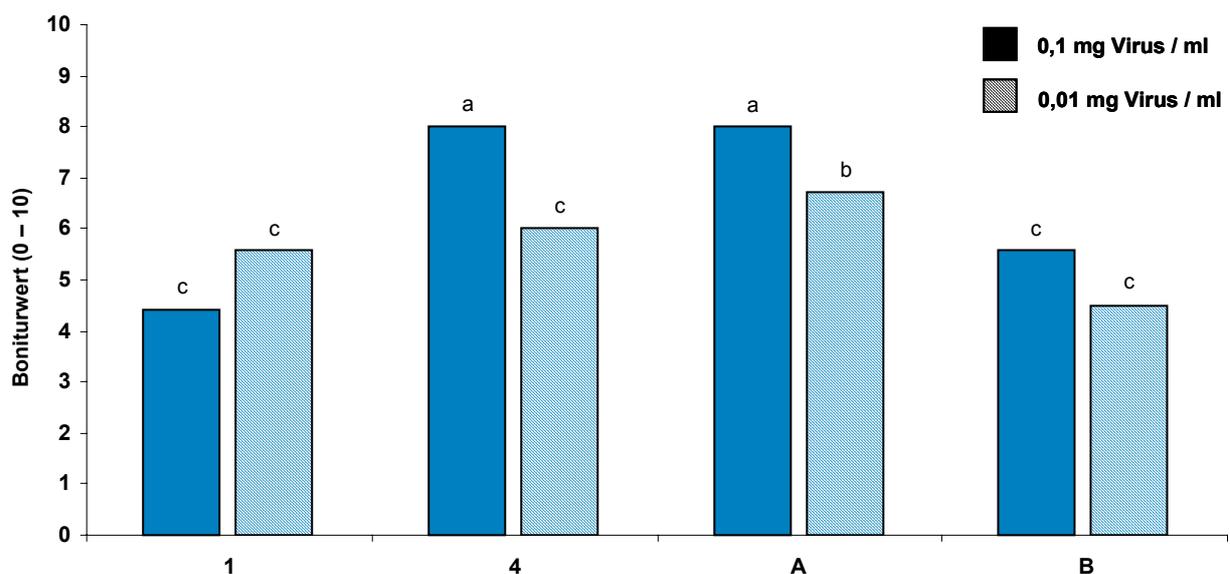


Abb. 16: Einfluss der CMV-Isolate auf die Ausprägung der Symptome an Paprikapflanzen, 58 d p.i., n = 10 (Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B; Inokulation mit 0,1 und 0,01 mg Virus/ml; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

3.3.3.2 Wachstum

Bei den Paprikapflanzen wurde die Länge 58 und 80 Tage nach Inokulation ausgewertet, wobei sich aufgrund der Versuchsbedingungen in diesem Zeitraum keine wesentlichen Veränderungen mehr ergaben.

Bei allen mit 0,1 mg Virus/ml der Isolate der Untergruppe I inokulierten Paprikapflanzen konnte eine signifikante Reduktion der Wuchslänge gegenüber den nicht inokulierten Pflanzen festgestellt werden (Abb. 17). Dieser Einfluss auf das Wachstum der Versuchspflanzen wurde auch bei Verwendung einer geringeren Inokulumdichte von 0,01 mg Virus/ml nicht wesentlich abgeschwächt. Nur bei Isolat B konnte bei dieser Inokulumdichte in keinem Fall mehr ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Den stärksten Effekt zeigte Isolat A, das sich in einigen Fällen signifikant von allen anderen verwendeten CMV-Isolaten unterschied. Ein durchgehend starker Einfluss auf das Wachstum der Wirtspflanzen war auch bei Isolat 4 zu beobachten, während die mit den Isolaten 1 und B inokulierten Pflanzen in einigen Versuchen weit weniger betroffen waren. Die Isolate der Untergruppe II zeigten keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Versuchspflanzen.

Wie schon bei den Versuchen mit Tomatenpflanzen konnten auch bei den Paprikapflanzen keine signifikanten Unterschiede der Mischinokulationen zu den Inokulationen mit jeweils einem der Isolate festgestellt werden. Die Kombination der Isolate A und B zeigte allerdings in allen Versuchen den stärksten Einfluss auf das Wachstum der inokulierten Pflanzen.

Um den Einfluss der Inokulumdichte auf den Krankheitsverlauf zu untersuchen wurden Paprikapflanzen mit 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 und 0,00001 mg Virus/ml Suspension inokuliert. Durch die gleichzeitige Durchführung der Versuche in zwei unterschiedlichen Düngungsstufen sollte der Einfluss einer erhöhten Nährstoffversorgung auf die Schädigung der Pflanzen nach CMV-Infektion bei verschiedenen Inokulumdichten geprüft werden (Abb. 18).

Bei den Isolaten 1, 4 und B war teilweise schon bei einer Inokulumdichte von 0,01 mg Virus/ml kein signifikanter Einfluss mehr auf das Wachstum der Wirtspflanzen nachzuweisen. Bei Isolat B wurde in wenigen Fällen selbst nach Inokulation mit 0,1 mg Virus/ml kein signifikanter Effekt auf das Pflanzenwachstum festgestellt. Nur die mit dem Isolat A infizierten Paprikapflanzen zeigten bei einer Inokulumdichte von 0,001 mg Virus/ml noch eine signifikante Reduktion der Pflanzenlänge gegenüber den nicht inokulierten Pflanzen. Ab einer Inokulumdichte von 0,0001 mg Virus/ml war bei keinem der Isolate mehr ein Effekt auf das Wachstum der Versuchspflanzen zu beobachten.

Eine erhöhte Düngung führte zu einer Wachstumssteigerung aller Versuchspflanzen. Doch schien sich eine stärkere Düngung vor allem positiv auf die nicht inokulierten und diejenigen Pflanzen auszuwirken, die ohnehin keinen Einfluss einer Virusinfektion zeigten. Unabhängig von der verwendeten Inokulumdichte, wurde kein signifikanter Einfluss einer erhöhten Nährstoffversorgung auf den Krankheitsverlauf festgestellt.

3.3.3.3 Chlorophyllgehalt

Die Chlorophyllmessungen, 54 und 77 Tage nach der Inokulation, ergaben in keinem Fall einen signifikanten Einfluss der Virusinfektion auf den Chlorophyllgehalt der Wirtspflanzen (Abb. 19). Allerdings zeigten die mit 0,1 mg Virus/ml des Isolates A inokulierten Pflanzen bei allen Messungen den geringsten Chlorophyllgehalt. Auch eine erhöhte Nährstoffversorgung resultierte nicht in signifikant höheren Chlorophyllgehalten der entsprechenden Pflanzen (Abb. 20).

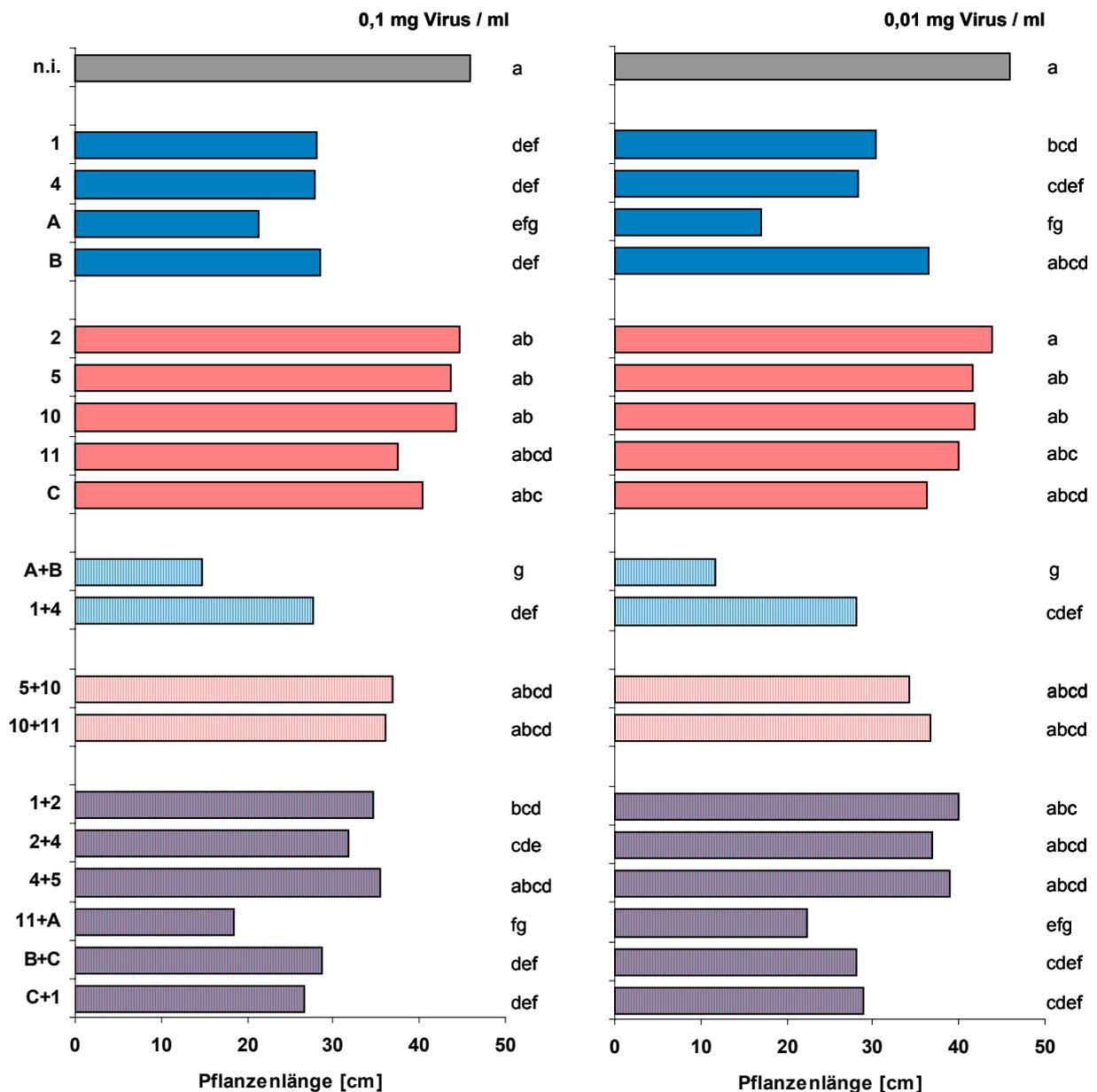


Abb. 17: Einfluss der CMV-Isolate auf das Wachstum von Paprikapflanzen, 58 d p.i., n = 5 (Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); Mischinfektionen mit je zwei Isolaten der Untergruppe: I (blau gestreift), II (rot gestreift), I und II (blau/rot gestreift); Inokulation mit 0,1 und 0,01 mg Virus/ml; nicht inokuliert (n.i.); verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

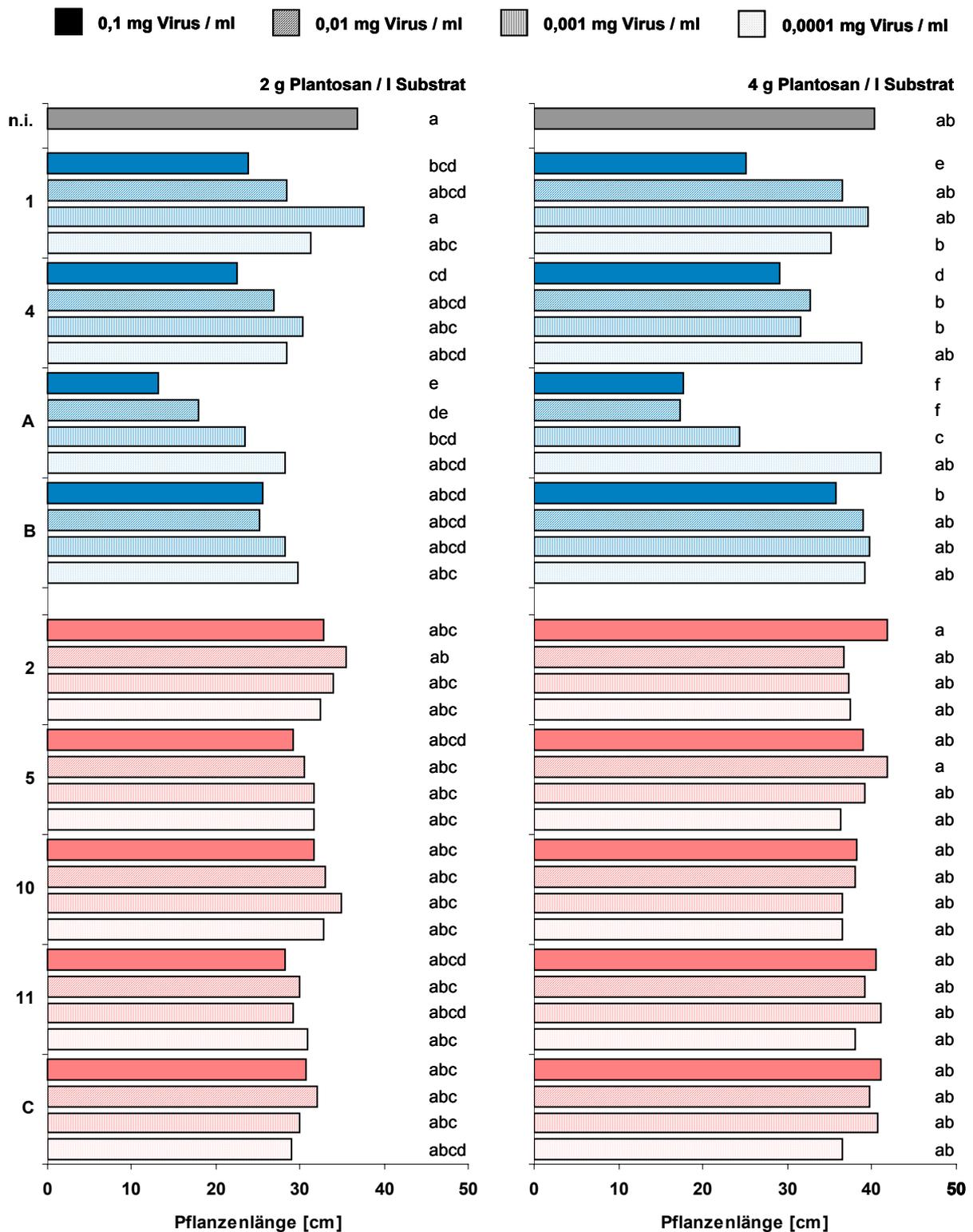


Abb. 18: Einfluss der Nährstoffversorgung auf das Wachstum von Paprikapflanzen nach Inokulation mit den CMV-Isolaten der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); 80 d p.i., n = 4 (Inokulation mit 0,1, 0,01, 0,001 und 0,0001 mg Virus/ml; nicht inokuliert (n.i.); Düngung mit 2 und 4 g Plantosan/l Substrat; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, p ≤ 0,05)).

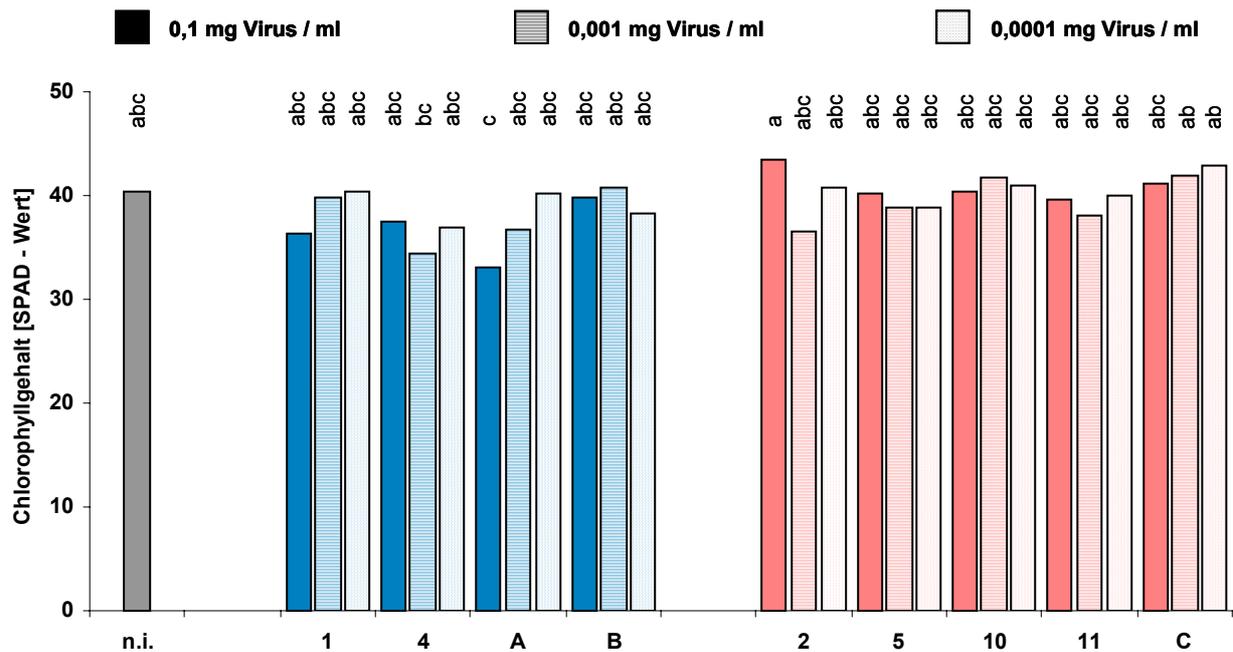


Abb. 19: Einfluss der CMV-Isolate auf den Chlorophyllgehalt von Paprikapflanzen, 54 d p.i., n = 3 (Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); nicht inokuliert (n.i.); inokuliert mit 0,1, 0,001 und 0,0001 mg Virus/ml; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

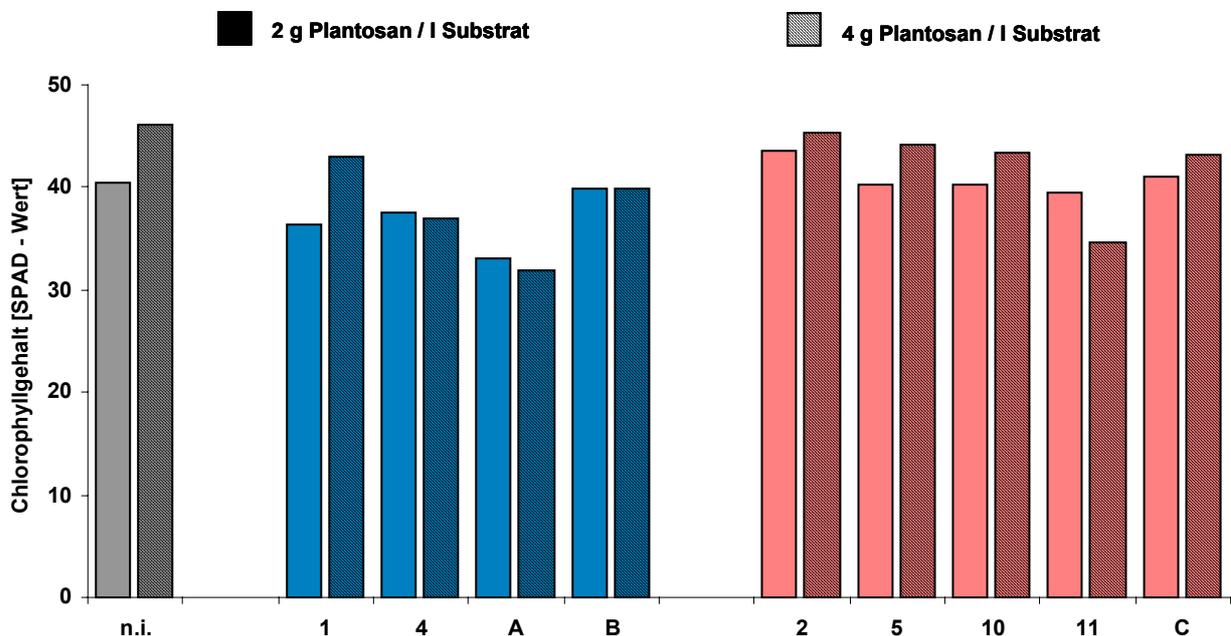


Abb. 20: Einfluss der Nährstoffversorgung auf den Chlorophyllgehalt von Paprikapflanzen nach Inokulation mit CMV-Isolaten der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); 54 d p.i., n = 3 (Inokulation mit 0,1 mg Virus/ml; nicht inokuliert (n.i.); Düngung mit 2 und 4 g Plantosan/l Substrat; keine signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

3.3.3.4 Fruchtbildung

Bei einigen der infizierten Paprikapflanzen fiel die Bildung ungewöhnlich vieler Blüten auf, welche sich aber überwiegend nicht zu Früchten weiter entwickelten. Wenn sich Früchte entwickelten, waren diese wesentlich kleiner als bei den nicht inokulierten Pflanzen. Um festzustellen, ob sich die CMV-Isolate in ihrem Einfluss auf die Fruchtbildung bei Paprikapflanzen unterscheiden, wurden daher 84 Tage nach Inokulation die Früchte jeder Pflanze ab einem Mindestgewicht von 1 g gewogen.

Bei einer Inokulumdichte von 0,1 mg Virus/ml zeigten alle mit CMV inokulierten Versuchspflanzen ein geringeres Fruchtgewicht als die nicht inokulierten Pflanzen (Abb. 21). Aufgrund sehr stark variierender Werte war aber nur bei den Isolaten 1, 4 und A ein signifikanter Einfluss auf die Fruchtbildung der infizierten Paprikapflanzen nachzuweisen. An den betroffenen Pflanzen hatten sich mehrere, sehr kleine, teilweise deformierte Früchte gebildet, während an den mit den Isolaten der Untergruppe II sowie den nicht inokulierten Pflanzen eine bis maximal zwei größere Früchte normaler Form wuchsen. Der Einfluss der Isolate 1, 4 und A auf die Fruchtbildung war auch bei einer Inokulumdichte von 0,01 mg Virus/ml unvermindert stark. Bei der Inokulation von 0,001 mg Virus/ml konnte in der Regel keine Beeinträchtigung der Wirtspflanzen mehr festgestellt werden.

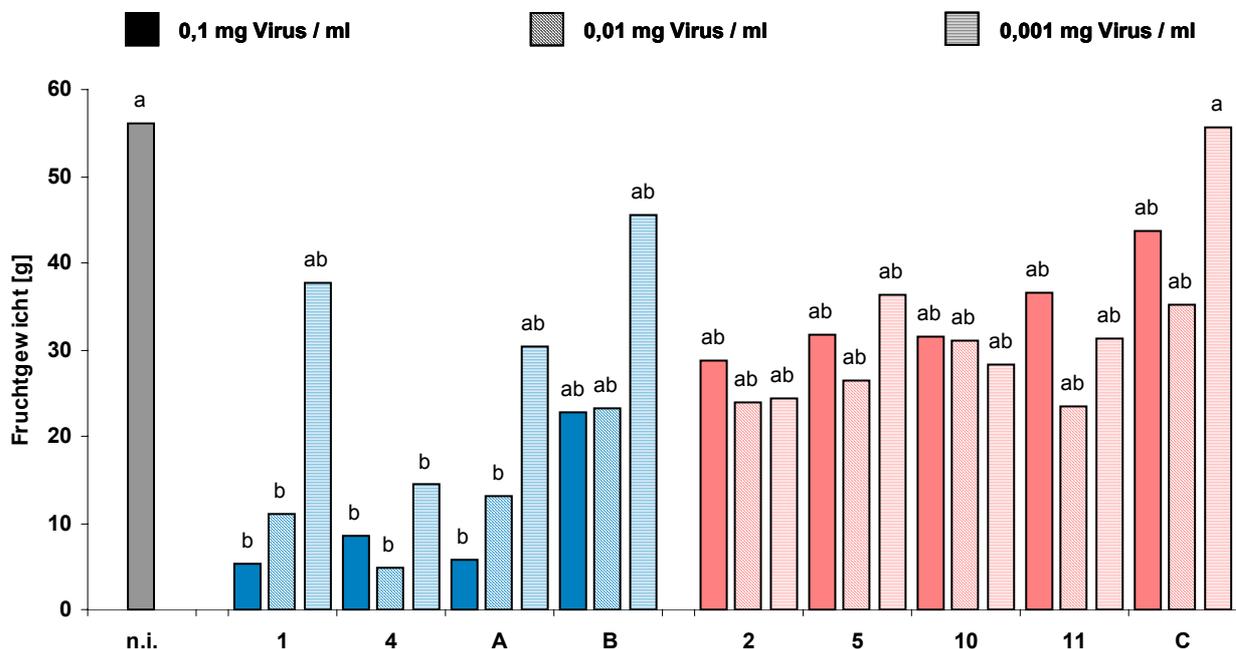


Abb. 21: Einfluss der CMV-Isolate auf die Fruchtbildung von Paprikapflanzen, 84 d p.i., n = 4 (Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); nicht inokuliert (n.i.); Inokulation mit 0,1, 0,01 und 0,001 mg Virus/ml; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

Ein signifikanter Einfluss der Nährstoffversorgung wurde nicht festgestellt (Abb. 22). Auffallend war wiederum ein positiver Effekt der erhöhten Düngungsintensität auf die Fruchtbildung derjenigen Varianten, bei denen ohnehin kein signifikanter Effekt der CMV-Infektion auf die Fruchtbildung auftrat. Dagegen war bei den mit den Isolaten 1, 4 und A inokulierten Paprikapflanzen der Fruchtertrag teilweise sogar geringer als bei der üblichen Düngung mit 2 g Plantosan/l Substrat. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

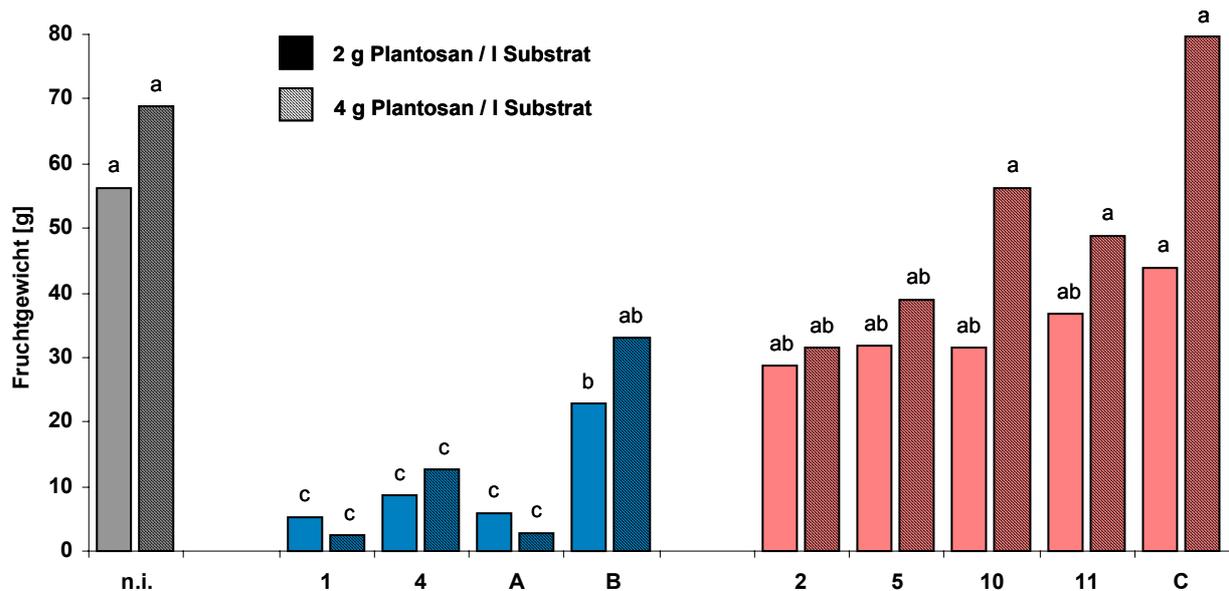


Abb. 22: Einfluss der Nährstoffversorgung auf die Fruchtbildung von Paprikapflanzen nach Inokulation mit CMV-Isolaten der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); 84 d p.i., n = 4 (Inokulation mit 0,1 mg Virus/ml; nicht inokuliert (n.i.); Düngung mit 2 und 4 g Plantosan/l Substrat; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

3.3.4 Gurkenpflanzen

In einem Vorversuch wurden mit dem Isolat 1 (Untergruppe I) und den Isolaten 2, 10 und 11 (Untergruppe II) verschiedene Sorten der Traubengurke getestet. Neben der CMV-empfindlichen Sorte „Vorgebirgstraube“ wurden die Sorten „Pasamonte“, „Othello“ und „Boston“ mit einer Toleranz gegen CMV verwendet. Da bei letzteren keine wesentlichen Unterschiede auftraten, wurden alle weiteren Versuche nur noch mit den Sorten „Vorgebirgstraube“ und „Othello“ durchgeführt.

3.3.4.1 Symptomausprägung

Die Auswertung der Symptomausprägung an Gurkenpflanzen wurde 20 Tage nach Inokulation vorgenommen. Neben Blattverfärbungen konnte in einigen Fällen eine Beein-

trächtigkeit des Wachstums beobachtet werden. Die Gurkenpflanzen wuchsen sehr schnell und die Größe der Blätter konnte auch an gesunden Pflanzen je nach Blattalter sehr unterschiedlich ausfallen. Daher wurden bei der Bonitur der Symptome eventuelle Wachstumshemmungen nicht berücksichtigt. Des Weiteren wurde hier nicht, wie bei den anderen Versuchspflanzen, der Gesamteindruck der Pflanzen beurteilt, sondern jedes Blatt einzeln bonitiert und daraus der Mittelwert gebildet. Bei einem Boniturwert von 8 waren 100 %, bei einem Boniturwert von 4 waren 50 % der Blattfläche mit Mosaik bedeckt bzw. chlorotisch. Die Boniturwerte 9 und 10 sollten bei Welke bzw. dem Absterben der Blätter vergeben werden, was aber in keinem Fall beobachtet werden konnte (Abb. 23).

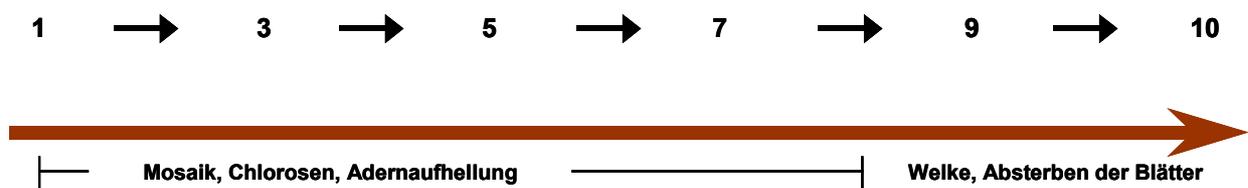


Abb. 23: Klassifizierung der Symptome an Gurkenblättern nach CMV-Infektion (Zunahme der Symptome von links nach rechts. Oben: Boniturwerte; Unten: Symptomausprägung an den Blättern).

Anders als bei den Paprika- und Tomatenpflanzen, traten an den Gurkenpflanzen drei bis vier Tage nach Inokulation die ersten lokalen Symptome auf den Keimblättern auf. Dabei riefen die Isolate 10 und 11 an allen Gurkensorten eine größere Anzahl Lokalläsionen hervor als die Isolate 1 und 2 (Abb. 24). Aufgrund stark variierender Boniturwerte traten allerdings keine signifikanten Unterschiede auf.

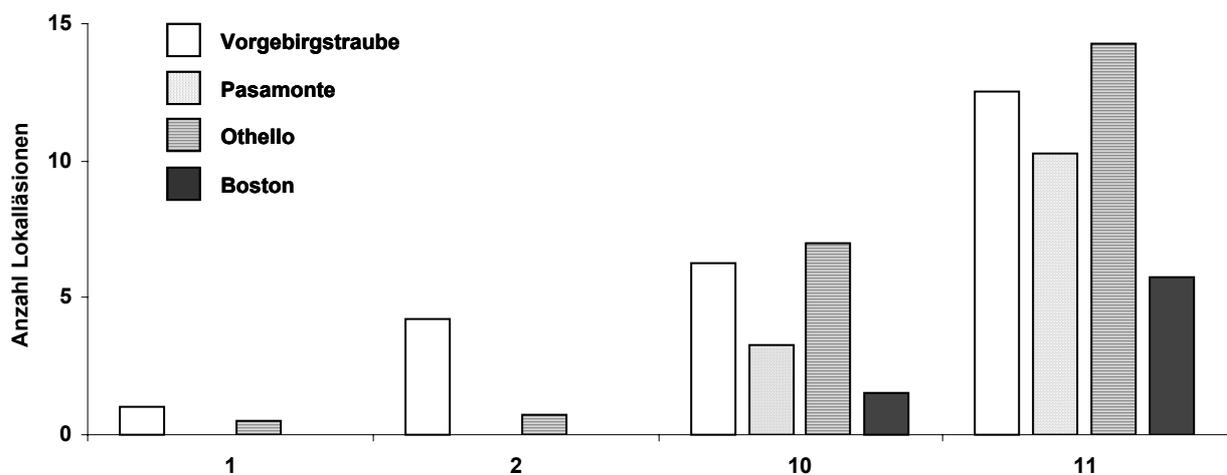


Abb. 24: Auftreten lokale Symptome an den Keimblättern verschiedener Gurkensorten nach Inokulation mit 0,1 mg Virus/ml der CMV-Isolate 1, 2, 10 und 11; 5 d p.i., n = 4 (Keine signifikanten Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

Die Auswertung der lokalen Symptome eignete sich nicht für einen Vergleich der Isolate, da sich die Läsionen je nach CMV-Isolat und Gurkensorte in ihrer Ausprägung sehr unterschieden. Die durch die Isolate 1 und 2 verursachten Läsionen hatten maximal die Größe eines Stecknadelkopfes. Nach Inokulation mit den Isolaten 10 und 11 traten auf den Keimblättern der Sorte „Vorgebirgstraube“ klar umrissene runde Chlorosen mit einem Durchmesser von ca. 5 mm, an den anderen Sorten eher ovale, teilweise eckige verschwommene Läsionen, auf .

Mit der Bildung des ersten Laubblattes 7 bis 8 Tage nach Inokulation konnten auf einigen Pflanzen der Sorte „Vorgebirgstraube“ auch schon die ersten systemischen Symptome beobachtet werden (Tab. 5). Von sieben Pflanzen pro Variante zeigten 9 Tage nach Inokulation mit den Isolaten 5, 10 und 11 schon fünf, mit den Isolaten A und B schon alle Pflanzen systemische Chlorosen. Bei den Isolaten 2 und C traten dagegen nur vereinzelt Pflanzen mit Symptomen auf. Vier Tage später zeigten bei den Isolaten 2 und C etwa jede zweite, bei den Isolaten 5, 10, 11, A und B alle Pflanzen Chlorosen auf dem ersten Laubblatt. Die Isolate 1 und 4 hatten auch 13 Tage nach Inokulation noch keine systemischen Symptome auf den Wirtspflanzen induziert. Auch bei den CMV-toleranten Gurkensorten waren an allen mit den Isolaten 10 und 11 inokulierten Pflanzen nach 13 Tagen Symptome zu beobachten.

Tab. 5: Anzahl der Gurkenpflanzen („Vorgebirgstraube“) mit systemischen Symptomen auf dem ersten Laubblatt, 9 und 13 Tage nach Inokulation mit den CMV-Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B und II: 2, 5, 10, 11, C (Inokulation mit 0,1 mg Virus/ml; n = 7).

	CMV-Isolate								
	1	2	4	5	10	11	A	B	C
9 d p.i.	0/7	1/7	0/7	5/7	5/7	5/7	7/7	7/7	1/7
13 d p.i.	0/7	3/7	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	4/7

Die CMV-toleranten Sorten zeigten 20 Tage nach Inokulation nur schwache Reaktionen auf CMV-Infektion (Abb. 25). Nach Inokulation mit den Isolaten 1 und 2 waren keine Veränderungen im Vergleich zu den nicht inokulierten Pflanzen festzustellen. Diese Isolate induzierten auch an der Sorte „Vorgebirgstraube“ nur milde Symptome, wohingegen nach Inokulation mit den Isolaten 10 und 11 an vielen Blättern deutliche Blattverfärbungen auftraten. Obwohl viele Gurkenblätter durchaus ein ganzflächiges Mosaik zeigten, lag der gemittelte Boniturwert immer deutlich niedriger, da auch an stark betroffenen Pflanzen immer symptomfreie Blätter auftraten. Das erste Laubblatt zeigte häufig Symptome. Davon abgesehen konnte kein Zusammenhang zwischen Blattalter und Symptomausprägung festgestellt werden. Auch bei den CMV-toleranten Sorten konnten einzelne Blätter mit starkem Mosaik beobachtet werden. Mit zunehmendem Pflanzenalter überwogen in diesem Fall aber die völlig gesund erscheinenden Blätter.

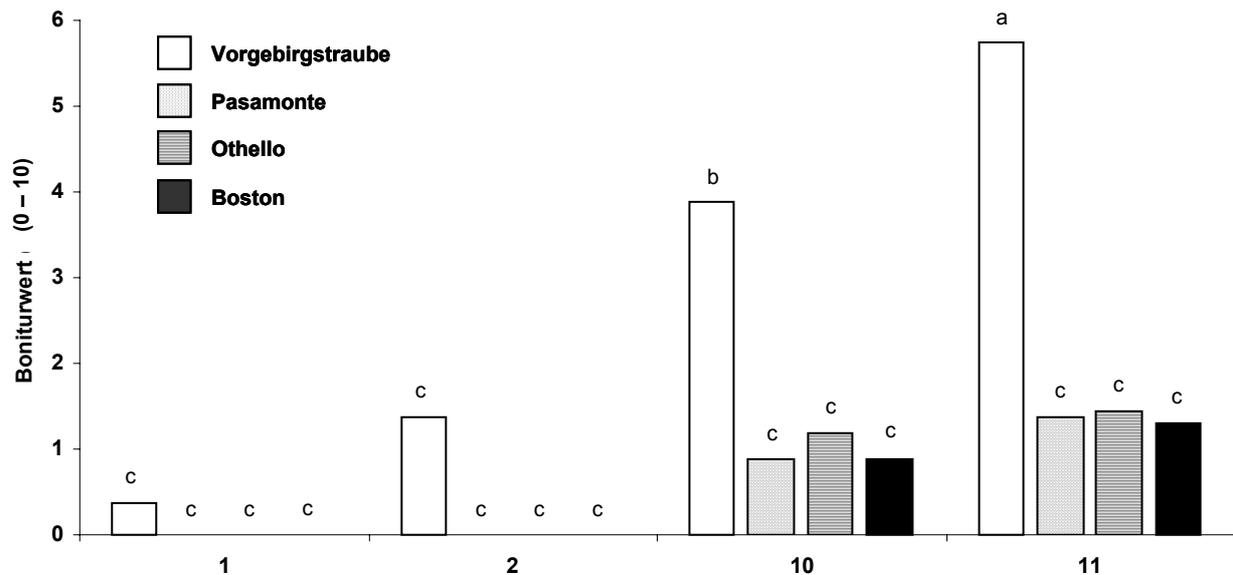


Abb. 25: Einfluss der CMV-Isolate auf die Symptomausprägung verschiedener Gurkensorten, 20 d p.i., n = 3 (Sorten: „Vorgebirgstraube“, „Pasamonte“, „Othello“, „Boston“; Isolate 1, 2, 10 und 11; Inokulation mit 0,1 mg Virus/ml; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

Diese Ergebnisse bestätigten sich in den Versuchen mit den Sorten „Vorgebirgstraube“ und „Othello“ (Abb. 26). Es traten deutliche Unterschiede zwischen den CMV-Isolaten in der Stärke der ausgelösten Wirtsreaktionen auf. An Pflanzen der Sorte „Vorgebirgstraube“ induzierten stets das Isolat A (Untergruppe I) und die Isolate 5, 10 und 11 (Untergruppe II) die signifikant stärksten Symptome. Etwas moderater waren die Reaktionen nach Inokulation mit dem Isolat B, während die Isolate 1, 2, 4 und C nur sehr schwache Veränderungen verursachten. Bei Verwendung einer geringeren Inokulumdichte von 0,01 mg Virus/ml kam es in der Regel zu keiner signifikanten Abschwächung der Symptome. Nur die Isolate 5 und A induzierten nach Inokulation mit 0,001 mg Virus/ml noch deutliche Symptome. Bei einer Inokulumdichte von 0,0001 mg Virus/ml wurde kein Einfluss der Isolate auf die Wirtspflanzen mehr festgestellt.

An der Sorte „Othello“ induzierten nur noch die Isolate A und B stärkere Symptome. Bei einem direkten Vergleich ergab sich aber auch bei diesen Isolaten eine signifikante Reduktion der Symptome gegenüber der Sorte „Vorgebirgstraube“. Die Isolate 5, 10 und 11 verursachten nur vereinzelt Symptome. An den mit den Isolaten 1, 4, 2 und C inokulierten Pflanzen waren keine pathologischen Veränderungen zu beobachten. Schon ab einer Inokulumdichte von 0,01 mg Virus/ml zeigte sich teilweise eine Abschwächung der Symptome und bei den mit 0,001 mg Virus/ml inokulierten Pflanzen war in keinem Fall mehr eine Reaktionen festzustellen.

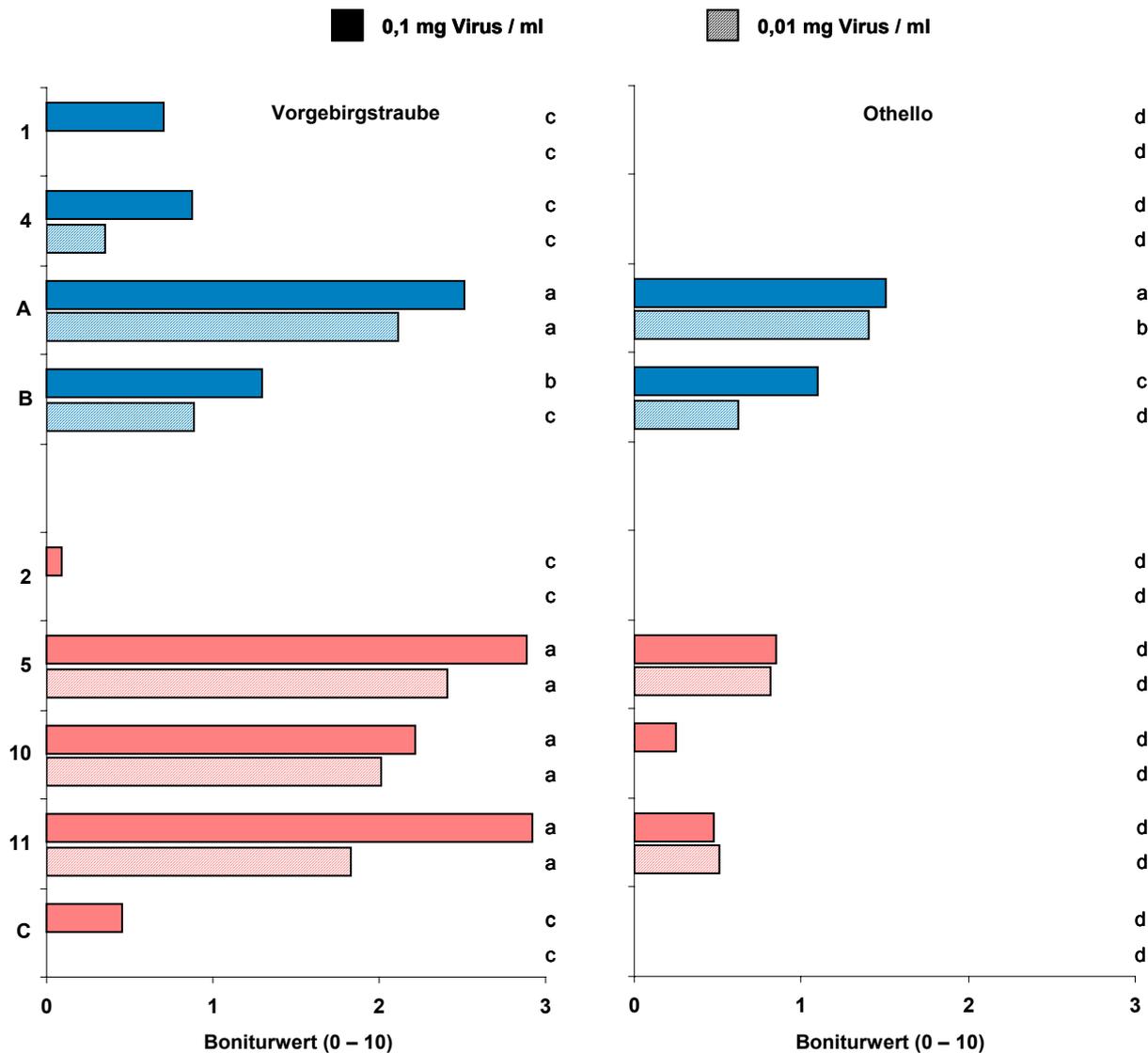


Abb. 26: Einfluss der CMV-Isolate auf die Symptomausprägung an Gurkenpflanzen der Sorten „Vorgebirgsraube“ und „Othello“, 20 d p.i., n = 5 (Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); Inokulation mit 0,1 und 0,01 mg Virus/ml; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

3.3.4.2 Wachstum

Zur Untersuchung des Einflusses der CMV-Infektion auf das Wachstum der Gurkenpflanzen wurde 20 Tage nach Inokulation die Anzahl der Blätter pro Pflanze bestimmt. Im Anschluss wurden die Pflanzen direkt über der Erde abgeschnitten und zur Bestimmung der Trockenmasse weiterverarbeitet. Nur nach Inokulation von Pflanzen der Sorte „Vorgebirgsraube“ mit 0,1 und 0,01 mg Virus/ml des Isolates A, trat eine signifikante Reduktion der Blattanzahl auf (Abb. 27). Dabei war dieser Effekt bei beiden Inokulationsdichten gleich stark. Bei allen anderen Isolaten sowie bei der Sorte „Othello“ zeigte sich kein Einfluss der Virusinfektion auf das Wachstum der Versuchspflanzen. Bei der Bestimmung der Trockenmasse (Abb. 28) wurde auch die Größe der Blätter berücksichtigt. Ein signifikant vermindertes Trockengewicht wurde wiederum nur durch das Isolat A

und nur an der Sorte „Vorgebirgsstraube“ induziert und zwar gleichermaßen stark bei Verwendung von 0,1 und 0,01 mg Virus/ml zur Inokulation. Bei allen anderen Isolaten sowie bei der Sorte „Othello“ wurde kein signifikanter Unterschied zu den nicht inokulierten Pflanzen festgestellt.

Auch in diesem Virus-Wirt-System wurden Versuche in zwei verschiedenen Düngungsstufen durchgeführt. Es konnte weder ein Einfluss der Nährstoffversorgung auf die Symptomausprägung noch auf das Wachstum der infizierten Pflanzen nachgewiesen werden.

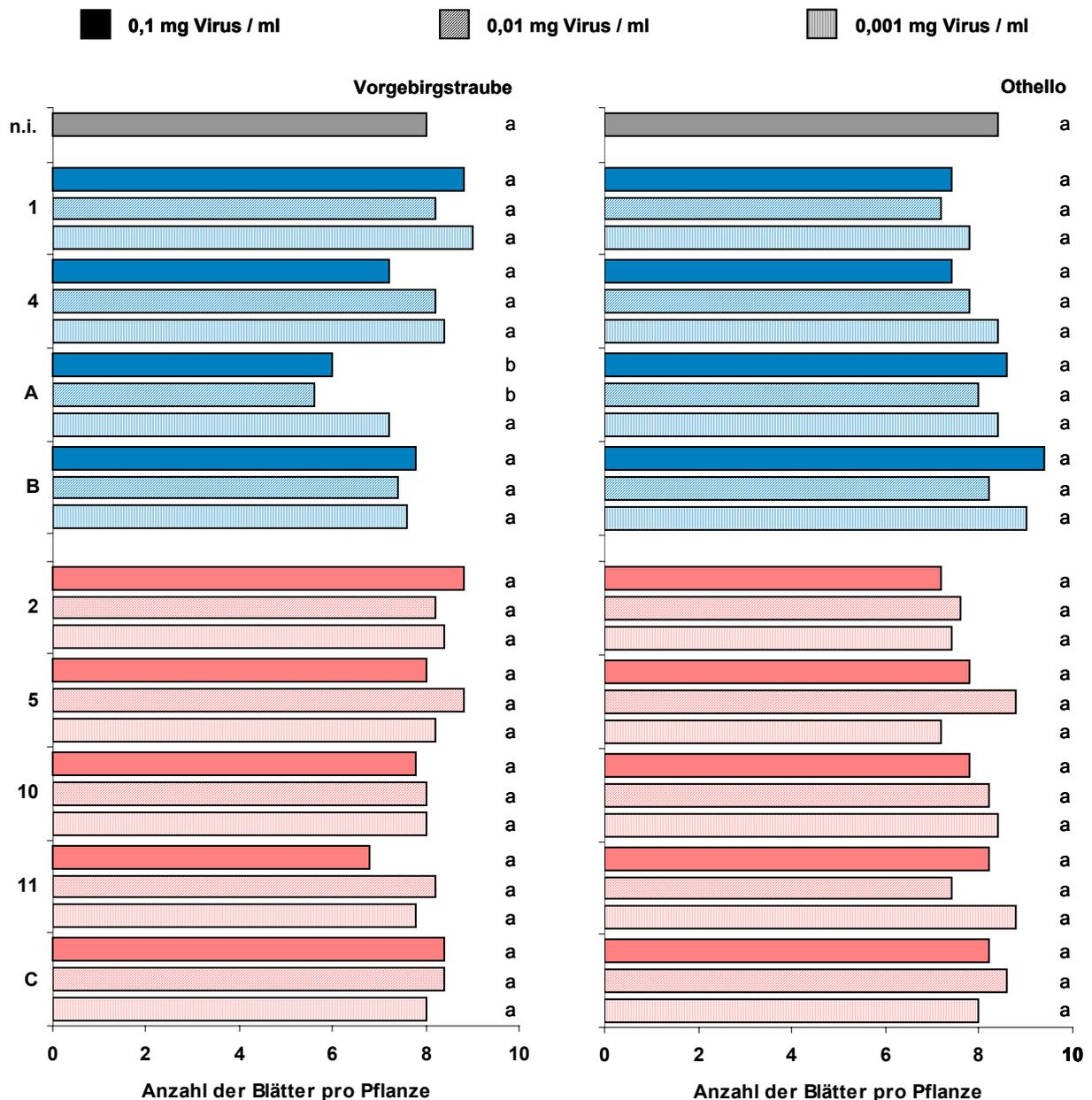


Abb. 27: Einfluss der CMV-Isolate auf das Wachstum von Gurkenpflanzen der Sorten „Vorgebirgsstraube“ und „Othello“, 20 d p.i., n = 5 (Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); Inokulation mit 0,1, 0,01 und 0,001 mg Virus/ml; nicht inokuliert (n.i.); verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

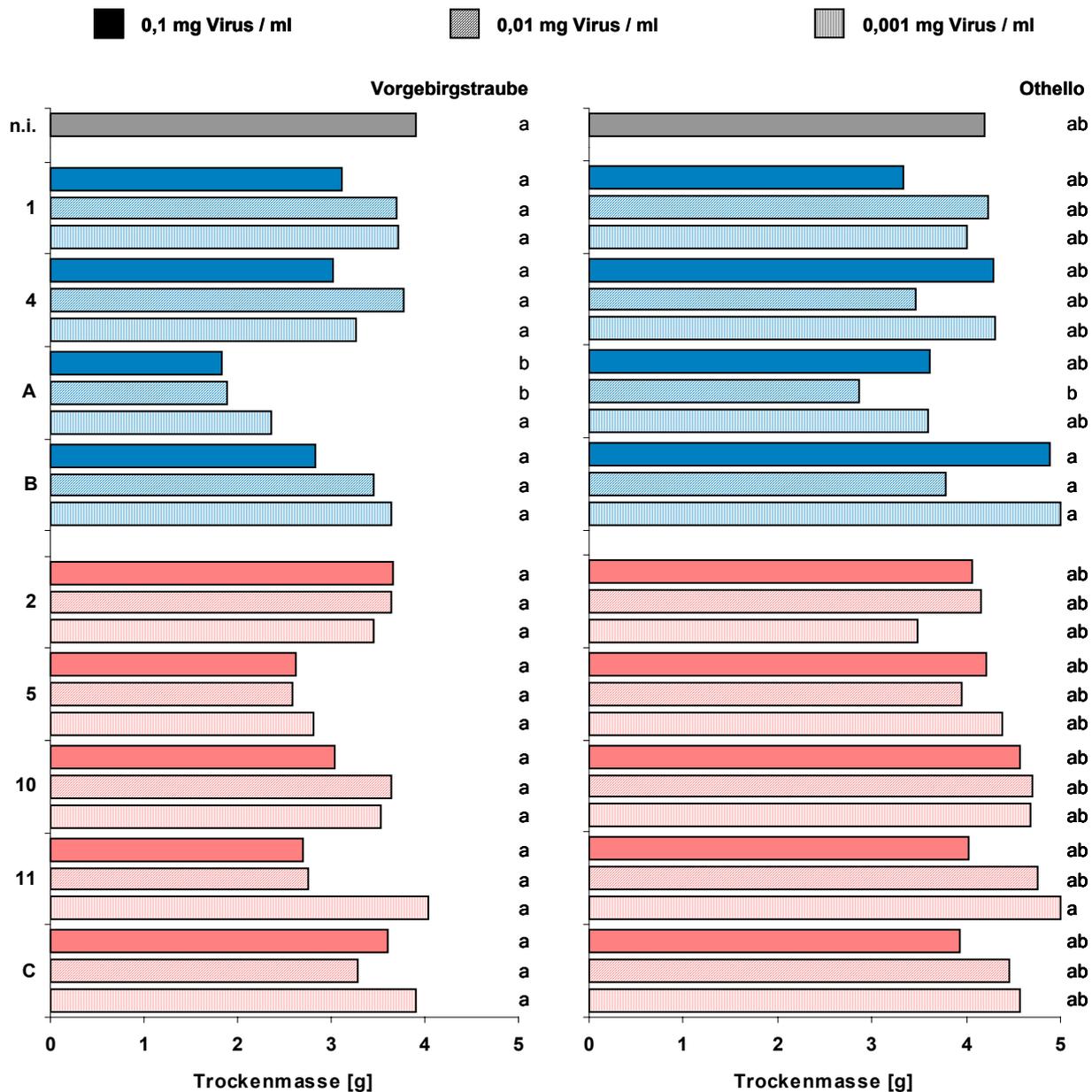


Abb. 28: Einfluss der CMV-Isolate auf die Trockenmasse von Gurkenpflanzen der Sorten „Vorgebirgsraube“ und „Othello“, 20 d p.i., n = 5 (Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); Inokulation mit 0,1, 0,01 und 0,001 mg Virus/ml; nicht inokuliert (n.i.); verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

3.3.5 Feldsalatpflanzen

Die Versuche wurden mit den Sorten „Verte de Cambrai“, „Vit“ und „Holländischer Breitblättriger“ durchgeführt. In keinem Fall wurden durch die Virusinokulation induzierte Veränderungen an den Pflanzen festgestellt. Da aber mittels ELISA in einigen Fällen eine erfolgreiche Infektion nachzuweisen war, wurden zur Untersuchung eines eventuellen Einflusses der CMV-Isolate auf die Pflanzen, 30 Tage nach Inokulation

eine Messung des Chlorophyllgehaltes sowie die Bestimmung der Trockenmasse durchgeführt.

Bei den Chlorophyll-Messungen zeigten sich zwar sortenspezifische aber keine virus-induzierten Unterschiede. Bei der Bestimmung der Trockenmasse (Abb. 29) lagen zwar bei einer Inokulumdichte von 0,1 mg Virus/ml die Werte der inokulierten Pflanzen meistens unter denen der nicht inokulierten Pflanzen, aber signifikante Unterschiede waren ebenfalls in keiner Variante und bei keiner der drei Sorten nachzuweisen.

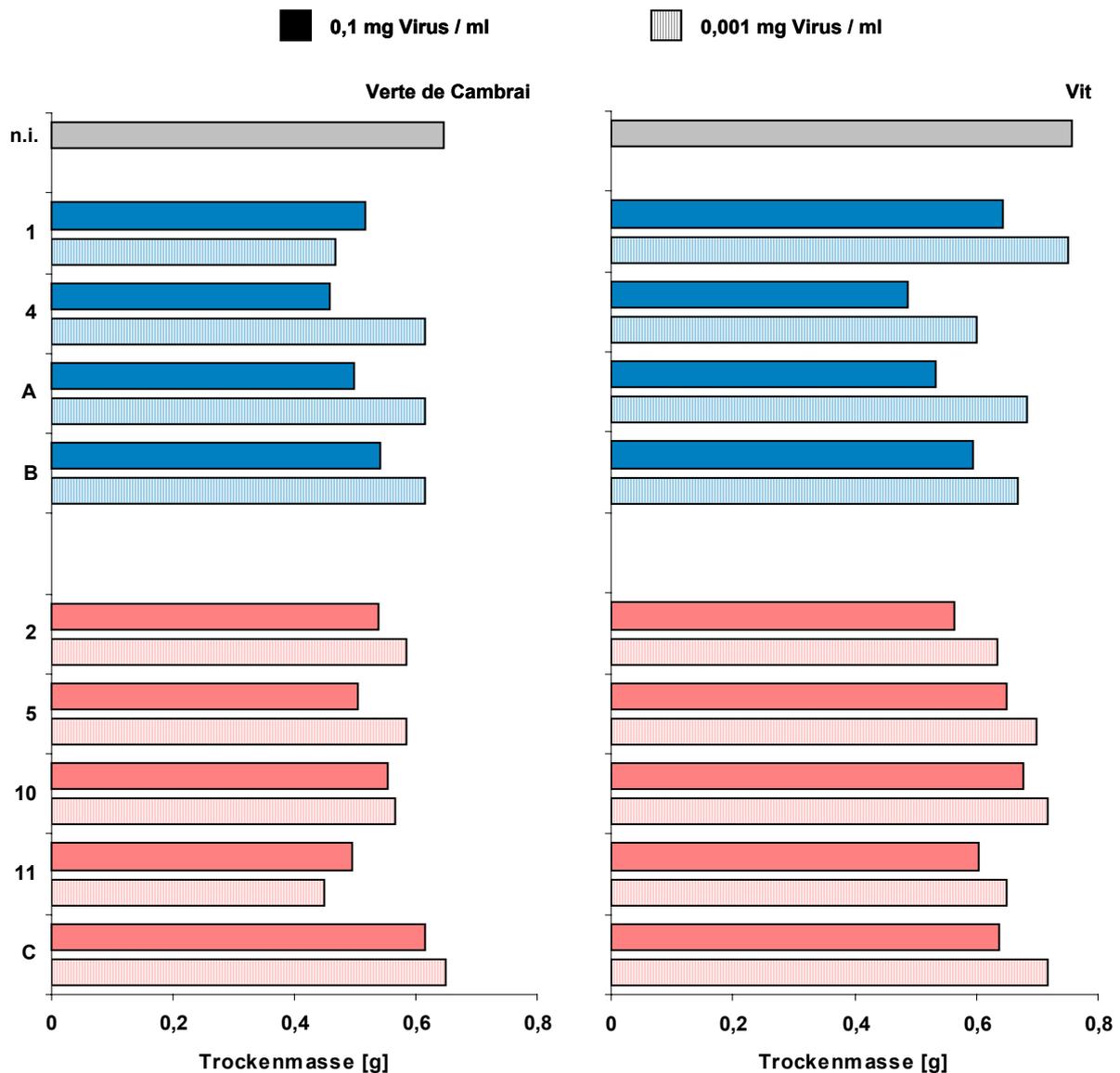


Abb. 29: Einfluss der CMV-Isolate auf die Trockenmasse von Feldsalatpflanzen der Sorten „Verte der Cambrai“ und „Vit“, 30 d p.i., n = 3 (Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau); II: 2, 5, 10, 11, C (rot); Inokulation mit 0,1 und 0,001 mg Virus/ml; nicht inokuliert (n.i.); keine signifikante Unterschiede (SNK-Test, $p \leq 0,05$)).

3.4 Vermehrung der CMV-Isolate

Neben der Wirtspflanzenbeeinträchtigung durch die CMV-Isolate sollte auch untersucht werden, ob Unterschiede der Isolate bezüglich ihrer Vermehrung auftreten bzw. ob ein Zusammenhang besteht zwischen dem Ausmaß der auftretenden Schädigung der infizierten Pflanzen und der Vermehrung des jeweiligen Isolates.

3.4.1 Optimierung der Virusanreicherung

Schon bei der Vermehrung und Reinigung der Isolate zu Herstellung eines standardisierten Inokulums zeigten sich Unterschiede zwischen den CMV-Isolaten.

Nach einigen Vorversuchen erfolgte die Vermehrung der Isolate der Untergruppe I an *N. rustica*, da diese Pflanzen deutlichere Blattsymptome zeigten und damit die Ernte junger systemisch infizierter Blätter erleichterte. Bei den Isolaten der Untergruppe II, die an *N. rustica* und *N. tabacum* „Samsun NN“ ähnlich starke und insbesondere bei den Isolaten 5, 11 und C teilweise weniger deutliche Symptome ausprägten, wurden beide *Nicotiana*-Arten zu gleichen Teilen verwendet. Auch *N. glutinosa* wurde als Vermehrungspflanze getestet, stellte sich aber als ungeeignet heraus, da trotz starker Symptome die Virusausbeute sehr gering war. Der günstigste Zeitraum zur Ernte schien in dem Zeitraum 12 – 14 Tage nach Inokulation zu liegen. Nur bei Isolat C wurde 18 Tage gewartet, da vorher keine deutlichen Symptome auftraten.

Da bei den ersten Reinigungsversuchen nur sehr unbefriedigende Ergebnisse erzielt werden konnten, wurden die zu verwerfenden Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte aufbewahrt und nach Anfertigung von Tropfenpräparaten im Elektronenmikroskop sowie durch das Abreiben auf Testpflanzen auf ihren Virusgehalt überprüft:

- Fraktion 1: Überstand aus der ersten niedertourigen Zentrifugation nach erneutem Waschen mit Puffer A und 10 min Zentrifugation bei 10000 rpm.
- Fraktion 2: Überstand der ersten Ultrazentrifugation.
- Fraktion 3: In Puffer C resuspendiertes Pellet der zweiten niedertourigen Zentrifugation.
- Fraktion 4: Überstand der zweiten Ultrazentrifugation.

Zum Vergleich dienten die zur Konzentrationsbestimmung verwendeten gereinigten Virussuspensionen (10 µl des resuspendierten Viruspellets mit Puffer C auf 1 ml aufgefüllt). Als Testpflanzen wurden Pflanzen derjenigen *Nicotiana*-Art verwendet, die nach Infektion mit dem jeweiligen Isolat üblicherweise deutliche Symptome ausprägten. Alle Extrakte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert.

Die nach dem Abreiben der Fraktionen auf den Testpflanzen auftretenden Symptome bestätigten den Verdacht größerer Virusverluste während der Reinigung, wobei durchaus Unterschiede zwischen den Isolaten festgestellt werden konnten. Besonders hohe

Verluste waren bei den Isolaten der Untergruppe I zu verzeichnen. Ganz besonders auffällig war das massive Vorhandensein von Viruspartikeln in den Rückständen der zwei niedertourigen Zentrifugationen (Fraktion 1 und 3). Die Symptome an den Testpflanzen zeigten, dass in der Fraktion 1, auch nach mehrmaligen Waschen der organischen Phase, noch größere Mengen an Viruspartikeln vorhanden waren. Dabei schien es zu einem Zusammenklumpen der Viruspartikel zu größeren Aggregaten und einem anschließenden Verlust im Pellet zu kommen.

Bei den Isolaten der Untergruppe II verlief die Reinigung weniger problematisch und eine Anpassung der Methode wäre nicht unbedingt nötig gewesen. Die Auswertung der Testpflanzen ließ darauf schließen, dass nur geringe Mengen an Viruspartikeln in den zu verwerfenden Reinigungsfraktionen zurück blieb. Allerdings waren in dem geernteten virusinfizierten Blattmaterial anscheinend weniger Viruspartikel vorhanden als bei den Isolaten der Untergruppe I. So lagen nach Minimierung der anfänglichen Probleme die Viruserträge bei den Isolaten der Untergruppe II mit ca. 0,1 – 0,2 mg Virus/g Blattmaterial unter denen der Untergruppe I mit 0,3 - 1,1 mg Virus/g Blattmaterial, trotz immer noch hoher Verluste dieser Isolate während der Reinigung. Bei Verwendung von 100 – 200 g Blattmaterial pro Reinigung, konnte für alle Isolate eine ausreichende Menge gereinigter Virussuspension für die folgenden Versuche hergestellt werden.

Die von den Fraktionen 1 – 4 angefertigten Tropfenpräparate brachten keine Aufschluss über die Höhe der Virusverluste während der Reinigung. Bei der Auswertung im Elektronenmikroskop waren nur wolkige Strukturen zu erkennen. Bei den gereinigten Virussuspensionen hingegen konnten im Elektronenmikroskop zahlreiche intakte Viruspartikel beobachtet werden (Bildseite II, Bilder e - g).

Um aufgrund dieser Beobachtungen eine Verbesserung des Reinigungsergebnisses zu erzielen, wurde die organische Phase nach der ersten Zentrifugation 2 - 3 mal erneut mit Puffer A homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand immer wieder aufgefangen, was den Nachteil hatte, dass im Anschluss große Mengen an Extrakten in der ersten Ultrazentrifugation pelletiert werden mussten. Die Laufzeiten der ersten hochtourigen Zentrifugation wurde um 20 min, die der Zweiten um bis zu 30 min verlängert. Insbesondere bei der letzten Ultrazentrifugation wurde versucht durch noch längere Laufzeiten bzw. das Auslassen der Saccharoselösung den Virusertrag zu steigern. Daraufhin waren jedoch die Verunreinigungen zu groß und es konnte kein klares Pellet mehr erreicht werden. Zugunsten einer hinreichend reinen Virussuspension mussten teilweise immer noch erhebliche Virusverluste in Kauf genommen werden. Das beste Ergebnis erzielte das wiederholte Emulgieren der Chloroformphase mit Puffer.

Der für CMV angegebene Richtwert für den Quotienten $CMV A_{260\text{ nm}}/CMV A_{280\text{ nm}}$ von 1,7 (BRUNT et al., 1997) zur Reinheitskontrolle wurde nur bei dem Isolat 11 mit 1,73 fast erreicht. Ansonsten lag der Quotient $OD_{260/280}$ zwischen 1,5 und 1,8, was aber für die Verwendung der Suspensionen als Inokulum als ausreichend betrachtet wurde, zumal im Elektronenmikroskop keine größeren Verunreinigungen zu entdecken waren

(Bildseite II, Bilder e - g). Zudem zeigten die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Tropfenpräparate nur intakte Viruspartikel. Degenerierte Partikel wurden nicht beobachtet. Mit der Inokulation auf Testpflanzen konnte auch die Infektiosität der gereinigten Virussuspensionen nachgewiesen werden.

3.4.2 Serologische Untersuchungen der gereinigten Isolate

Die serologischen Untersuchungen der gereinigten Virussuspensionen mittels direktem DAS-ELISA und indirektem TAS-ELISA dienten zur Überprüfung der Übereinstimmung zwischen photometrisch gemessener Viruskonzentration und Antikörperreaktion. Zudem konnte durch die Ergebnisse die Funktionalität bzw. Sensitivität der ELISA-Verfahren zum Nachweis der CMV-Isolate in infiziertem Blattmaterial geprüft werden. Bei der Auswertung der Daten wurden die Extinktionswerte der Pufferkontrolle von denen der Proben abgezogen. Auf eine statistische Absicherung konnte verzichtet werden, da zwischen den zwei Messwiederholungen jeder Probe nur eine zu vernachlässigende Differenz auftrat.

Bei dem DAS-Verfahren erwies sich eine Verdünnung der Antikörper von 1:500 bei Beschichtung und Konjugatzugabe als optimale Kombination mit hohem positivem Farbwert und schwacher unspezifischer Reaktion. Die TAS-ELISA zeigten bei einer Verdünnung der monoklonalen Antikörper von 1:50 deutlichere Unterschiede als bei einer Verdünnung von 1:100. Für Beschichtung und Konjugat wurde dabei immer eine Antikörperverdünnung von 1:1000 verwendet. Sowohl bei der Testung der gereinigten Virussuspensionen, als auch bei der Untersuchung virusinfizierter Pflanzenpresssäfte, erbrachten diese Konzentrationen die besten Ergebnisse.

3.4.2.1 Einfluss der Antikörperkonzentration auf die Nachweissicherheit

Der Einfluss der Antikörperkonzentration auf die Farbreaktion in dem DAS-ELISA wurde in Abbildung 30 exemplarisch an den Messergebnissen der gereinigten CMV-Isolate 4 (Untergruppe I) und 11 (Untergruppe II) dargestellt, wobei Isolat 4 die stärkste Farbreaktion zeigte und Isolat 11 zu den Isolaten mit einer schwächeren Reaktion zählte.

Bei einer Antikörperverdünnung von 1:1500 lagen, 120 min nach Substratzugabe, die Messwerte fast aller getesteten Virussuspensionen nur knapp über dem Wert der Pufferkontrolle von 0,018 (Abb. 30, oben). Auch die Suspension von Isolat 4 mit der stärksten Farbreaktion in einer Verdünnung von 0,1 mg Virus/ml, lag mit einem Extinktionswert von 0,167 noch unter dem Richtwert für eine eindeutig positive Reaktion von mindestens $E_{405} = 0,2$ nach KORPRADITSKUL *et al.* (1980). Bei einer Antikörperkonzentration von 1:1000 war das Messergebnis nur noch bei Isolat 11 in der Verdünnung 0,001 mg Virus/ml mit einem Extinktionswert von 0,071 nicht eindeutig positiv. Bei den Suspensionen von Isolat 4 erbrachte die Messung dagegen bei allen Verdünnungsstufen

Werte im mehrfach positiven Bereich, wobei der Messwert der Pufferkontrolle mit 0,015 noch unter dem Wert lag, der bei einer Antikörperkonzentration von 1:1500 auftrat.

Die eindeutig stärkste spezifische Reaktion konnte aber bei einer Antikörperkonzentration von 1:500 erreicht werden. Selbst die schwächste Farbreaktion, bei dem gereinigten CMV-Isolat 11 in einer Verdünnung von 0,001 mg Virus/ml, konnte mit einem Extinktionswert von 0,222 als eindeutig positiv eingestuft werden. Die Messung von Isolat 4 in einer Verdünnung von 0,1 mg Virus/ml, ergab mit einem Wert von 1,609 eine 8fach positive Reaktion, während der Wert der Pufferkontrolle von 0,021 nur knapp über den bei niedrigerer Antikörperkonzentrationen gemessenen Werten und weit unter dem Grenzwert für eine unspezifische Reaktion von $E_{405} = 0,1$ nach KORPRADITSKUL *et al.* (1980) lag.

Die Quotienten der Extinktionswerte aus gereinigten Virussuspensionen und Pufferkontrollen verdeutlichten den Einfluss der Antikörperkonzentration bei Beschichtung und Konjugatzugabe auf die Nachweissicherheit der CMV-Isolate im ELISA (Abb. 30, unten). Während bei einer Antikörperkonzentration von 1:500 die Farbreaktion bei Isolat 4 in der niedrigsten Verdünnung von 0,1 mg Virus/ml das 77 fache der Reaktion der Pufferkontrolle ergab, war der Wert bei einer Antikörperkonzentration von 1:1500 gerade 9 mal höher als die unspezifische Reaktion.

Dabei war eine Zunahme dieses Effektes zu beobachten je niedriger die Viruskonzentration der gemessenen Probe war. Bei einer Konzentration der Antikörper von 1:1500 unterschied sich der Messwert der auf 0,001 mg Virus/ml verdünnten Suspension von Isolat 4 nicht von dem der Pufferkontrolle, während dieser bei der höchsten Antikörperkonzentration 58 mal so hoch war. Auch bei Isolat 11 ergab sich in allen Verdünnungsstufen ein Erhöhung der Nachweissicherheit mit zunehmender Konzentration der Antikörper bei Beschichtung und Konjugatzugabe. Allerdings betrug hier die stärkste Farbreaktion in der Verdünnungsstufe 0,1 mg Virus/ml nur das 28fache der Pufferkontrolle und somit wesentlich weniger als bei Isolat 4 in der gleichen Konzentration.

3.4.2.2 Antikörperreaktion der gereinigten Virussuspensionen

Alle CMV-Isolate waren im DAS-ELISA 120 min nach Substratzugabe auch noch in einer Verdünnung von 0,001 mg Virus/ml deutlich nachzuweisen, doch zeigten die Isolate der Untergruppe II häufig eine etwas schwächere Reaktion als die Isolate der Untergruppe I (Abb. 31). In einer Verdünnung von 0,1 mg Virus/ml wurden bei den Isolaten der Untergruppe I Extinktionswerte von 1,2 (Isolat 1) bis 1,6 (Isolat 4) gemessen, während sich in der Untergruppe II nur Werte zwischen 0,5 (Isolat 5) und 0,8 (Isolat 2) ergaben. Auch bei den Verdünnungsstufen 0,01 und 0,001 mg/ml, lagen die Extinktionswerte der Isolate aus der Untergruppe I immer deutlich über denen der Untergruppe II. In allen durchgeführten DAS-ELISAs zeigte das Isolat 1 innerhalb der Untergruppe I die schwächste, das Isolat 2 innerhalb der Untergruppe II die stärkste

Farbreaktion. Insgesamt traten somit bei diesem Verfahren bezüglich der Antikörperreaktion deutliche Unterschiede zwischen den CMV-Isolaten auf. Gut zu erkennen war die Abnahme der Extinktionswerte mit abnehmender Viruskonzentration der Suspensionen.

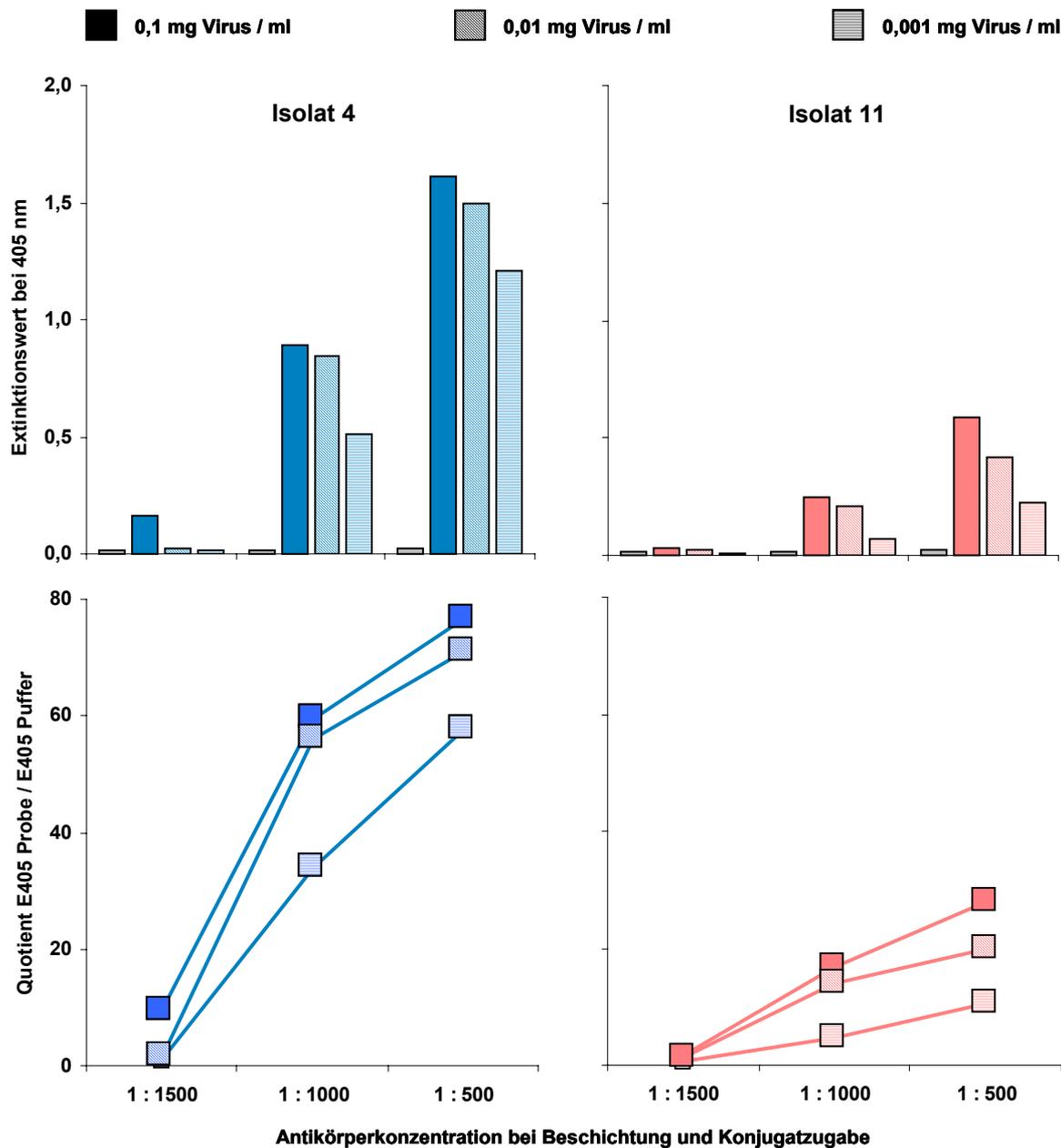


Abb. 30: Einfluss der Antikörperkonzentration (1:1500, 1:1000, 1:500) bei Beschichtung und Konjugatzugabe eines DAS-ELISA auf die Farbreaktion gereinigter Virussuspensionen der CMV-Isolate 4 (Untergruppe I, blau) und 11 (Untergruppe II, rot), in den Konzentrationen 0,1, 0,01 und 0,001 mg Virus/ml (Messung 120 min nach Substratzugabe bei 405 nm; Oben: Extinktionswerte der Virussuspensionen sowie der Pufferkontrolle (grau); Unten: Extinktionswerte der Virussuspensionen in Relation zur Pufferkontrolle).

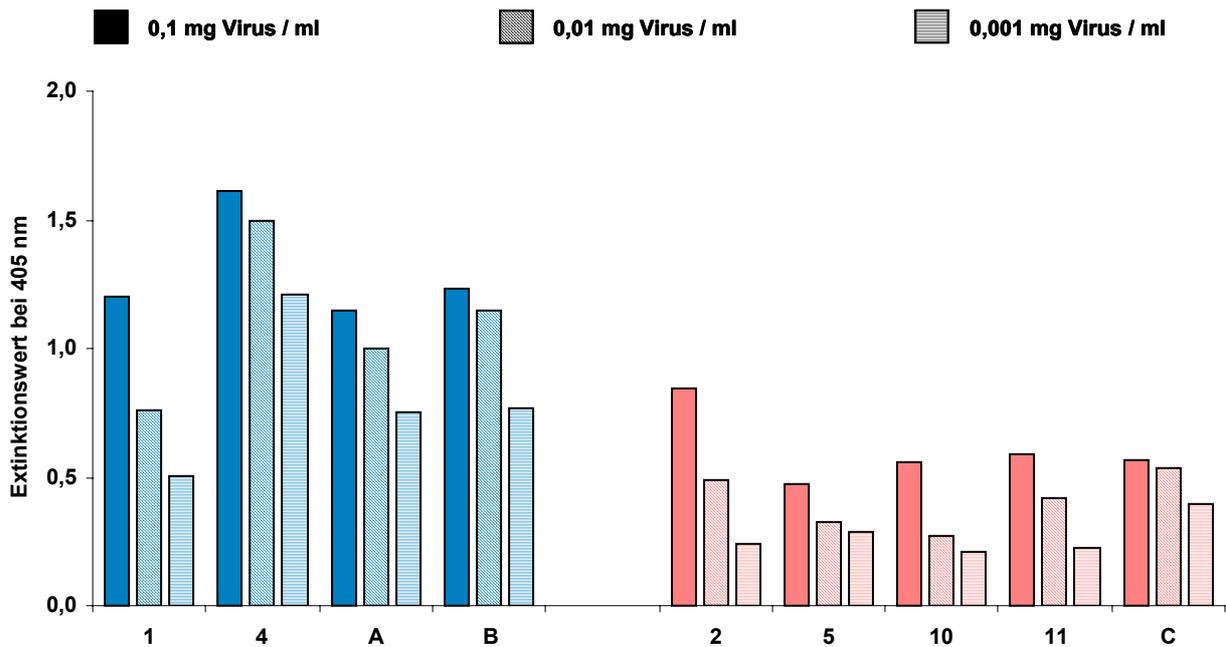


Abb. 31: DAS-ELISA-Extinktionswerte von gereinigten Virussuspensionen der CMV-Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau) und II: 2, 5, 10, 11, C (rot) in den Konzentrationen 0,1, 0,01 und 0,001 mg Virus/ml (Werte der Pufferkontrolle wurden abgezogen; Antikörperkonzentration 1:500 für Beschichtung und Konjugat; Messung 120 min nach Substratzugabe bei 405 nm).

Mittels TAS-ELISA wurden in einer Konzentration von 0,1 mg Virus/ml für alle Isolate, 120 min nach Substratzugabe, Extinktionswerte von 2,8 bis 2,9 gemessen und der Quotient aus den Messwerten der Virussuspensionen und denen der Pufferkontrolle lag in einem Bereich von 48 bis 50 (Abb. 32). Die Extinktionswerte der auf 0,01 mg Virus/ml verdünnten Isolate waren allerdings zu diesem Messzeitpunkt auch schon extrem hoch. Die Werte lagen mit Ausnahme der Isolate 2 und 10 über 2,5 und unterschieden sich teilweise nur unwesentlich von denen der höher konzentrierten Virussuspensionen. In einer Verdünnung von 0,001 mg Virus/ml wurden bei den Isolaten 4, A und B noch Extinktionswerte über 2,0 gemessen. Bei den anderen Isolaten lagen die Werte in einem Bereich von 1,3 bis 1,7 und waren somit höher als die im DAS-ELISA bei gleicher Inkubationsdauer gemessenen Werte für die auf 0,1 mg Virus/ml verdünnten Virussuspensionen.

Auffällig war die sehr schnelle Entwicklung der Gelbfärbung mit hohen Extinktionswerten der Virussuspensionen im Vergleich zum DAS-ELISA. Nach 10 min konnten bereits Werte über 2,0 und nach 15 min Werte über 2,5, gemessen werden. Aber auch der Extinktionswert der Pufferkontrolle betrug nach 10 min schon 0,024 und 120 min nach Substratzugabe 0,058 und somit das Doppelte des zum gleichen Zeitpunkt in dem DAS-ELISA gemessenen Werte.

Die je nach Isolat und Verdünnungsstufe teilweise recht unterschiedliche Geschwindigkeit der Substratumsetzung konnte durch Bildung der Mittelwerte aus allen Messzeitpunkten berücksichtigt werden (Abb. 33). Dabei zeigte sich wieder eine deutlich stärkere Reaktion der Isolate der Untergruppe I, insbesondere der CMV-Isolate 4, A und B. Während in der Verdünnungsstufe 0,1 mg Virus/ml die mittleren Extinktionswerte der Isolate aus der Untergruppe I in einem Bereich von 2,4 bis 2,8 lagen, ergaben sich bei den Isolaten der Untergruppe II Werte von 1,6 bis 2,2. Das gleiche traf auf die Messergebnisse bei niedrigerer Viruskonzentration zu, wobei die spezifische Reaktion von Isolat 1, wie in dem DAS-ELISA, in den Verdünnungen 0,01 und 0,001 mg Virus/ml eher in den Reaktionsbereich der Untergruppe II einzuordnen war. Innerhalb dieser Gruppierungen waren die Übereinstimmungen mit einer durchschnittlichen maximalen Abweichung von 0,3 sehr groß. Des weiteren zeigten die gemittelten Messwerte bei allen Isolaten eine deutliche Abnahme der Extinktionswerte mit zunehmender Verdünnung der Virussuspensionen.

Insgesamt ergaben die Ergebnisse des TAS-ELISA im Vergleich zu dem DAS-Verfahren eine wesentlich bessere Übereinstimmung zwischen der photometrisch gemessenen Viruskonzentration und der Antikörperreaktion bei den gereinigten CMV-Isolaten. Unter Berücksichtigung der Reaktionsgeschwindigkeit konnte auch eine gute Abstufung der unterschiedlichen Virusverdünnungen erkannt werden.

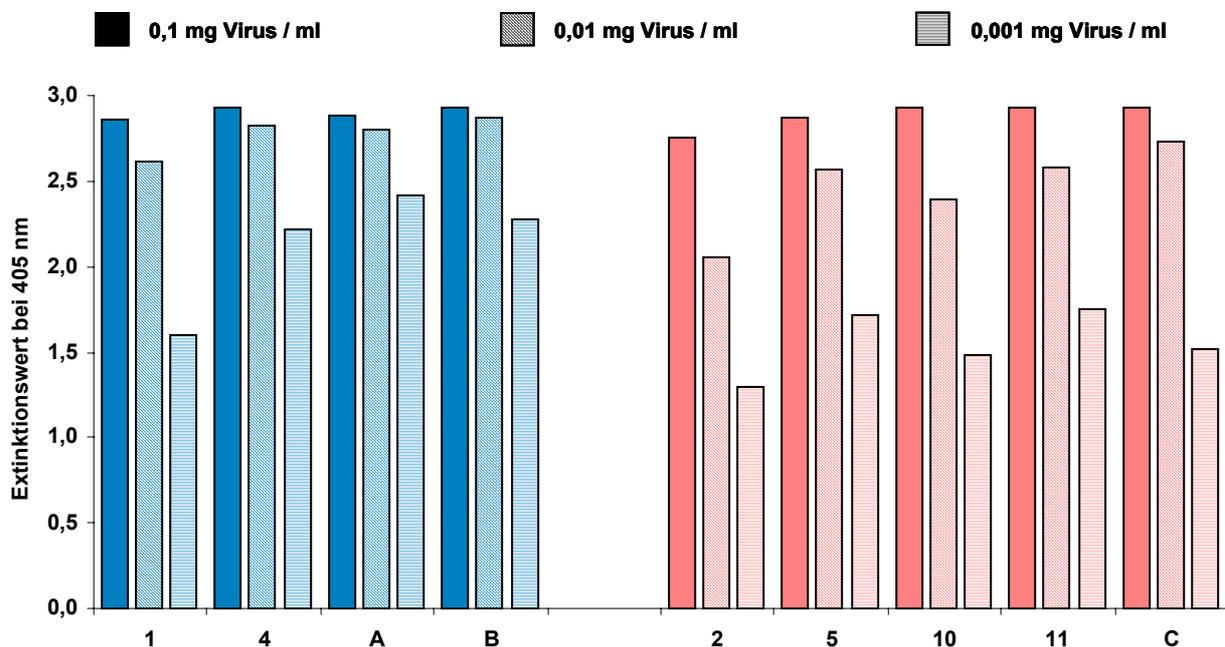


Abb. 32: TAS-ELISA-Extinktionswerte von gereinigten Virussuspensionen der CMV-Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau) und II: 2, 5, 10, 11, C (rot) in den Konzentrationen 0,1, 0,01 und 0,001 mg Virus/ml (Werte der Pufferkontrolle wurden abgezogen; Antikörperkonzentration 1:1000 für Beschichtung und Konjugat, monoklonale Antikörper 1:50; Messung 120 min nach Substratzugabe bei 405 nm).

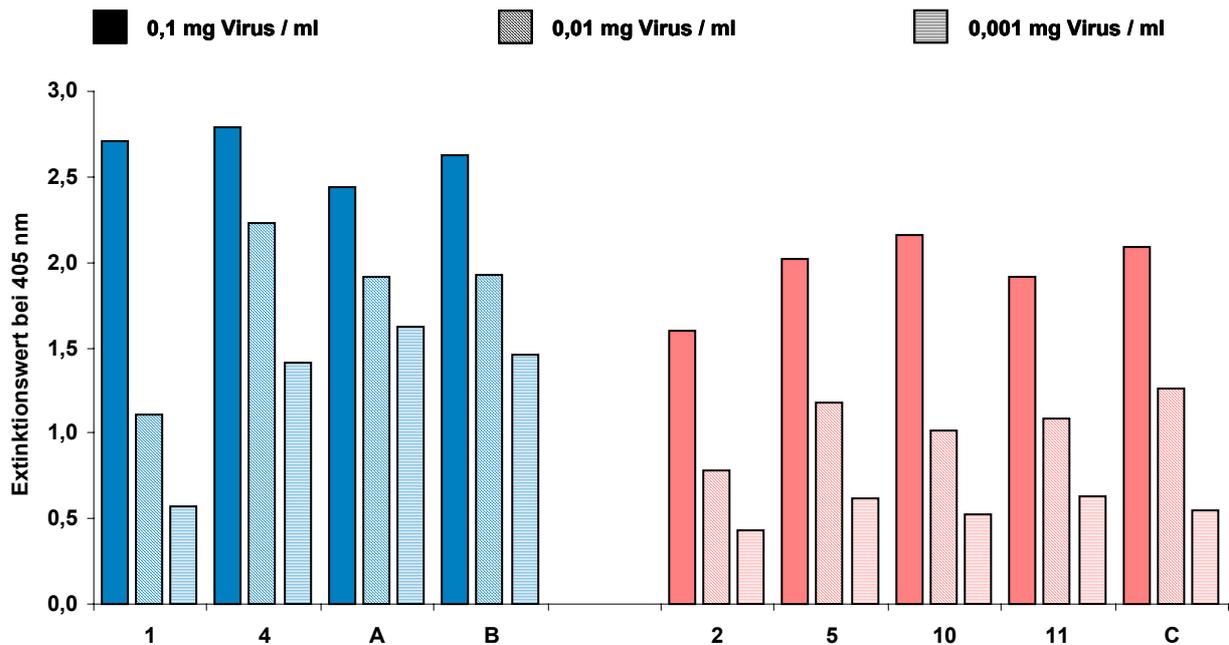


Abb. 33: TAS-ELISA-Extinktionswerte von gereinigten Virussuspensionen der CMV-Isolate der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau) und II: 2, 5, 10, 11, C (rot) in den Konzentrationen 0,1, 0,01 und 0,001 mg Virus/ml (Werte der Pufferkontrolle wurden abgezogen; Antikörperkonzentration 1:1000 für Beschichtung und Konjugat, monoklonale Antikörper 1:50; mittlere Extinktionswerte aus den Messungen 10, 15, 30, 45, 60 und 120 min nach Substratzugabe bei 405 nm).

3.4.3 Einfluss der Wirtspflanze auf die Virusvermehrung

Die Pflanzenpresssäfte der mit den CMV-Isolaten inokulierten Versuchspflanzen, wurden getestet, um den Einfluss der Wirtspflanzen auf die Vermehrung der CMV-Isolate bzw. den Zusammenhang zwischen Befall und Ausmaß der Wirtspflanzenbeeinträchtigung zu untersuchen. Bei den Pflanzen, die nach Inokulation mit den CMV-Isolaten keinerlei sichtbare Veränderungen zeigten, war zu überprüfen, ob eine Virusinfektion stattgefunden hatte. Bei der Auswertung der Daten wurden die Extinktionswerte der Negativkontrolle von denen der Proben abgezogen.

Obwohl sich in den Untersuchungen der gereinigten Virussuspensionen das TAS-Verfahren als sensibler herausgestellt hatte, wurde wegen der großen Mengen gleichzeitig zu testender Pflanzenproben in den meisten Fällen der DAS-ELISA durchgeführt. Neben der Einsparung eines Arbeitsschrittes reduzierte sich auch der Verbrauch an Antiserum. Des weiteren wurde zur Begrenzung des Probenumfangs in der Regel nicht jede Pflanze einzeln getestet, sondern eine Mischprobe aller Versuchspflanzen einer Variante zusammen gestellt. Da zwischen den Messwiederholungen der Mischproben nur unwesentliche Differenzen auftraten, konnte auf eine statistische Auswertung verzichtet werden.

Bei den Versuchen mit Gurkenpflanzen wurde der TAS-ELISA angewendet. Um den Einfluss von Isolat und Inokulumdichte auf den Infektionserfolg bzw. die Befallshäufigkeit zu untersuchen, wurden in diesem Fall die vier Pflanzen einer Variante jeweils einzeln beprobt und getestet. Dabei war zu bedenken, dass immer nur ein kleiner Teil der Pflanze beprobt wurde und dass die Probenahme bei Pflanzen mit undeutlichen oder keinen Symptomen nicht gezielt stattfinden konnte, womit ein Rückschluss auf den tatsächlichen Virusgehalt der gesamten Pflanze aufgrund der ELISA-Messwerte nicht möglich war. Das führte auch zu teilweise extrem großen Unterschieden der Messwerte innerhalb einer Versuchsvariante. So konnte z.B. der Extinktionswert einer Probe das 12fache des Wertes der Negativkontrolle betragen, während die Messwerte einer anderen Probe der gleichen Variante sich nicht von denen nicht inokulierter Pflanzen unterschied. Aus diesem Grund wurde hier ebenfalls auf eine statistische Verarbeitung der Daten verzichtet.

3.4.3.1 *Nicotiana*-Arten

Von *N. rustica*, *N. tabacum* „Samsun-NN“ und *N. glutinosa* wurden 14 Tage nach Inokulation mit 0,1 mg Virus/ml Mischproben genommen und mittels DAS-ELISA auf ihren Virusgehalt überprüft. Bei allen inokulierten *N. rustica*-Pflanzen war 5 h nach Substratzugabe eine deutliche positive Reaktion festzustellen bzw. lagen die Extinktionswerte der Proben mindestens über dem doppeltem Wert der Negativkontrolle von 0,4 (Abb. 34 und 35). Dabei lagen die Extinktionswerte bei den Isolaten der Untergruppe I, mit dem 4fachen (Isolat B) bis 7fachen (Isolat 1) der Negativkontrolle, über denen der Untergruppe II. Aber auch bei den mit den Isolaten 2 und 10 inokulierten Pflanzen betragen die Messwerte noch das 3fache der Negativkontrolle. Die schwächste Reaktion zeigten die Varianten mit den Isolaten 5, 11 und C. Damit konnte insgesamt eine gute Übereinstimmung zwischen serologisch gemessenem Virusgehalt und Stärke der auftretenden Symptome festgestellt werden (siehe Kap. 3.3.1).

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei *N. tabacum* „Samsun-NN“ (Abb. 34). Bei einer relativ schwachen unspezifischen Reaktion von 0,2, betragen die Extinktionswerte nach Inokulation mit den Isolaten A, 1, und 4 das 9 bis 6 fache der Negativkontrolle. Die Werte der mit den Isolaten B und 2 inokulierten Pflanzen waren 3 mal, in den Varianten mit den Isolaten 5, 10, 11, und C noch 2,5 mal so hoch wie bei der Negativkontrolle.

Obwohl alle Isolate mit Ausnahme von Isolat C an den betroffenen Pflanzen starke Symptome hervorriefen (siehe Kap. 3.3.1), ergaben die serologischen Untersuchungen der Proben von *N. glutinosa* insbesondere bei den Isolaten der Untergruppe II relativ niedrige Virusgehalte (Abb. 35). Die mit den Isolaten 1 und 4 inokulierten Pflanzen zeigten mit Extinktionswerten über dem 3fachen der Negativkontrolle die stärkste Reaktion, wobei die unspezifische Reaktion mit einem Wert von 0,7 sehr hoch war. Bei den Isolaten A, B, 2, 10 und 11 waren die Messwerte noch als eindeutig positiv zu werten, während die Extinktionswerte der mit den Isolaten C und 5 inokulierten Pflanzen nicht bzw. nur minimal über denen der Negativkontrolle lagen.

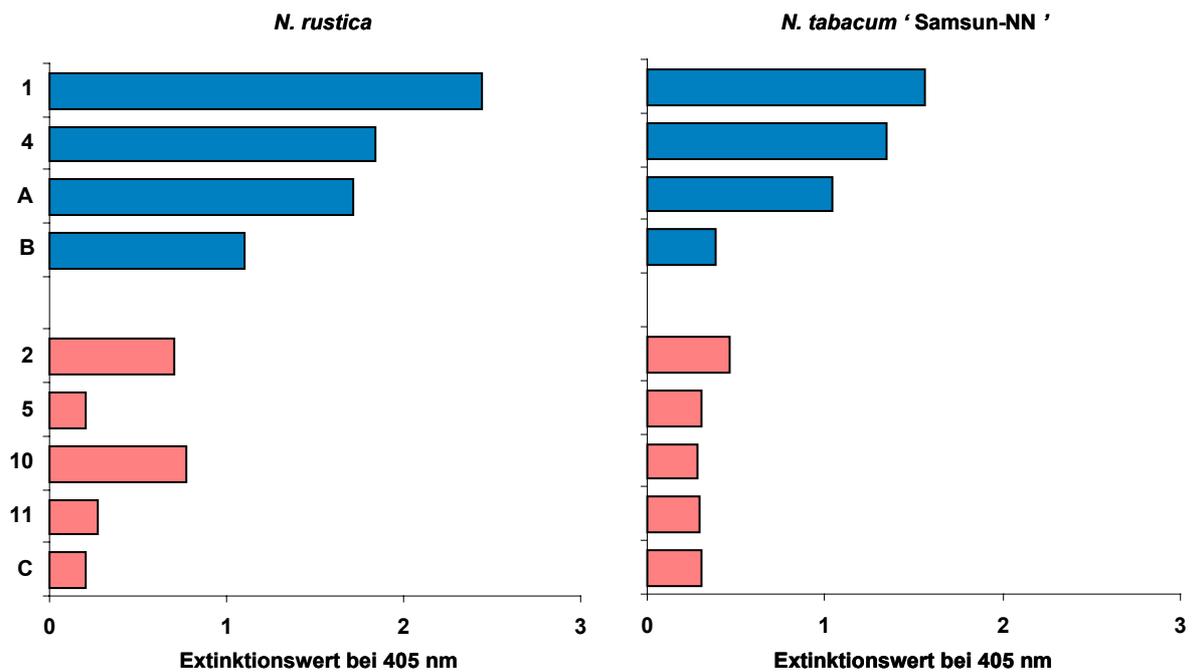


Abb. 34: DAS-ELISA-Extinktionswerte von *N. rustica* und *N. tabacum* „Samsun-NN“ 14 Tage nach Inokulation mit CMV-Isolaten der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau) und II: 2, 5, 10, 11, C (rot) (inokuliert mit 0,1 mg Virus/ml; Werte der Negativkontrollen wurden abgezogen; Antikörperkonzentration 1:500 für Beschichtung und Konjugat; Messung 5 h nach Substratzugabe bei 405 nm).

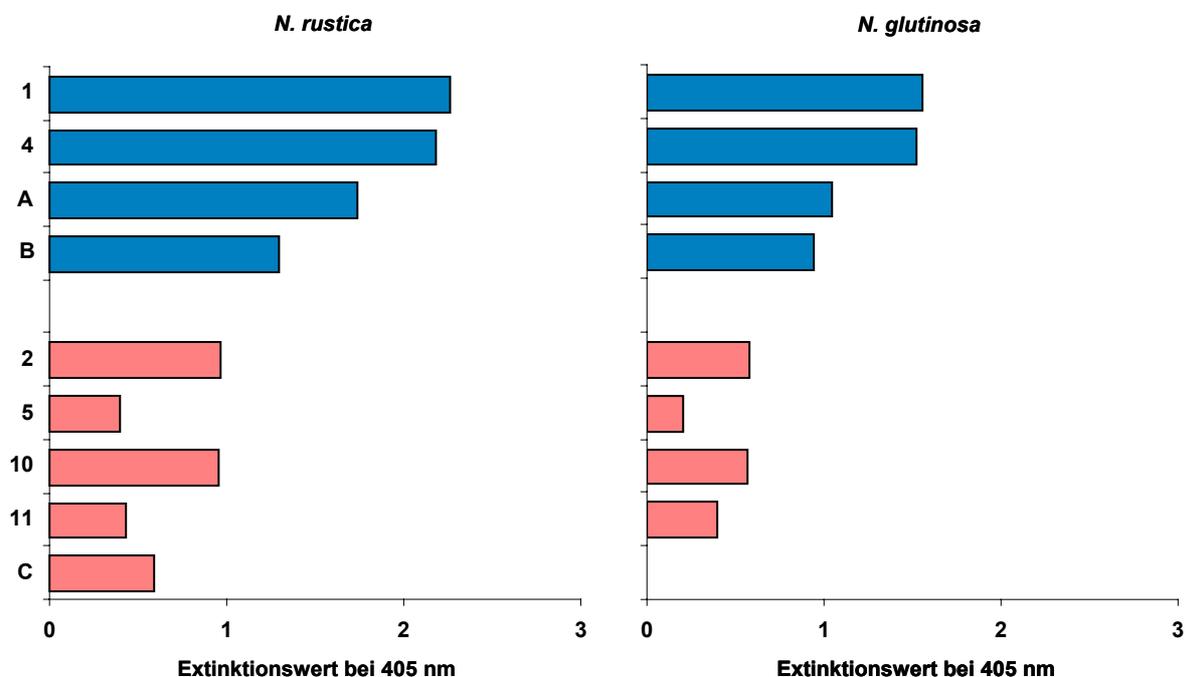


Abb. 35: DAS-ELISA-Extinktionswerte von *N. rustica* und *N. glutinosa* 14 Tage nach Inokulation mit CMV-Isolaten der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau) und II: 2, 5, 10, 11, C (rot) (inokuliert mit 0,1 mg Virus/ml; Werte der Negativkontrolle wurden abgezogen; Antikörperkonzentration 1:500 für Beschichtung und Konjugat; Messung 5 h nach Substratzugabe bei 405 nm).

3.4.3.2 Tomatenpflanzen

Von den Tomatenpflanzen wurden 19 Tage nach Inokulation mit 0,1, 0,001 und 0,0001 mg Virus/ml Mischproben genommen und im Vergleich mit Blattproben nicht inokulierter Pflanzen im DAS-ELISA auf ihren Virusgehalt geprüft. Bei Inokulation mit 0,1 mg Virus/ml war der Virusnachweis, 5 h nach Substratzugabe, in allen Varianten eindeutig positiv (Abb. 36). Dabei lagen die Extinktionswerte bei den Isolaten der Untergruppe I mit 2,0 (Isolat 1) bis 2,6 (Isolat B) wiederum über denen der Untergruppe II mit Werten von 1,4 (Isolat 5) bis 1,8 (Isolat 2). Die unspezifischen Reaktionen waren mit 0,7 relativ hoch. Bei den mit 0,001 mg Virus/ml inokulierten Pflanzen wurde gegenüber der höheren Inokulumdichte keine wesentliche Verringerung der Messwerte festgestellt.

Ein Zusammenhang dieser Ergebnisse mit der im Vorfeld beobachteten Wirtspflanzenbeeinträchtigung durch die CMV-Isolate (siehe Kap. 3.2.2) war nicht festzustellen. Obwohl nach Inokulation mit den Isolat 1 und 2 nur schwache Symptome an den Tomatenpflanzen auftraten, wurden bei den mit diesen Isolat inokulierten Pflanzen höhere Extinktionswerte gemessen als bei den Isolat 10, 11 und C, welche äußerst schwere Symptome verursachten. Die Extinktionswerte der mit 0,0001 mg Virus/ml der Isolat 4, B und 11 inokulierten Pflanzen waren fast so hoch wie bei den mit höheren Viruskonzentrationen inokulierten Pflanzen, obwohl bei dieser Inokulumdichte kein Einfluss der CMV-Isolate auf die Tomatenpflanzen mehr festzustellen war.

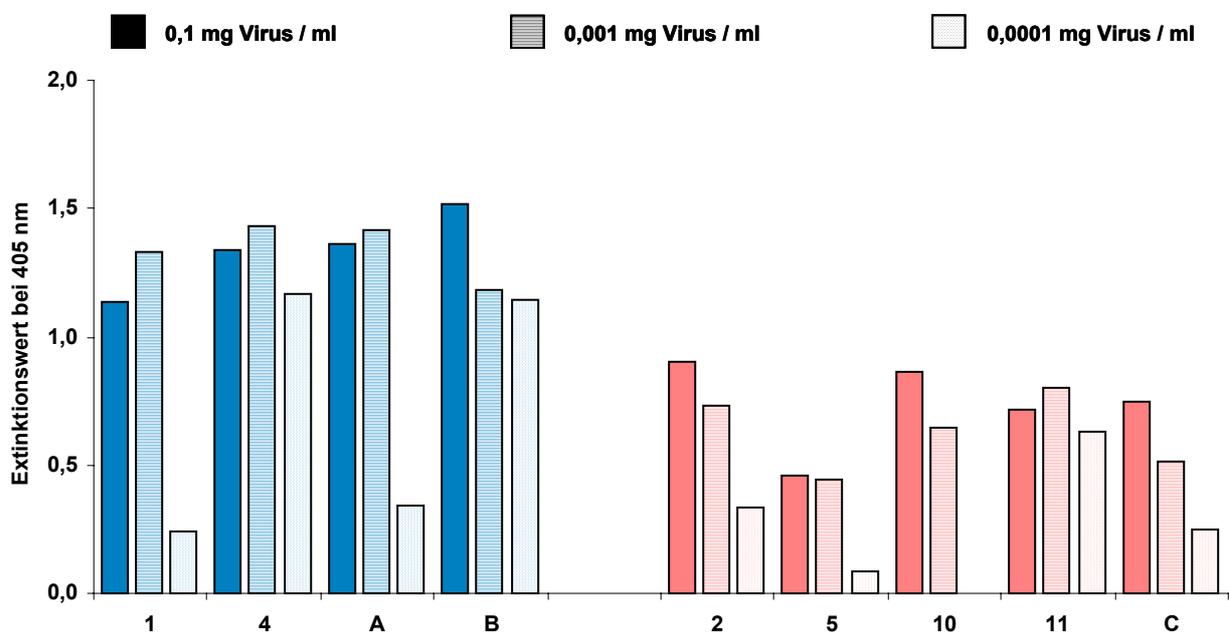


Abb. 36: DAS-ELISA-Extinktionswerte von Tomatenpflanzen 19 Tage nach Inokulation mit den CMV-Isolat der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau) und II: 2, 5, 10, 11, C (rot) (inokuliert mit 0,1, 0,001 und 0,0001 mg Virus/ml; Werte der Negativkontrolle wurden abgezogen; Antikörperkonzentration 1:500 für Beschichtung und Konjugat; Messung 5 h nach Substratzugabe bei 405 nm).

3.4.3.3 Paprikapflanzen

Bei den Paprikapflanzen wurden 40 und 80 Tage nach Inokulation mit 0,1, 0,001, 0,0001 und 0,00001 mg Virus/ml Mischproben genommen und mittels DAS-ELISA getestet. Um einen eventuellen Einfluss der Nährstoffversorgung auf die Virusreplikation zu prüfen, wurden Proben von unterschiedlich stark gedüngten Versuchspflanzen untersucht.

Mit Ausnahme der mit 0,1 mg Virus/ml des Isolates 2 inokulierten Pflanzen, deren Extinktionswerte noch fast dem 3fachen Wert der Negativkontrolle entsprachen, wurden bei den mit den Isolaten der Untergruppe II inokulierten Pflanzen nur schwach positive Reaktionen festgestellt (Abb. 37). Bei den mit 0,1 mg Virus/ml der Isolate 1, 4, A, B und 2 inokulierten Pflanzen ergaben sich in allen Tests eindeutig positive Reaktionen, wobei die stärkste Antikörperreaktion mit Werten über dem 5fachen der Negativkontrolle bei den Isolaten 1, 4 und A zu verzeichnen war, während die Extinktionswerte der mit Isolat B inokulierten Pflanzen nur geringfügig über denen von Isolat 2 lagen.

Bei den mit 0,001 und 0,0001 mg Virus/ml inokulierten Paprikapflanzen wurden nur noch bei den Varianten mit Isolaten der Untergruppe I eindeutig positive Reaktionen nachgewiesen, mit Extinktionswerten die doppelt (Isolate 1, 4 und B) bis fast 4mal (Isolat A) so hoch waren wie die der Negativkontrolle. Dabei war kein Unterschied zwischen den beiden Inokulumdichten festzustellen. Bei den Isolaten 4 und A wurden sogar noch eindeutige positive Reaktionen bei den mit 0,00001 mg Virus/ml inokulierten Pflanzen gemessen, obwohl bei dieser Inokulumdichte keines der Isolate mehr einen Einfluss auf die Wirtspflanzenentwicklung zeigte.

Abgesehen von den in Relation zu den Symptomen hohen Extinktionswerten der mit Isolat 2 inokulierten Paprikapflanzen, zeigte sich eine Übereinstimmung zwischen den mittels ELISA-Extinktionswerten der Pflanzenproben und der Schädigung der Wirtspflanzen durch die CMV-Isolate (siehe Kap. 3.3.3). Ferner wurde nachgewiesen, dass, trotz ausbleibender Wirtspflanzenreaktionen, nach Inokulation mit den Isolaten 5, 10, 11 und C zu mindestens bei einer Inokulumdichte von 0,1 mg Virus/ml durchaus eine Infektion vorgelegen hat.

Ein Einfluss der Nährstoffversorgung auf die Virusreplikation konnte nicht festgestellt (Abb. 38). Alle getesteten Isolate zeigten eine eindeutig positive Reaktion und die Messwerte der mit 4 g Plantosan/l Substrat gedüngten Versuchspflanzen lagen in der Regel nur knapp unter oder über denen der mit 2 g Plantosan/l Substrat gedüngten Pflanzen. Auch wenn in den hier dargestellten Graphiken die Werte 80 Tage nach Inokulation (Abb. 38) etwas höher liegen als 40 Tage nach Inokulation (Abb. 37), konnten insgesamt keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der gemessenen Virusgehalte zwischen diesen beiden Probeterminen festgestellt werden.

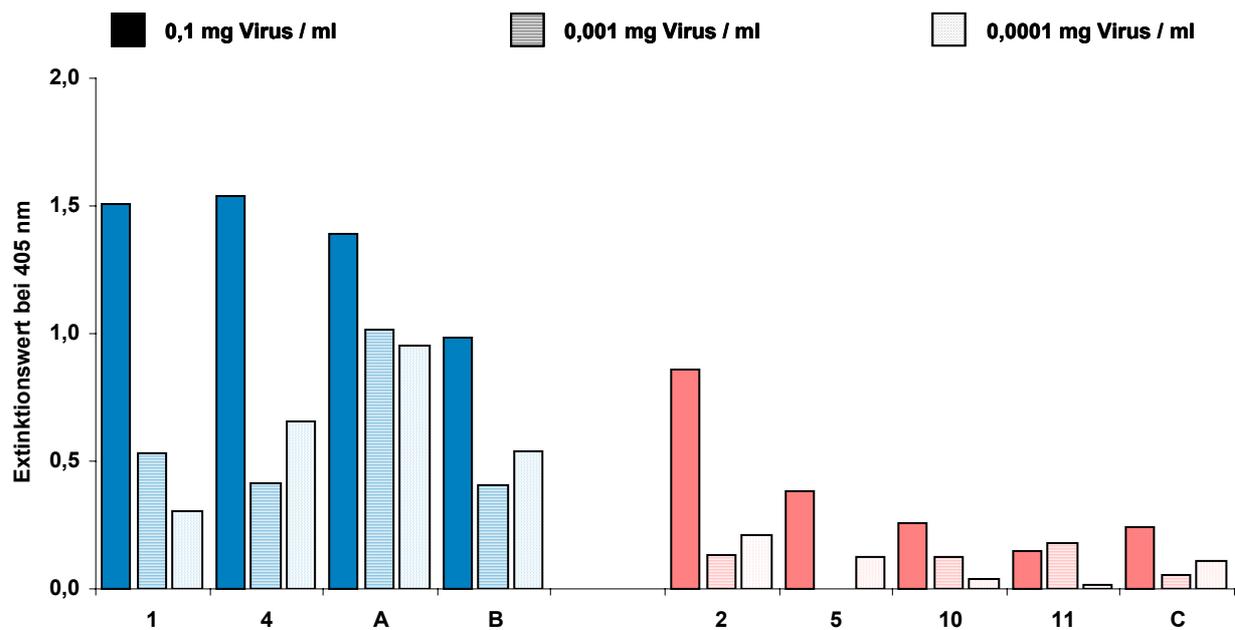


Abb. 37: DAS-ELISA-Extinktionswerte von Paprikapflanzen 40 Tage nach Inokulation mit den CMV-Isolaten der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau) und II: 2, 5, 10, 11, C (rot) (inokuliert mit 0,1, 0,001 und 0,0001 mg Virus/ml; Werte der Negativkontrolle wurden abgezogen; Antikörperkonzentration 1:500 für Beschichtung und Konjugat; Messung 5 h nach Substratzugabe bei 405 nm).

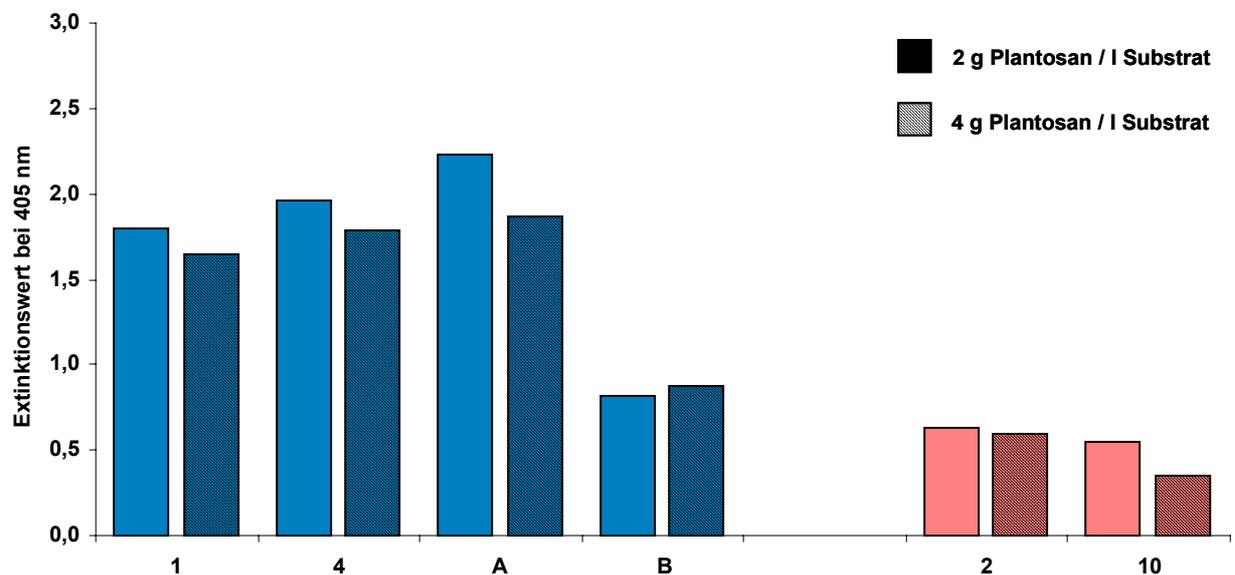


Abb. 38: Einfluss der Nährstoffversorgung auf die DAS-ELISA-Extinktionswerte von Paprikapflanzen 80 Tage nach Inokulation mit CMV-Isolaten der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau) und II: 2, 10 (rot) (inokuliert mit 0,1 mg Virus/ml, Düngung mit 2 und 4g Plantosan/l Substrat; Werte der Negativkontrolle wurden abgezogen; Antikörperkonzentration 1:500 für Beschichtung und Konjugat; Messung 5 h nach Substratzugabe bei 405 nm).

3.4.3.4 Gurkenpflanzen

Zur Untersuchung des Einflusses von Isolat und Inokulumdichte auf Befallsstärke und –häufigkeit wurde 16 Tage nach Inokulation jede Gurkenpflanze einzeln beprobt und mittels TAS-ELISA auf ihren Virusgehalt geprüft. Bei der CMV-empfindlichen Sorte „Vorgebirgstraube“, die insbesondere nach Inokulation mit den Isolaten A, B, 5, 10 und 11 deutliche Symptome entwickelte, wurden die mit 0,1, 0,01, 0,001 und 0,0001 mg Virus/ml inokulierten Pflanzen getestet. Von der CMV-toleranten Sorte „Othello“, die nur eine schwache Reaktion auf die CMV-Isolate A, B, 5 und 11 zeigte, wurden nur die mit 0,1 mg Virus/ml inokulierten Pflanzen untersucht.

Bei der Sorte „Vorgebirgstraube“ (Abb. 39) zeigten die mit den Isolaten A und B inokulierten Pflanzen stets die eindeutig stärkste Antikörperreaktion und bei einer Inokulumdichte von 0,1 mg Virus/ml lagen, 120 min nach Substratzugabe, die Extinktionswerte aller Proben über 2,5 bzw. dem 12fachen Wert der Negativkontrolle. Während die Messwerte der mit Isolat A inokulierten Pflanzen bei einer Inokulumdichte von 0,01 und teilweise sogar von 0,001 mg Virus/ml genauso hoch waren, traten bei Isolat B schon ab einer Inokulumdichte von 0,01 mg Virus/ml vermehrt Proben mit deutlich geringeren Extinktionswerten auf. Trotz schwacher Symptome wurden bei den mit 0,1 mg Virus/ml der Isolate 1 und 4 inokulierten Versuchspflanzen relativ hohe Extinktionswerte gemessen, die 7 - 8 mal höher lagen als die Werte der Negativkontrolle. Aber schon bei einer Inokulumdichte von 0,01 mg Virus/ml traten nur noch vereinzelt Proben auf, bei denen Virus nachzuweisen war.

Die mit den Isolaten 5, 10 und 11 der Untergruppe II inokulierten Pflanzen zeigten bei Inokulumdichten von 0,1, 0,01 und 0,001 mg Virus/ml, eindeutig positive Testergebnisse, mit Werten, die dem 4 – 8 fachen der Negativkontrolle entsprachen. Dabei lagen die Extinktionswerte der einzelnen Proben auch bei einer Inokulumdichte von 0,1 mg Virus/ml selten über 2,0. In den Varianten mit den Isolaten 2 und C der Untergruppe II traten nach Inokulation mit 0,1 und 0,01 mg Virus/ml noch vereinzelt Proben auf, die mit Werten über dem 2 bis 3fachen der Negativkontrolle als eindeutig positiv zu bewerten waren. Bei geringeren Inokulumdichten trat kein Unterschied zu nicht inokulierten Pflanzen mehr auf.

Bei einer Inokulumdichte von 0,0001 mg Virus/ml konnten nur noch bei den mit den Isolaten A, B, 5, 10 und 11 inokulierten Pflanzen ein positiver Virusnachweis erbracht werden. Die Analyse der Einzelmesswerte zeigte, dass bei dem Isolat A erst bei einer Inokulumdichte von 0,0001 mg Virus/ml, bei den Isolaten B, 5, 10, 11 bei einer Inokulumdichte von 0,001 mg Virus/ml und bei den Isolaten 1, 4, 2 und C schon bei einer Inokulumdichte von 0,1 mg Virus/ml, Proben vorkamen, deren Extinktionswerte sich nicht von denen der Negativkontrolle unterschieden.

Während bei den mit dem Isolat A inokulierten Pflanzen teilweise noch bis zu einer Inokulumdichte von 0,001 mg Virus/ml, Werte über dem 12fachen der Negativkontrolle gemessen wurden, nahm in der Regel mit abnehmender Inokulumdichte auch die Höhe

der Extinktionswerte der einzelnen Proben ab. Somit konnte bei Gurkenpflanzen der Sorte „Vorgebirgsstraube“ ein Einfluss von CMV-Isolat und Inokulumdichte sowohl auf die Anzahl positiver Proben pro Variante als auch auf die Höhe der Extinktionswerte der einzelnen Proben festgestellt werden.

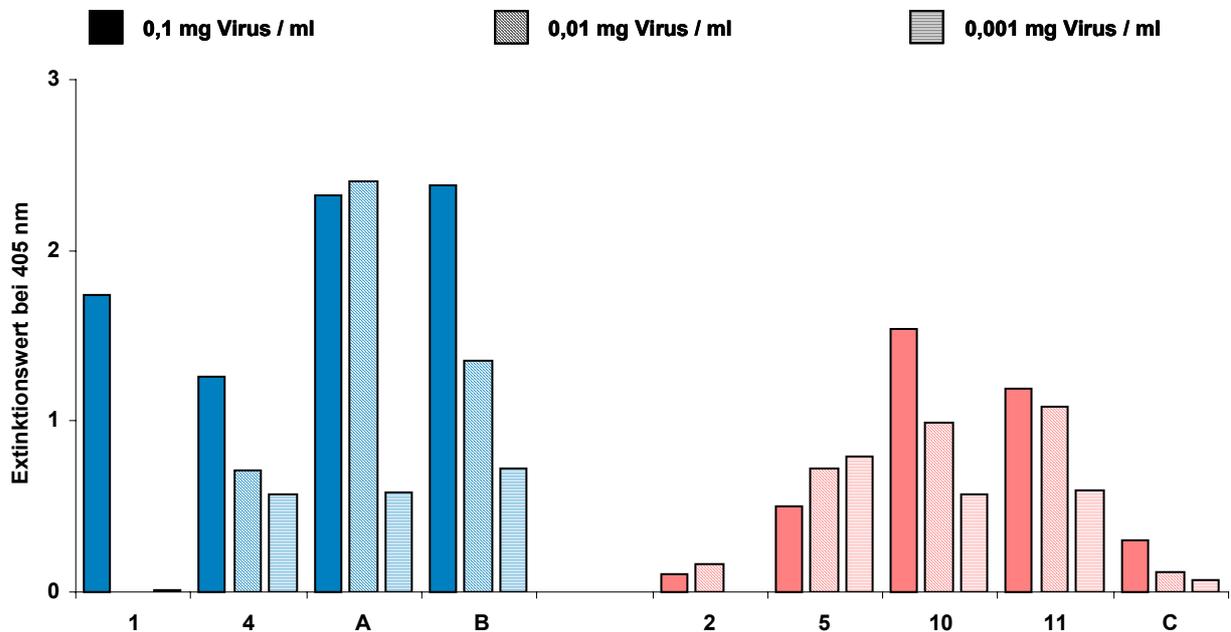


Abb. 39: TAS-ELISA-Extinktionswerte von Gurkenpflanzen der Sorte „Vorgebirgsstraube“ 16 Tage nach Inokulation mit CMV-Isolaten der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau) und II: 2, 5, 10, 11, C (rot) (inokuliert mit 0,1, 0,01, 0,001 und 0,0001 mg Virus/ml; Werte der Negativkontrolle wurden abgezogen; Antikörperkonzentration 1:1000 für Beschichtung und Konjugat, monoklonale Antikörper 1:50; Messung 120 min nach Substratzugabe bei 405 nm).

Die Pflanzenproben der Sorte „Othello“ (Abb. 40) zeigten nach Inokulation mit den Isolaten 1, A und B die stärkste Antikörperreaktion. Nach Inokulation mit den Isolaten A und B wurde bei allen Pflanzen Extinktionswerte über 2,5 bzw. dem 12fachen Wert der Negativkontrolle gemessen. Von den mit dem Isolat 1 inokulierten Pflanzen traf auf drei Pflanzen das gleiche zu, während eine der Pflanzenproben keine positive Reaktion zeigte. Bei Isolat 5 waren drei Pflanzen, bei Isolat 10 nur noch eine Pflanze mit dem doppelten Messwert der Negativkontrolle eindeutig positiv. Während bei Isolat C zwei Pflanzen mit dem 1,6 - 1,8fachen der Negativkontrolle eine schwach positive Reaktion zeigten, konnte bei keiner der mit den Isolaten 2, 4 und 11 inokulierten Pflanzen ein Unterschied zur Negativkontrolle festgestellt werden.

Abgesehen von den relativ hohen Extinktionswerten der mit 0,1 mg Virus/ml der Isolate 1 und 4 inokulierten Pflanzen konnte bei der Sorte „Vorgebirgsstraube“ eine gewisse Übereinstimmung mit den Ergebnissen Symptomauswertung festgestellt werden (siehe Kap. 3.3.4). Bei den mit 0,1 mg Virus/ml des Isolates 1 inokulierten Pflanzen der Sorte

„Othello“ wurden hohe Extinktionswerte gemessen, obwohl an den Pflanzen keine Symptome auftraten. In den Varianten mit den Isolaten A und B waren die Messwerte, trotz vergleichsweise milder Symptome, ähnlich hoch wie bei den entsprechenden Pflanzenproben der Sorte „Vorgebirgstraupe“.

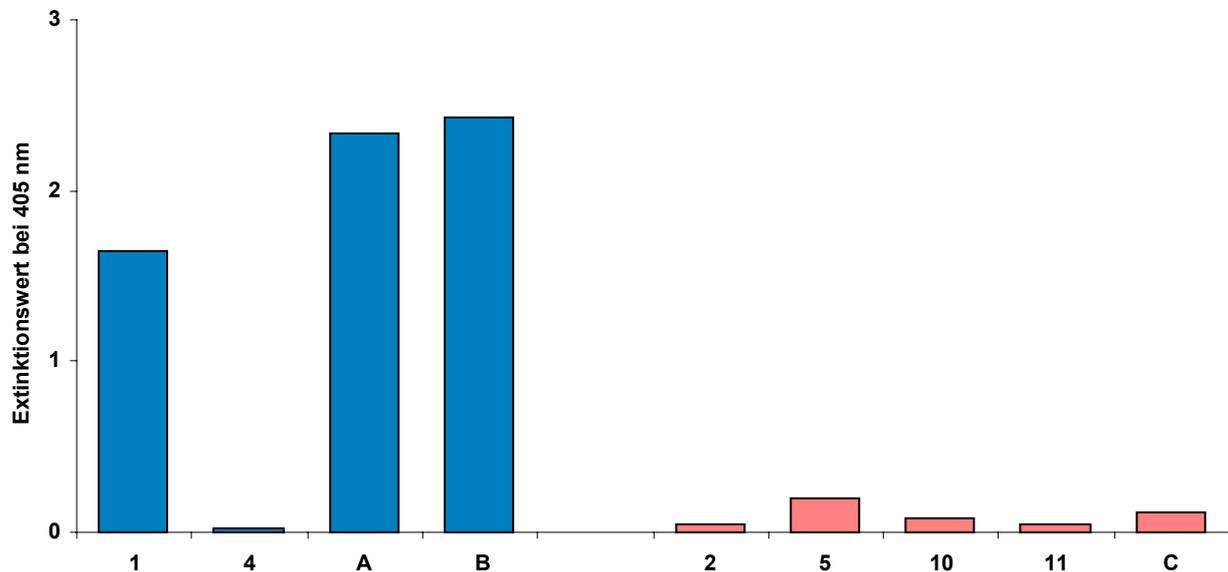


Abb. 40: TAS-ELISA-Extinktionswerte von Gurkenpflanzen der Sorte „Othello“ 16 Tage nach Inokulation mit CMV-Isolaten der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau) und II: 2, 5, 10, 11, C (rot) (inokuliert mit 0,1 mg Virus/ml; Werte der Negativkontrolle wurden abgezogen; Antikörperkonzentration 1:1000 für Beschichtung und Konjugat, monoklonale Antikörper 1:50; Messung 120 min nach Substratzugabe bei 405 nm).

3.4.3.5 Feldsalatpflanzen

Da an den Feldsalatpflanzen der Sorten „Verte de Cambrai“, „Vit“ und „Holländischer Breitblättriger“ keine Anzeichen einer Infektion durch die CMV-Isolate zu beobachten waren, sollte mittels DAS-ELISA geklärt werden, ob eine erfolgreiche Infektion stattgefunden hat. Dazu wurden 26 Tage nach Inokulation der Versuchspflanzen mit 0,1 mg Virus/ml, Mischproben genommen und im Vergleich zu Proben nicht inokulierter Pflanzen getestet.

Da zwischen den drei Sorten keine wesentlichen Unterschiede auftraten, wurden die Ergebnisse hier exemplarisch an den Messwerten der Sorten „Verte de Cambrai“ und „Vit“ dargestellt (Abb. 41). Die mit den Isolaten 2, 4 und A inokulierten Pflanzen wurden in allen Tests und bei allen verwendeten Sorten, 5 h nach Substratzugabe, eindeutig positiv getestet. Die gemessenen Werte waren 2 bis 3 mal höher als bei den Proben der nicht inokulierten Pflanzen, deren Extinktionswerte zwischen 0,5 und 0,6 lagen. Bei allen anderen Isolaten zeigte sich teilweise eine schwach positive Reaktion mit fast doppelt so hohen Werten wie bei der Negativkontrolle, häufig lagen die Extinktionswerte aber auch nur minimal oder gar nicht über denen gesunder Pflanzen.

Damit konnte nachgewiesen werden, dass trotz des Ausbleibens eindeutiger Symptome bei den Isolaten 2, 4, und A stets, bei den restlichen Isolaten zumindest in einigen Fällen, eine Infektion stattgefunden hatte.

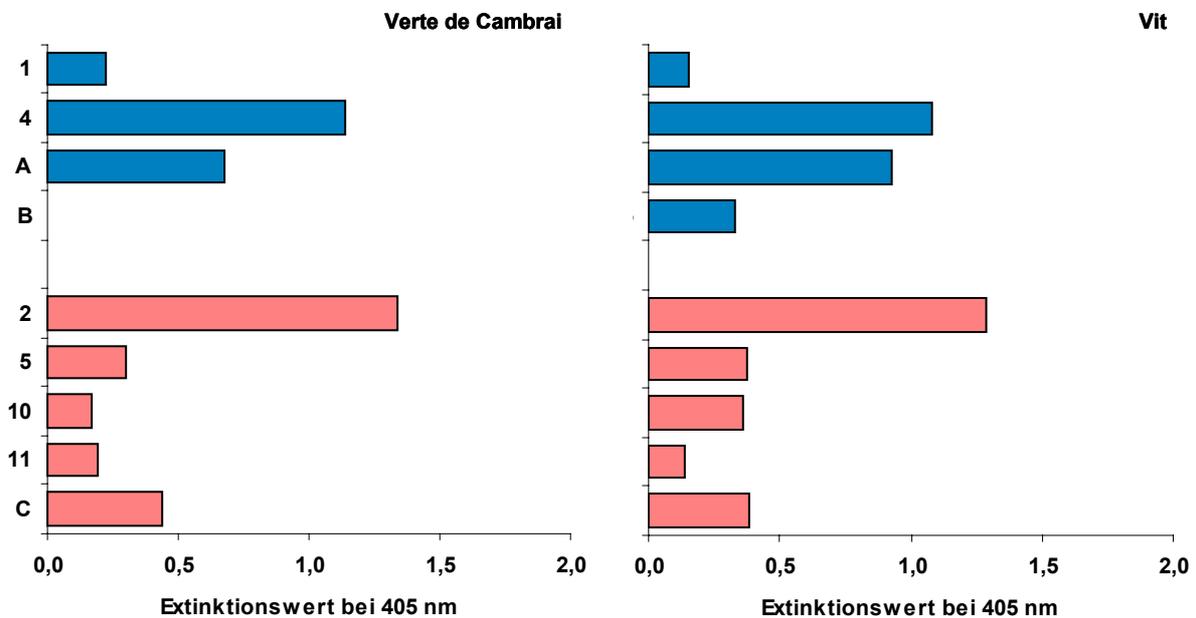


Abb. 41: DAS-ELISA-Extinktionswerte von Feldsalatpflanzen der Sorten „Verte de Cambrai“ und „Vit“ 26 Tage nach Inokulation mit CMV-Isolaten der Untergruppe I: 1, 4, A, B (blau) und II: 2, 5, 10, 11, C (rot) (inokuliert mit 0,1 mg Virus/ml; Werte der Negativkontrolle wurden abgezogen; Antikörperkonzentration 1:500 für Beschichtung und Konjugat; Messung 5 h nach Substratzugabe bei 405 nm).

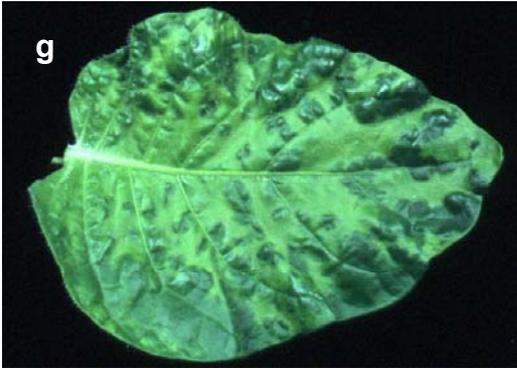
3.5 Bildtafeln

Bildseite I (rechts)

Nach Inokulation mit Isolaten des Gurkenmosaikvirus auftretende Symptome an *Nicotiana rustica*, inokuliert mit Pflanzenpresssaft:

- (a) Symptomfreies Blatt einer nicht inokulierten Pflanze.
- (b) Runde Chlorosen als lokale Reaktion, Isolat 1 (16 d p.i.).
- (c) Eckige, ungleichmäßig umrissene Chlorosen als lokale Reaktion, Isolat B (15 d p.i.).
- (d) Adernaufhellung als erste systemische Reaktion, Isolat 1 (16 d p.i.).
- (e) Interkostale Chlorosen mit fettigem Glanz als systemische Reaktion, Isolat 2 (35 d p.i.).
- (f) Chlorosen, Fettglanz und Unebenheiten der Blattoberfläche als systemische Reaktion, Isolat 10 (26 d p.i.).
- (g) Chlorotische und intensiv dunkelgrün gefärbte Blattbereiche „dark green islands“ mit blasigen Auftreibungen als systemische Reaktion, Isolat 1 (16 d p.i.).
- (h) Extremer Kontrast zwischen chlorotischen und intensiv dunkelgrün gefärbten Blattbereichen „dark green islands“ mit blasigen Auftreibungen als systemische Reaktion, Isolat 4 (22 d p.i.).

Bildseite I



Bildseite II (rechts)

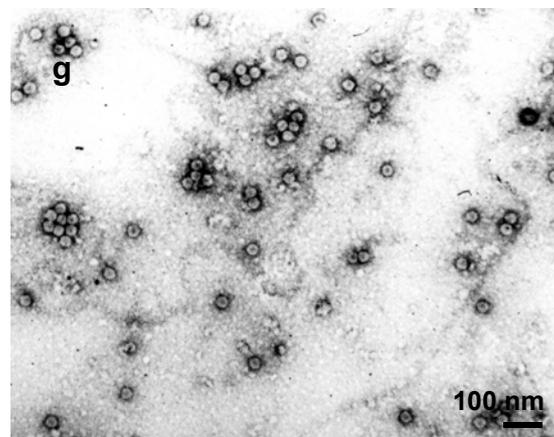
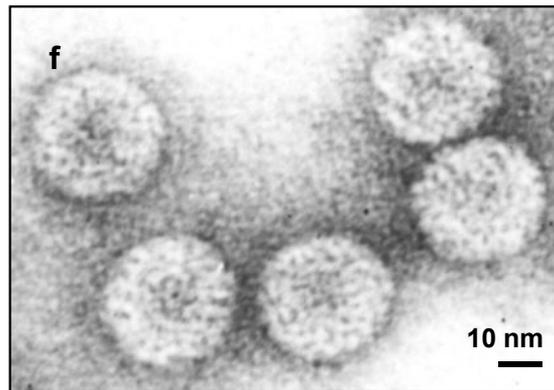
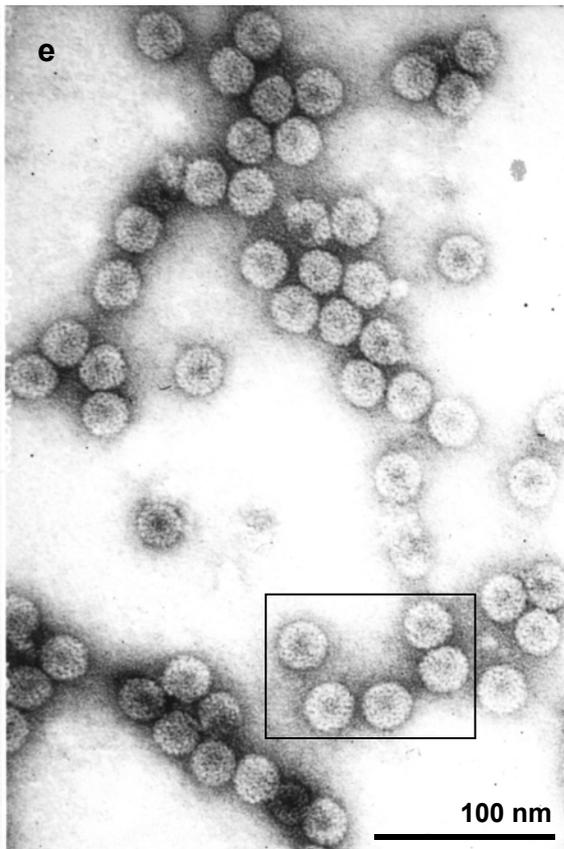
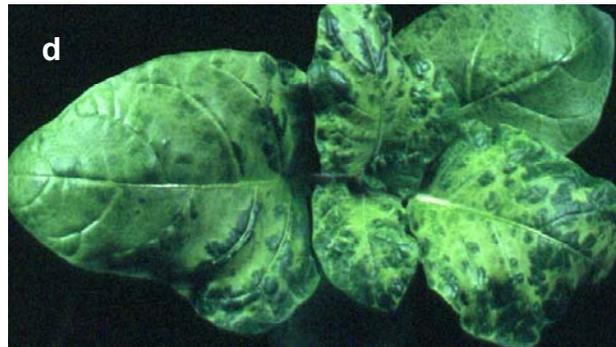
Nach Inokulation mit Isolaten des Gurkenmosaikvirus auftretende systemische Symptome an *Nicotiana rustica*, inokuliert mit Pflanzenpresssaft (Fortsetzung):

- (a) Blasige Auftreibungen, gewellte Blattränder und Einschnürungen, Isolat 4 (22 d p.i.).
- (b) Symptomfreie, nicht inokulierte Pflanze.
- (c) Starke Blattsymptome und Wuchsdeformationen, Isolat B (15 d p.i.). Blätter mit blasigen Auftreibungen, gewellten Rändern und Einschnürungen. Verschmälerung am Blattgrund, Blattfläche extrem reduziert, Eindruck untypisch langer Blattstiele.
- (d) Chlorosen und dunkelgrüne blasigen Auftreibungen, Isolat 1 (16 d p.i.).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen gereinigter Virussuspensionen (Tropfenpräparate, negative Kontrastierung):

- (e) Gereinigte Suspension des CMV-Isolates 2; Konzentration: 1 mg Virus/ml. Intakte Partikel ohne größere Verunreinigung.
- (f) Vergrößerter Ausschnitt von Bild e.
- (g) Gereinigte Suspension des CMV-Isolates 10; Konzentration: 0,1 mg Virus/ml. Intakte Partikel ohne größere Verunreinigung.

Bildseite II

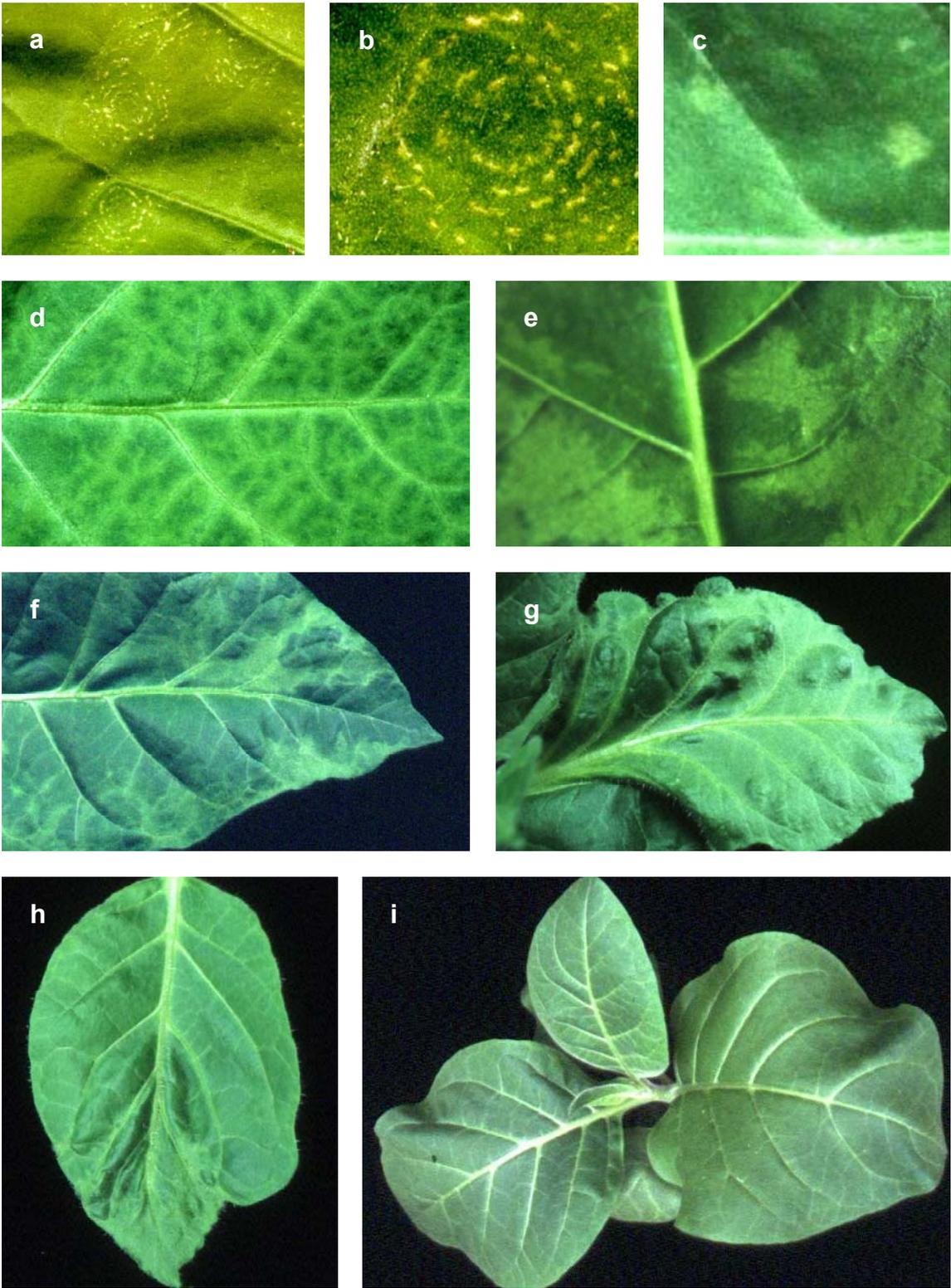


Bildseite III (rechts)

Nach Inokulation mit Isolaten des Gurkenmosaikvirus auftretende Symptome an *Nicotiana tabacum* "Samsun-NN", inokuliert mit Pflanzenpresssaft:

- (a) Kleine, konzentrisch angeordnete Nekrosen (Ringflecken) als lokale Reaktion, Isolat 5 (6 d p.i.).
- (b) Ringfleck als lokale Reaktion, Isolat 5 (6 d p.i.).
- (c) Ungleichmäßig geformte Chlorosen als lokale Reaktion, Isolat B (15 d p.i.).
- (d) Adernaufhellung als erste systemische Reaktion, Isolat 1 (16 d p.i.).
- (e) Großflächige, durchscheinende Chlorosen als systemische Reaktion, Isolat 1 (25 d p.i.).
- (f) Adernaufhellung und interkostale Chlorosen als systemische Reaktion, Isolat 4 (22 d p.i.).
- (g) Blasige Auftreibungen und gewellte Blattränder als systemische Reaktion, Isolat B (15 d p.i.). Reduzierte Blattfläche durch Verschmälerung am Blattgrund.
- (h) Blasige Auftreibungen und Einschnürungen der Blättern als systemische Reaktion, Isolat B (15 d p.i.).
- (i) Symptomfreie, nicht inokulierte Pflanze.

Bildseite III



Bildseite IV (rechts)

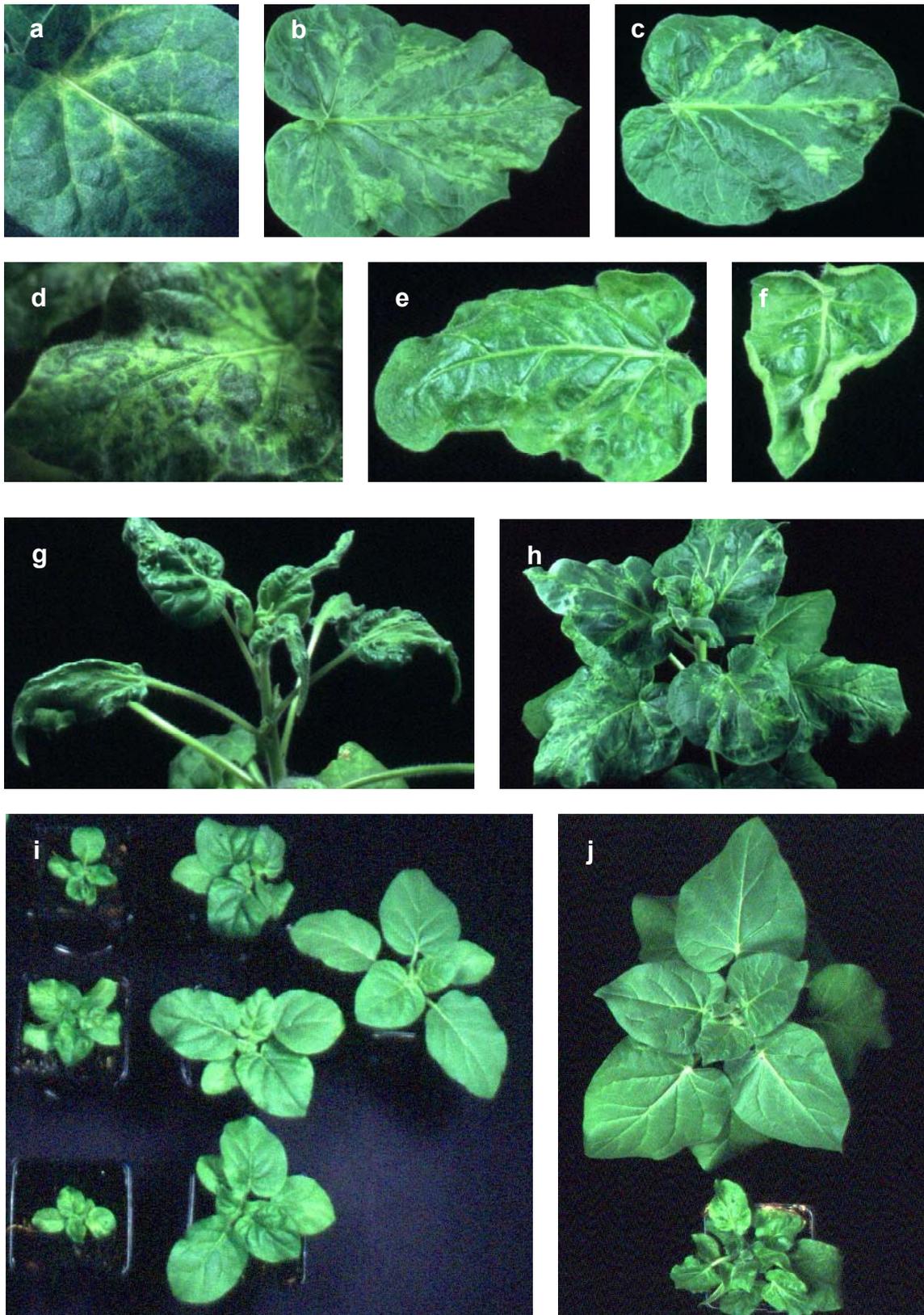
Nach Inokulation mit Isolaten des Gurkenmosaikvirus auftretende systemische Symptome an *Nicotiana glutinosa*, inokuliert mit Pflanzenpresssaft:

- (a) Adernaufhellung, Isolat C (17 d p.i.).
- (b) Chlorosen und gewellte Blattränder, Isolat 1 (35 d p.i.).
- (c) Adernaufhellung, von Blattadern ausgehende Chlorosen und Einschnürungen besonders an der Blattspitze, Isolat 1 (35 d p.i.).
- (d) Intensiv dunkelgrün gefärbte Blattbereiche „dark green islands“ mit blasigen Auftreibungen, Isolat 1 (25 d p.i.).
- (e) Blattsymptome, Isolat 2 (35 d p.i.). Blätter kleiner, mit blasigen Auftreibungen und gewellten Rändern. Schmalblättrigkeit durch Reduktion der Blattspreite.
- (f) Blattsymptome, Isolat 2 (35 d p.i.). Schmalblättrigkeit, blasige Auftreibungen sowie gewellte und eingerollte Blattränder.
- (g) Blatt- und Wuchsdeformationen, Isolat 4 (29 d p.i.). Blätter mit blasigen Auftreibungen und gewellten Rändern, sind klein und teilweise extrem schmalblättrig. Internodien und Blattstiele unnatürlich lang.
- (h) Chlorosen und gewellten Blatträndern, Isolat 1 (35 d p.i.). Wachstum im Vergleich zu nichtinfizierten Pflanzen kaum beeinträchtigt.

Einfluss der CMV-Isolate auf das Wachstum von *Nicotiana glutinosa*, inokuliert mit 0,1 mg Virus/ml:

- (i) Wachstum inokulierter im Vergleich zu nicht inokulierten Pflanzen (12 d p.i.). Links: Isolate 5, 10, 11; Mitte: Isolate A, B, C; Rechts : nicht inokuliert, (von oben nach unten).
- (j) Starke Wuchsdepression nach Inokulation mit Isolat 10 (unten) im Vergleich zu nicht inokulierter Pflanze (oben) (26 d p.i.).

Bildseite IV



Bildseite V (rechts)

Nach Inokulation mit Isolaten des Gurkenmosaikvirus auftretende Symptome an *Nicotiana clevelandii*, inokuliert mit Pflanzenpresssaft:

- (a) Lokale (Blatt 1, 2) und systemische (Blatt 3 - 5) Reaktion (von links nach rechts), Isolat 1 (22 d p.i.). Chlorosen, gewellte Blattränder, blasige Auftreibungen und Schmalblättrigkeit.
- (b) Symptomfreie, nicht inokulierte Pflanze.
- (c) Chlorosen, blasigen Auftreibungen und gewellten Blatträndern als systemische Reaktion, Isolat 4 (18 d p.i.). Blätter sind kleiner und anders geformt als symptomfreie Blätter.
- (d) Chlorosen, Nekrosen sowie extreme Wuchsdepression als systemische Reaktion, Isolat 10 (18 d p.i.).

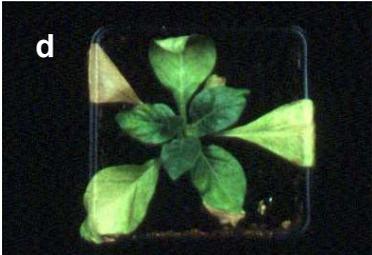
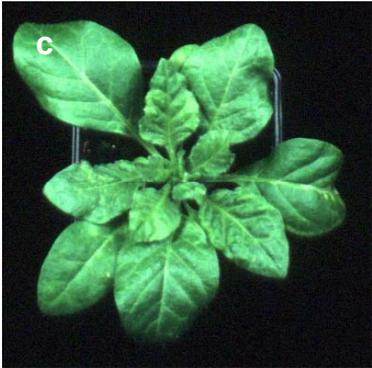
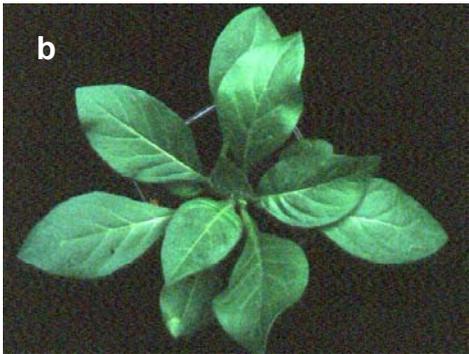
Einfluss der CMV-Isolate auf das Wachstum von *Nicotiana clevelandii* (12 d p.i.), inokuliert mit 0,1 mg Virus/ml:

- (e) Wachstum inokulierter Pflanzen im Vergleich zu nicht inokulierter Pflanze. Links: Isolate 5, 10, 11; Mitte: Isolate A, B, C; Rechts : nicht inokuliert, (von oben nach unten).

Symptome CMV-infizierter Stiefmütterchen (*Viola x Wittrockiana*), Isolat 10:

- (f) Deformierte geschlossene Blüte mit kleinen Nekrosen.
- (g) Geöffnete Blüte mit Blütenstreifigkeit (Farbenbrechung).

Bildseite V

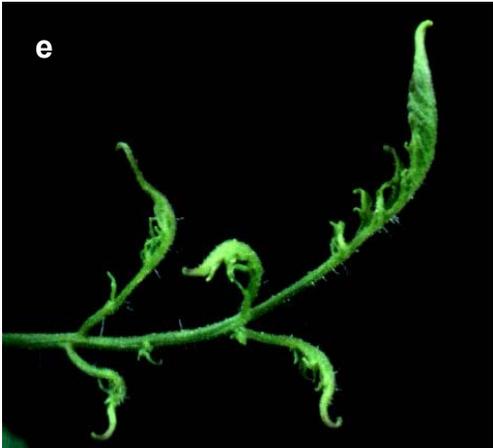


Bildseite VI (rechts)

Nach Inokulation mit Isolaten des Gurkenmosaikvirus auftretende systemische Symptome an Tomatenpflanzen (21 d p.i.), inokuliert mit 0,1 mg Virus/ml:

- (a) Hellgrüne bis gelbe Verfärbungen an den Blatträndern (Chlorosen), Isolat 2.
- (b) Eingerollte Blätter, Isolat A.
- (c) Chlorosen und dunkle Blattadern, Isolat 10.
- (d) Rot-violett verfärbte Blattunterseite (Rötung), Isolat 2.
- (e) In der Breite extrem reduzierte Blattspreite (Fadenblättrigkeit), Isolat 4.
- (f) Stängelnekrose und abgeknickte Triebspitze, Isolat 11.

Bildseite VI

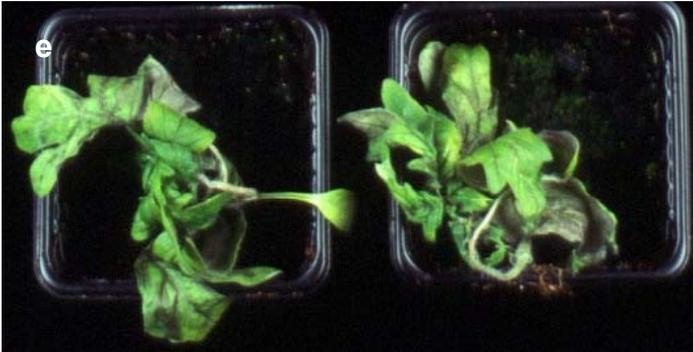
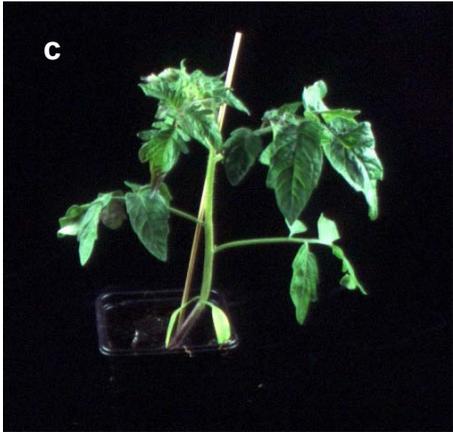


Bildseite VII (rechts)

Einfluss der CMV-Isolate auf die Entwicklung von Tomatenpflanzen (21 d p.i.), inokuliert mit 0,1 mg Virus/ml:

- (a) Vergleich inokulierter Pflanzen mit nicht inokulierter Pflanze, nicht inokuliert (n.i.), Isolate B, A, C, 11, 10 (Boniturwerte 0, 4, 6, 8, 9, 10), (von links nach rechts).
- (b) Blattsymptome und Wuchsdeformationen nach Infektion mit Isolat B. Verkümmern der Triebspitze bei gleichzeitig verstärktem Austrieb der Seitenknospen „Buschigkeit“. Blätter und Blattstiele durch unregelmäßiges Wachstum untypisch verdreht (Boniturwert 7).
- (c) Starke Wuchsdepression bei ansonsten normalen Pflanzenhabitus nach Infektion mit Isolat A (Boniturwert 8).
- (d) Extreme Wuchsdeformation und -depression nach Infektion mit Isolat 11. Pflanze hat das Wachstum eingestellt, Triebspitze ist durch Stängelnekrosen abgeknickt und bereits verwelkt (Boniturwert 9).
- (e) Pflanzen stark gestaucht, Stängelnekrosen, Triebspitzen abgestorben, Welke und Absterben der ganzen Pflanze, Infektion mit Isolat 10, (Boniturwert 10).

Bildseite VII

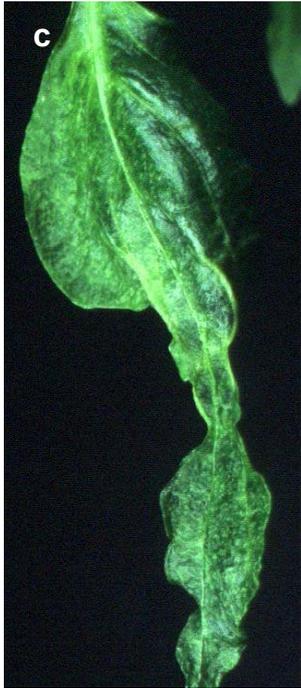


Bildseite VIII (rechts)

Nach Inokulation mit CMV-Isolaten auftretende systemische Symptome an Paprikapflanzen (71 d p.i.), inokuliert mit 0,1 mg Virus/ml:

- (a) Blattoberfläche leicht gewellt, der für Paprikablätter typische Glanz fehlt (Rauhblättrigkeit), Isolat A.
- (b) Blätter zeigen Adernaufhellung, interkostale Chlorosen und Blasen, Isolat A.
- (c) Blattdeformation durch eingeschnürte Blattspreite (Schmalblättrigkeit), Isolat 4.
- (d) Blattspreite ist an der Blattspitze stark reduziert (Fadenblättrigkeit), Isolat 4.
- (e) Lanzettförmige Blätter durch Reduktion der Blattspreite (Schmalblättrigkeit), Isolat A.

Bildseite VIII



Bildseite IX (rechts)

Einfluss der CMV-Isolate auf die Entwicklung von Paprikapflanzen:

- (a) Wachstum inokulierter Pflanzen im Vergleich zu nicht inokulierter Pflanze (27 d p.i.). Isolate A und 1, nicht inokuliert (n.i.), (von links nach rechts). Inokuliert mit 0,1 mg Virus/ml.
- (b) Wuchsdeformationen und -depressionen nach Inokulation mit 0,1 bzw. 0,001 mg Virus/ml des Isolates A (71 d p.i.), nicht inokuliert (n.i). Extrem verkürzte Internodien (Stauchung) und Blattverschmälerungen.

Bildseite IX

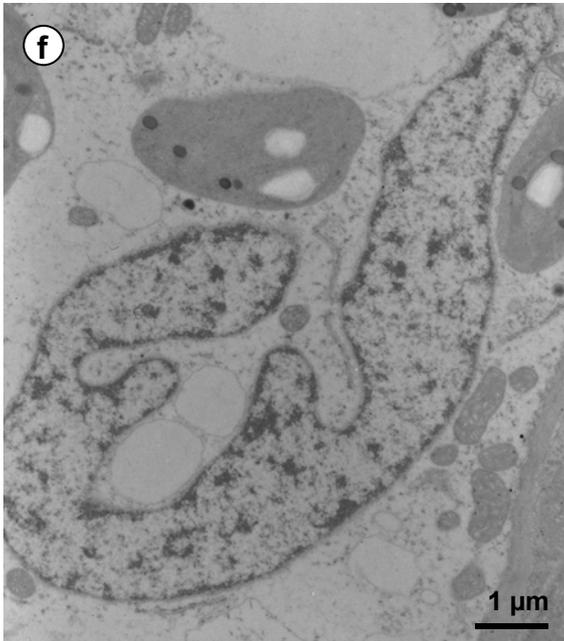
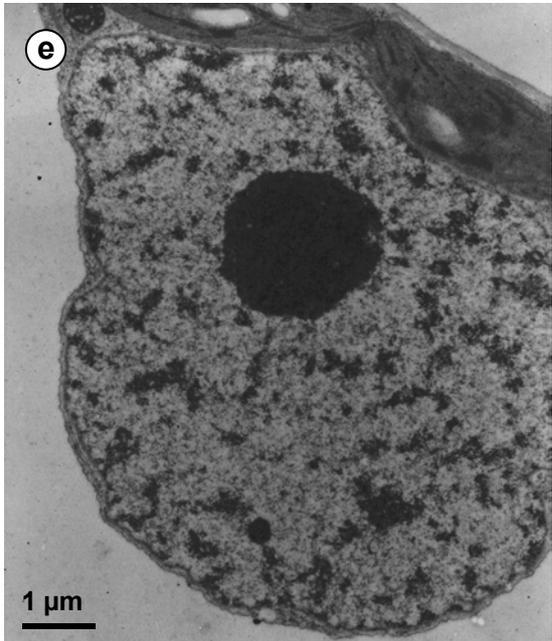
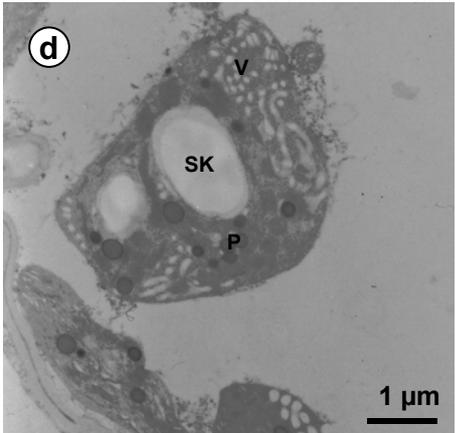
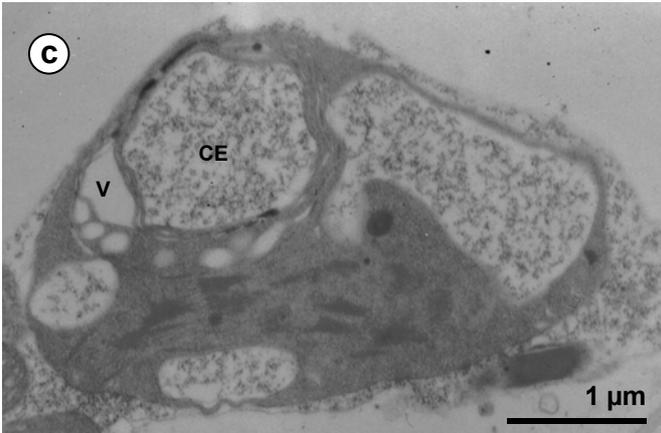
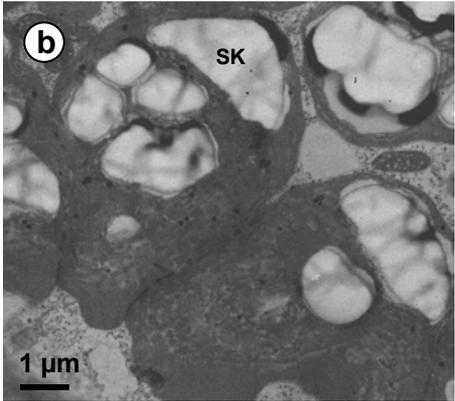
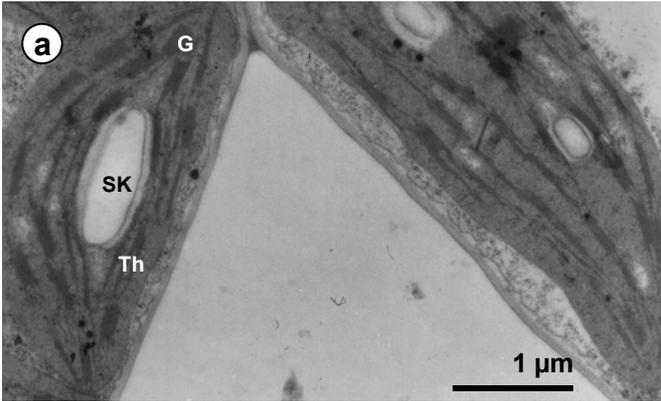


Bildseite X (rechts)

Zytologische Untersuchungen nach CMV-Infektion auftretender Symptome an *Nicotiana rustica* (19 d p.i.):

- (a) Palisadenparenchymzellen aus nicht infiziertem Blattgewebe: Intakte Chloroplasten mit zahlreichen, gut zu erkennenden Thylakoidmembranen (Th) und Granastapeln (G) sowie mäßig großen Stärkekörnern (SK).
- (b) Palisadenparenchymzelle aus nicht infiziertem Blattgewebe: Chloroplasten mit vielen größeren Stärkekörnern (SK).
- (c) Palisadenparenchymzelle aus Blattgewebe mit lokalen Chlorosen, Isolat 4: Degenerierter, aufgeblähter Chloroplast mit Cytoplasma-Einschlüssen (CE) und Vesikulierung (V).
- (d) Palisadenparenchymzelle aus Blattgewebe mit lokalen Chlorosen, Isolat 4: Degenerierte Chloroplasten mit vielen Plastoglobuli (P) und peripherem Retikulum bzw. Vesikulierung (V), SK: Stärkekorn.
- (e) Schwammparenchymzelle aus nicht infiziertem Blattgewebe: Intakter Zellkern.
- (f) Schwammparenchymzelle aus Blattgewebe mit lokalen Chlorosen, Isolat 4: Stark gelappter Zellkern.

Bildseite X

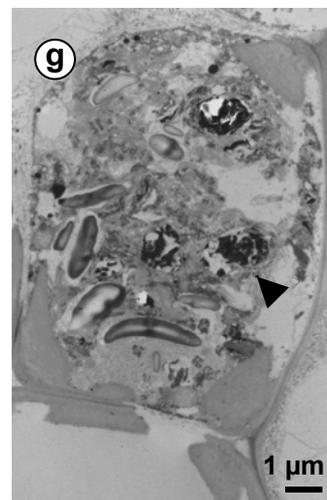
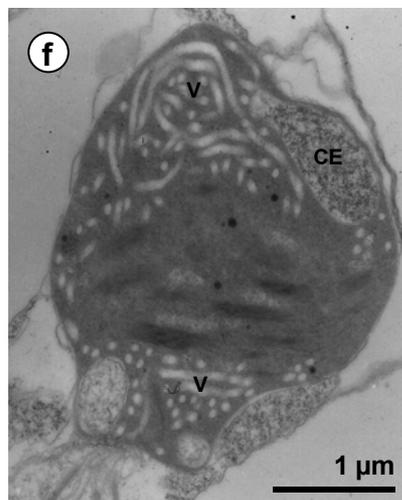
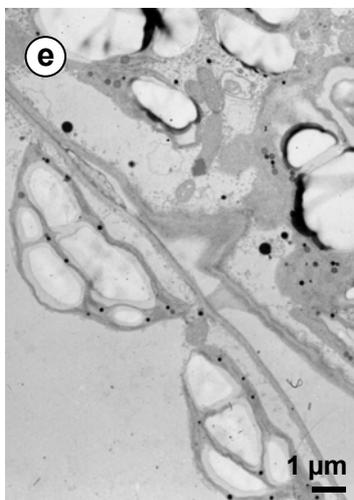
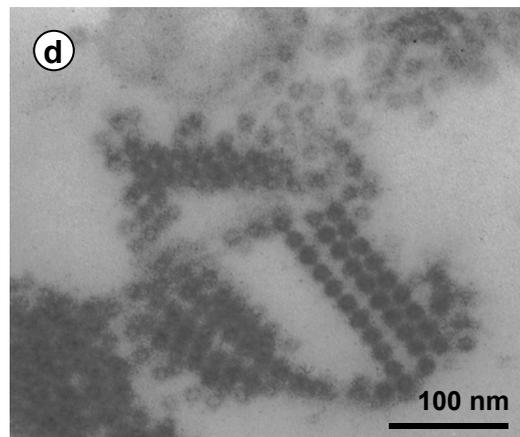
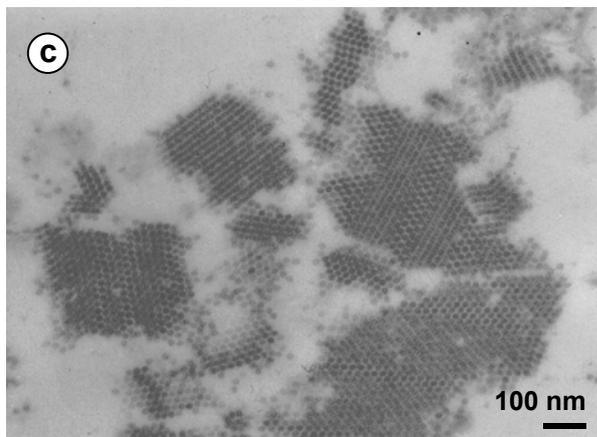
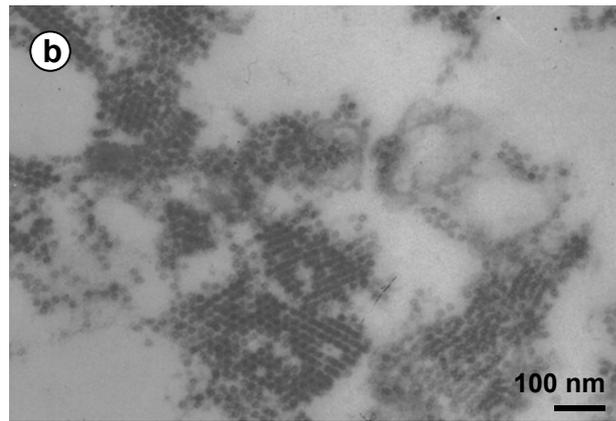
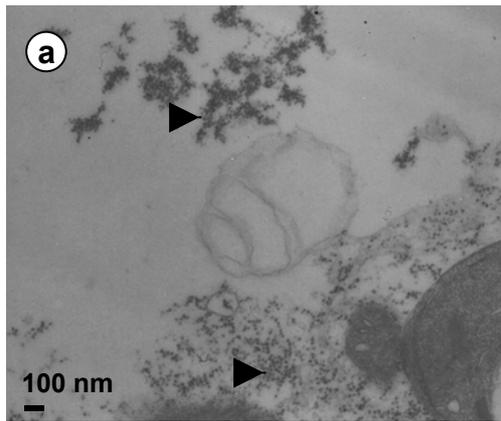


Bildseite XI (rechts)

Zytologische Untersuchungen nach CMV-Infektion auftretender Symptome an *Nicotiana rustica* (19 d p.i.):

- (a) Palisadenparenchymzelle aus Blattgewebe mit lokalen Chlorosen, Isolat 4: Viruspartikel bzw. -aggregate in Cytoplasma und Vakuole (Pfeile).
- (b) Palisadenparenchymzelle aus Blattgewebe mit lokalen Chlorosen, Isolat 4: Virusaggregate in Vakuole.
- (c) Palisadenparenchymzelle aus Blattgewebe mit lokalen Chlorosen, Isolat 4: In Vakuole zu kristallinen Aggregaten zusammengelagerte Viruspartikel.
- (d) Palisadenparenchymzelle aus Blattgewebe mit lokalen Chlorosen, Isolat 4: Aufgereihte Viruspartikel in Vakuole.
- (e) Palisadenparenchymzelle aus Blattgewebe mit systemischer Adernaufhellung, Isolat 11: Degenerierte Chloroplasten mit extremer Stärkeakkumulation.
- (f) Palisadenparenchymzelle aus Blattgewebe mit systemischer Adernaufhellung, Isolat 4: Degenerierter Chloroplast mit Cytoplasma-Einschlüssen (CE) und peripherem Retikulum bzw. Vesikulierung (V).
- (g) Xylemzelle aus Blattgewebe mit systemischer Adernaufhellung, Isolat 4: Tracheide mit Akkumulation von degeneriertem Chloroplastenmaterial (Pfeil).

Bildseite XI

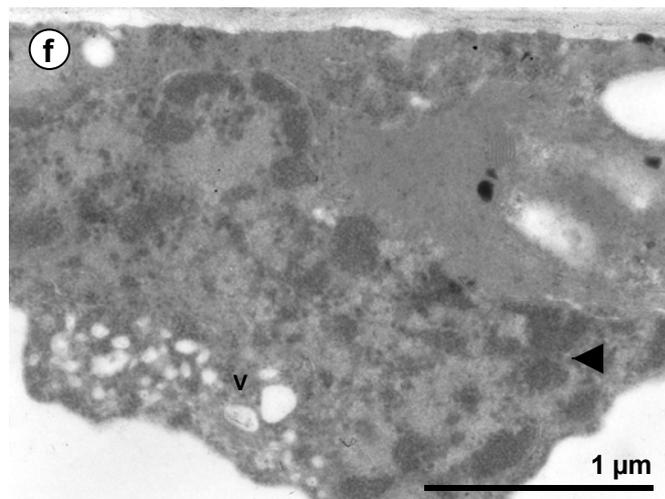
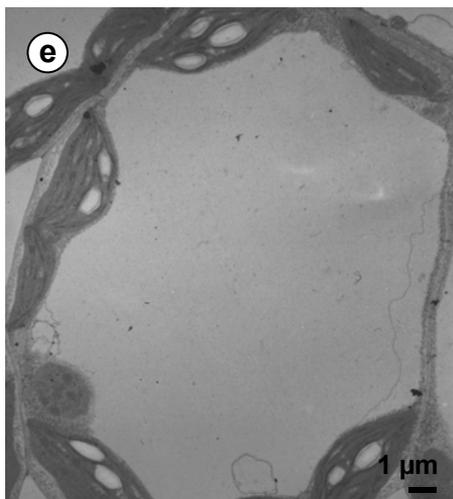
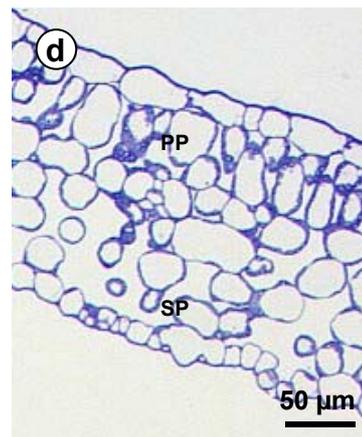
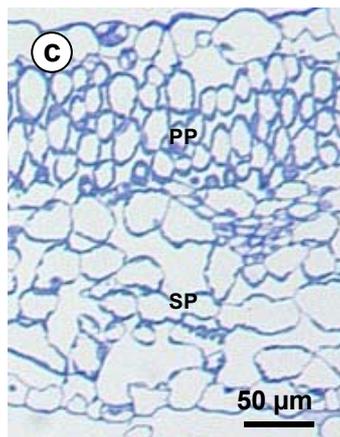
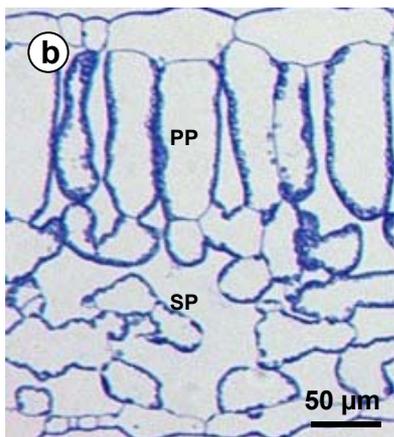
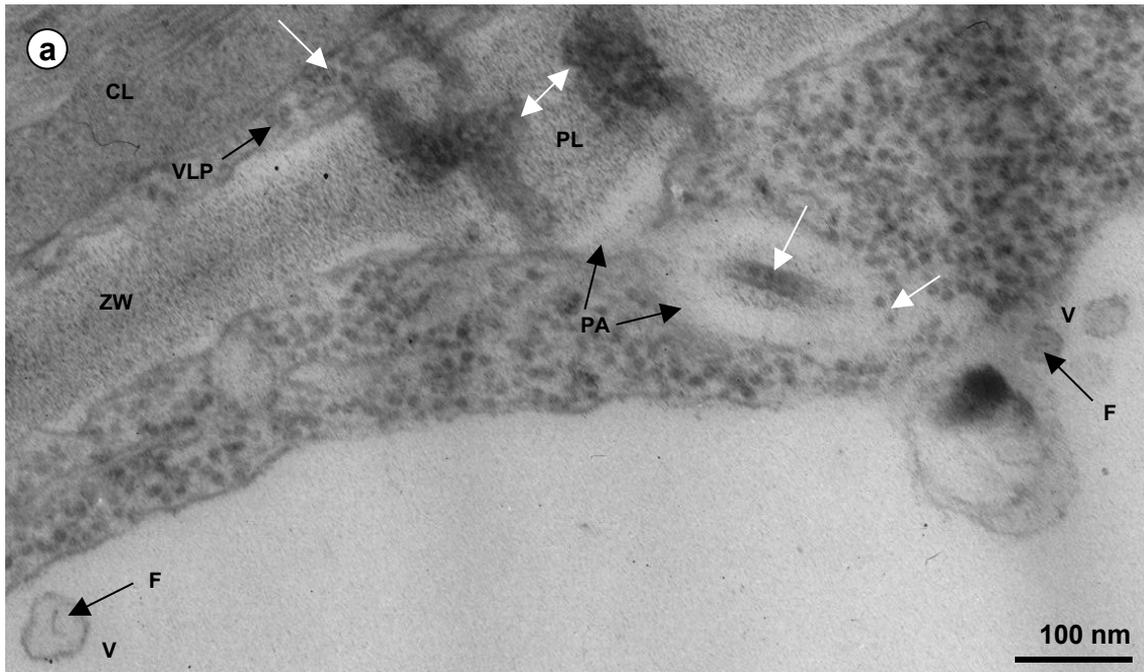


Bildseite XII (rechts)

Histologische und zytologische Untersuchungen nach CMV-Infektion auftretender Symptome an *Nicotiana rustica* (19 d p.i.):

- (a) Palisadenparenchymzelle aus Blattgewebe mit systemischer Adernaufhellung, Isolat 4: Erweiterte Plasmodesmen (Pl), tubuläre Plasmodesmenausstülpung und Zellwandauflagerung (PA), Transport (weiße Pfeile) von Virus-ähnlichen Partikeln (VLP), Tonoplast-assoziierte Vesikel (V) mit fibrillärem Inhalt (F), ZW: Zellwand, CL: Chloroplast.
- (b) Querschnitt durch nicht infiziertes Blattgewebe. PP: Palisadenparenchym, SP: Schwammparenchym.
- (c) Querschnitt durch Blattgewebe mit dunkelgrünen blasigen Auftreibungen, Isolat 4: Reduzierte Zellgröße, unvollständige Gewebedifferenzierung und mehrreihiges Palisadenparenchym. PP: Palisadenparenchym, SP: Schwammparenchym.
- (d) Querschnitt durch chlorotisches Blattgewebe, Isolat 4: Reduzierte Zellgröße, unvollständige Gewebedifferenzierung und Reduktion der Blattdicke. PP: Palisadenparenchym, SP: Schwammparenchym.
- (e) Palisadenparenchymzelle aus Blattgewebe mit dunkelgrünen blasigen Auftreibungen, Isolat 4: Intakte Chloroplasten.
- (f) Palisadenparenchymzelle aus chlorotischem Blattgewebe, Isolat 4: Vesikulation (V) und dunkel kontrastierte Aggregate (Pfeil) in Cytoplasma.

Bildseite XII

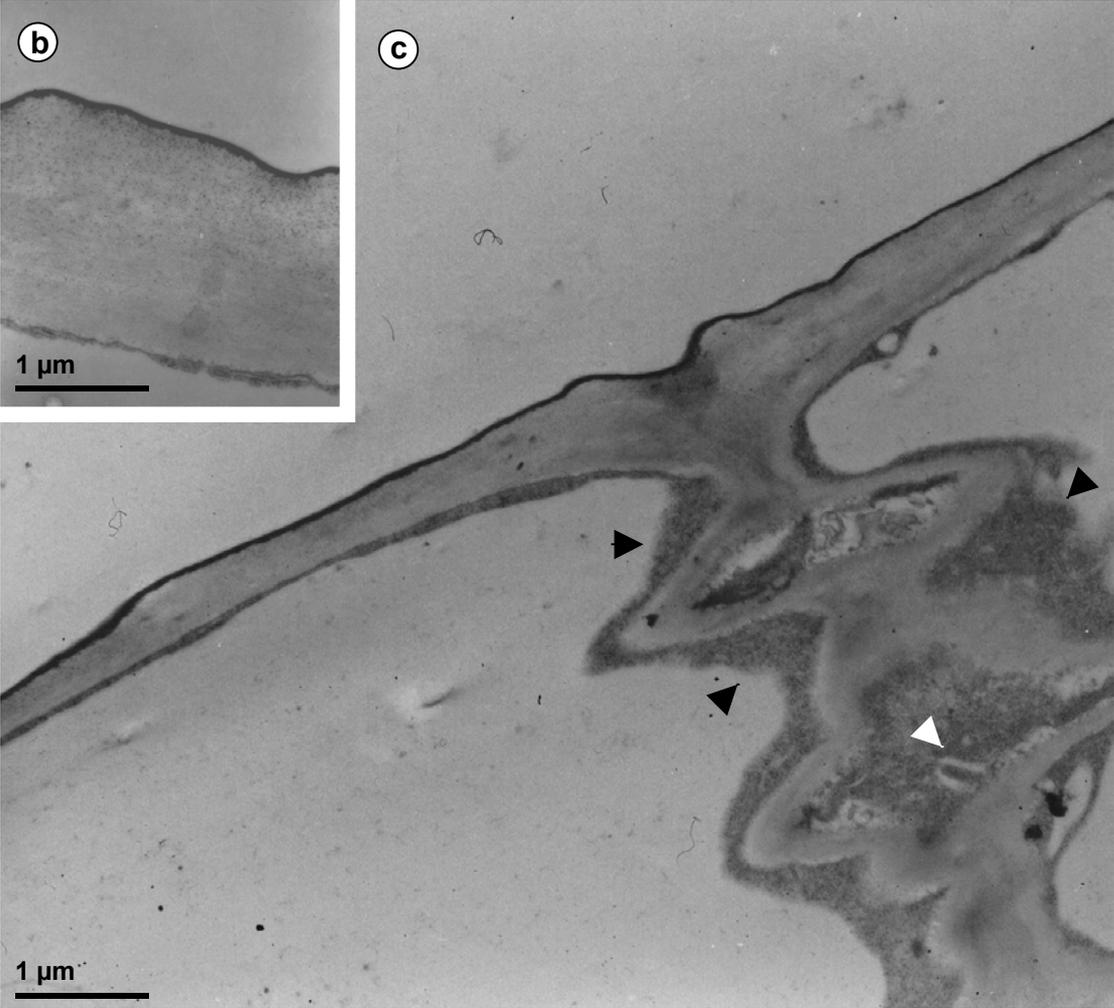
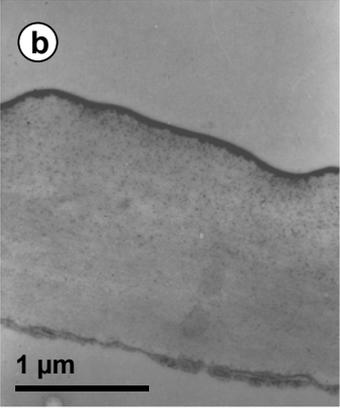
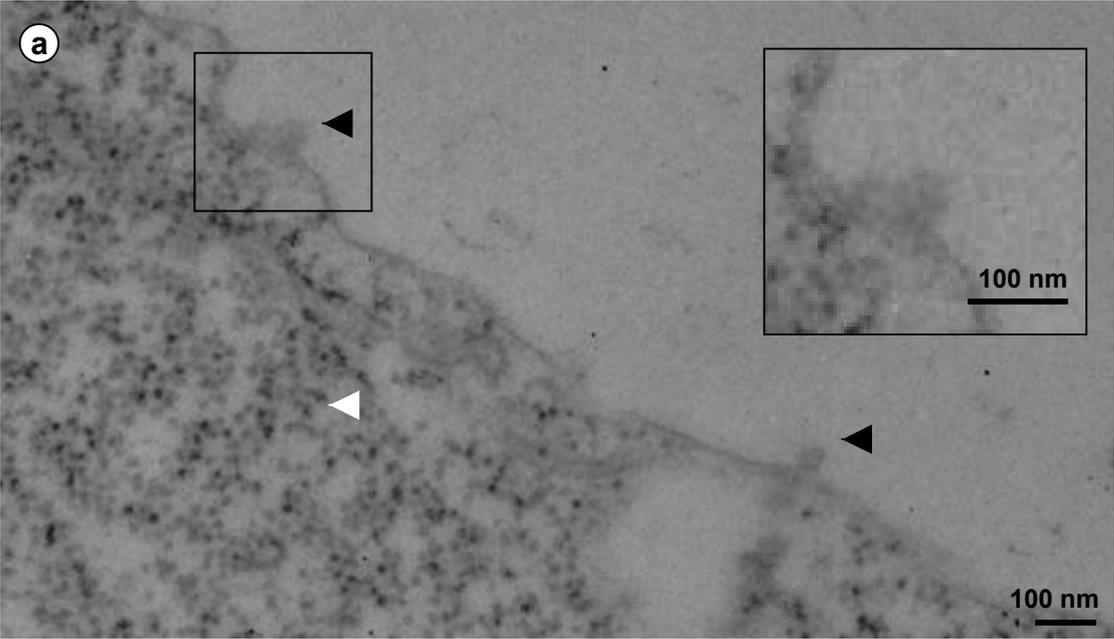


Bildseite XIII (rechts)

Zytologische Untersuchungen nach CMV-Infektion auftretender Symptome an *Nicotiana rustica* (19 d p.i.):

- (a) Palisadenparenchymzelle aus chlorotischem Blattgewebe, Isolat 4: Granuläre Partikel im Cytoplasma (weißer Pfeil) und Tonoplast-assoziierte Vesikel (schwarze Pfeile), vergrößerter Ausschnitt (umrandet).
- (b) Zellwand einer Epidermiszelle aus nicht infiziertem Blattgewebe.
- (c) Epidermiszellen aus Blatt mit ölig glänzender Oberfläche, Isolat 11: Deformierte antiklinale Zellwand, Zellwandauflagerungen (schwarze Pfeile), tubuläre Plasmodesmenausstülpung (weißer Pfeil).

Bildseite XIII

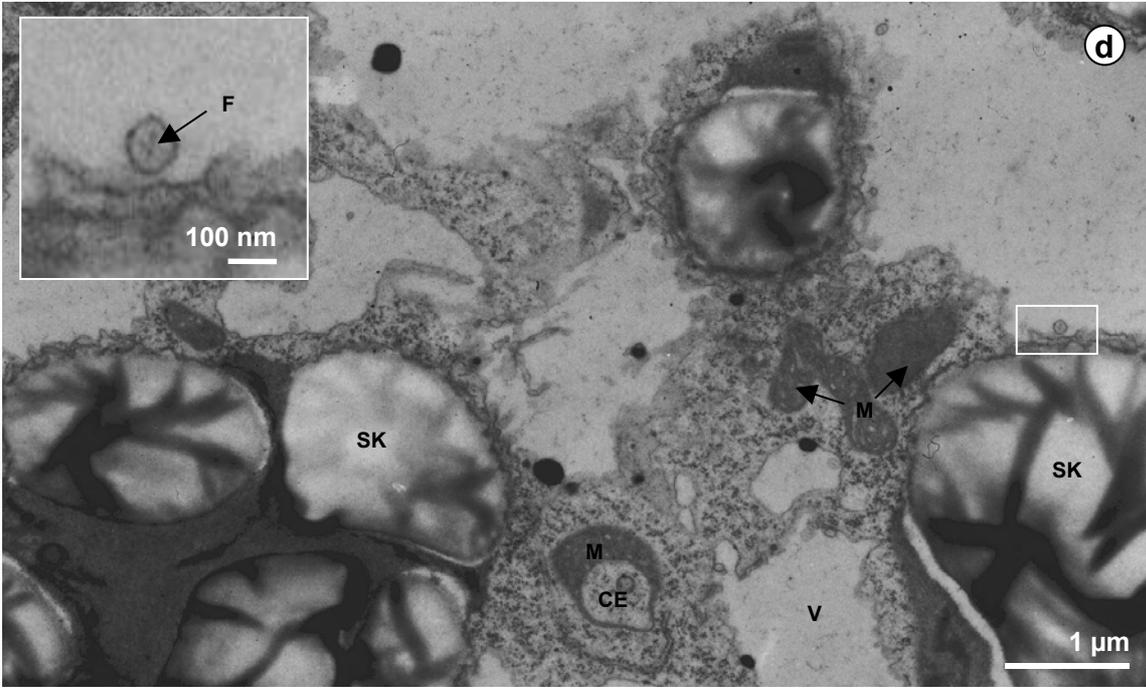
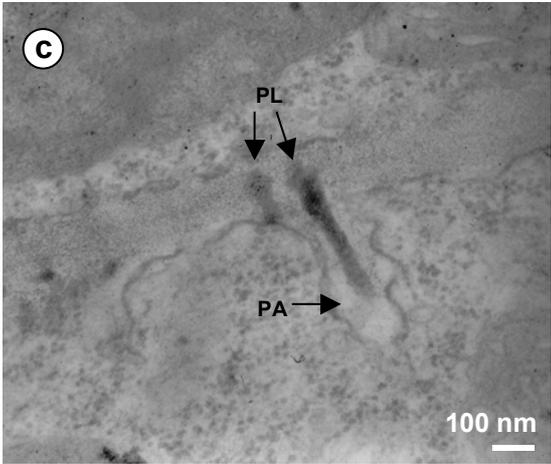
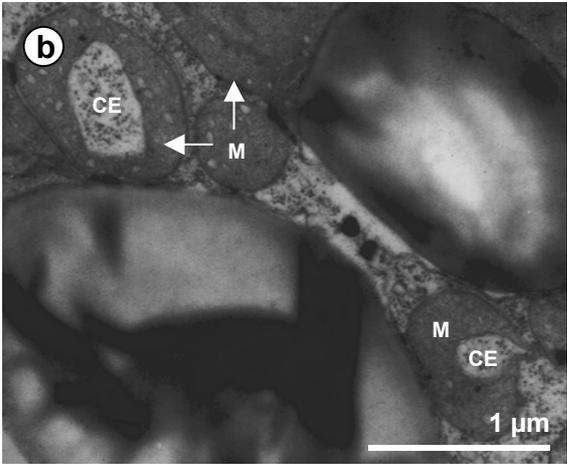
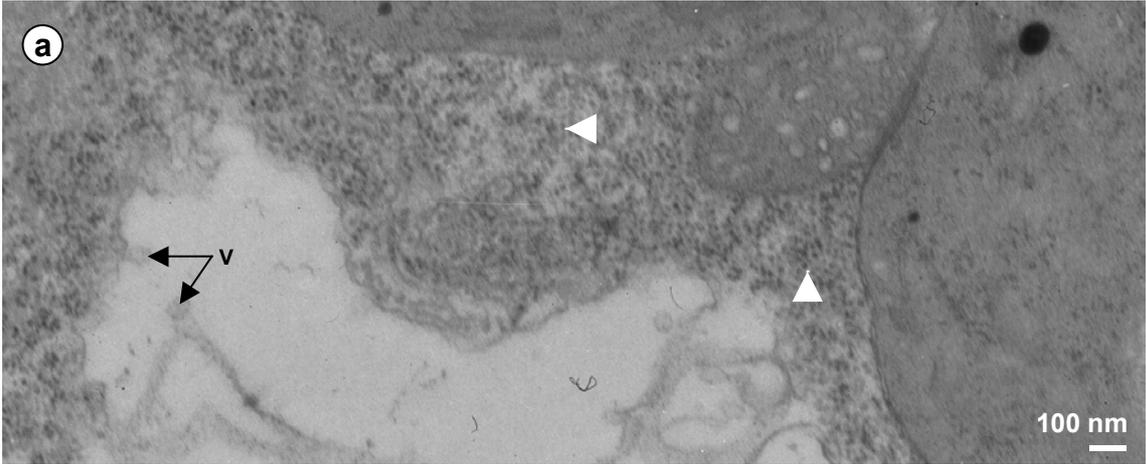


Bildseite XIV (rechts)

Zytologische Untersuchungen nach CMV-Infektion auftretender Symptome an *Nicotiana rustica* und *N. tabacum* „Samsun-NN“ (19 d p.i.):

- (a) Palisadenparenchymzelle aus Blatt mit ölig glänzender Oberfläche, *N. rustica*, Isolat 11: Granuläres Material in Cytoplasma (weiße Pfeile) und Tonoplast-assoziierte Vesikel (V).
- (b) Palisadenparenchymzelle aus Blattgewebe mit interkostalen Chlorosen, *N. tabacum* „Samsun-NN“, Isolat 11: Zahlreiche Mitochondrien (M), teilweise stark gelappt mit Cytoplasma-Einschlüssen (CE) bzw. Invaginationen.
- (c) Palisadenparenchymzelle aus Blattgewebe mit interkostalen Chlorosen, *N. tabacum* „Samsun-NN“, Isolat A: Erweiterte Plasmodesmen (PL) und tubuläre Plasmodesmenausstülpung (PA).
- (d) Palisadenparenchymzelle aus Blattgewebe mit interkostalen Chlorosen, *N. tabacum* „Samsun-NN“, Isolat 11: Dunkel kontrastierte Aggregate im Cytoplasma und starke Vesikulierung (V), degenerierte Chloroplasten mit großen Stärkekörnern (SK), Mitochondrien (M) mit Cytoplasma-Einschlüssen (CE) bzw. Invaginationen sowie Tonoplast-assoziierte Vesikel (umrandete Ausschnittvergrößerung) mit fibrillärem Inhalt (F).

Bildseite XIV

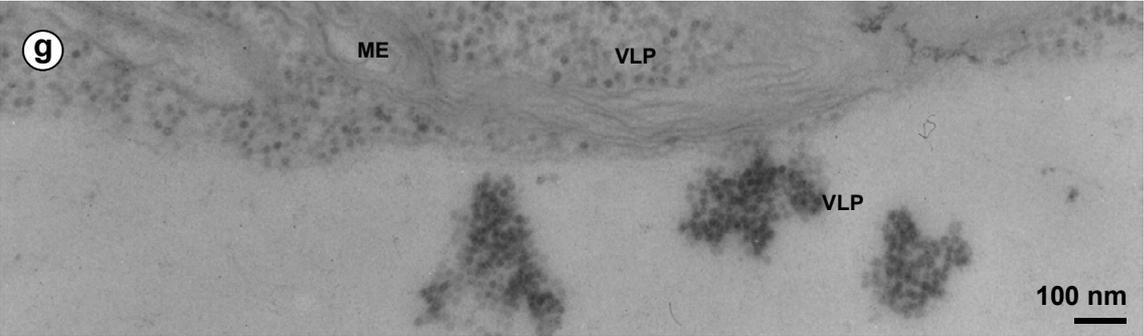
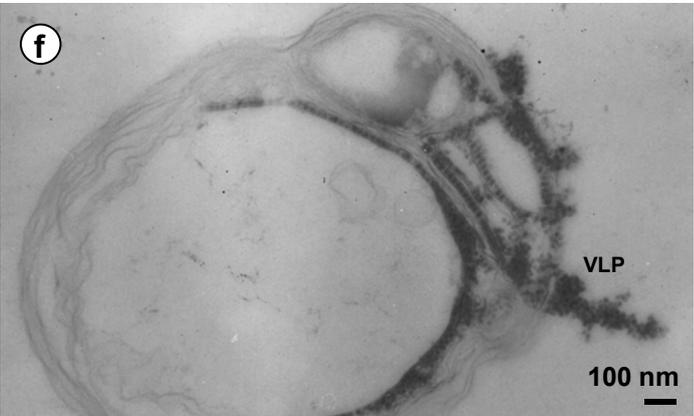
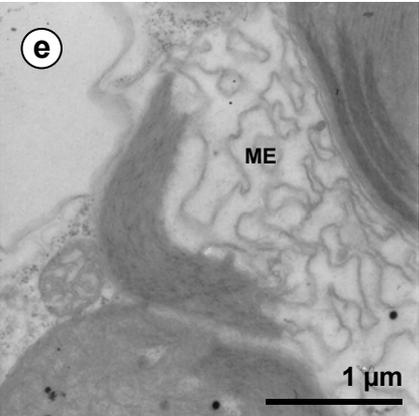
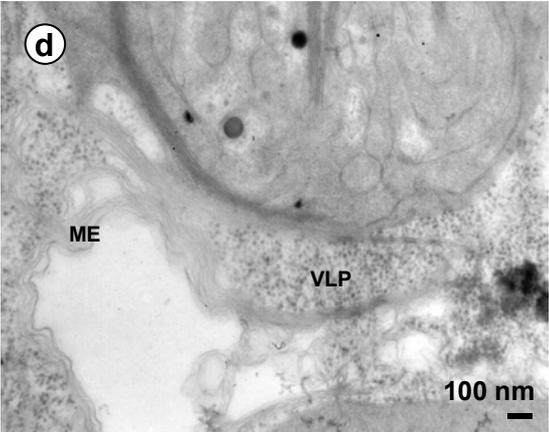
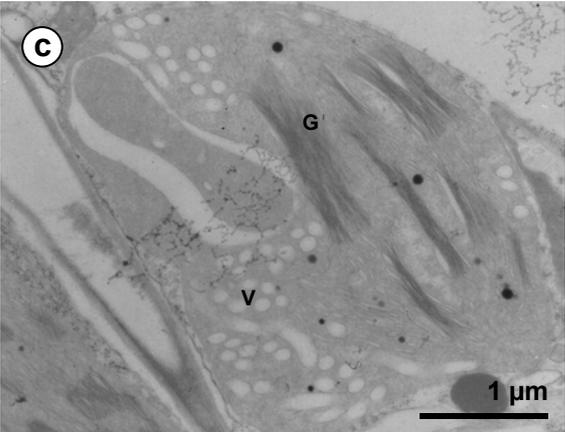
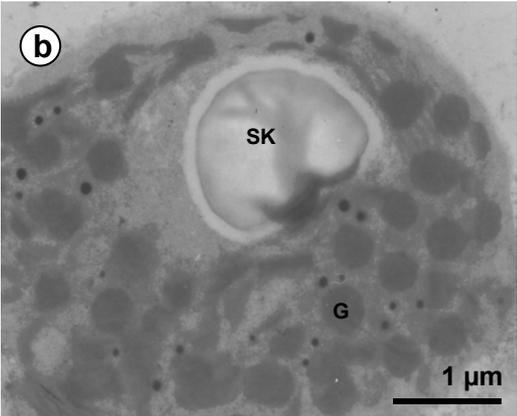
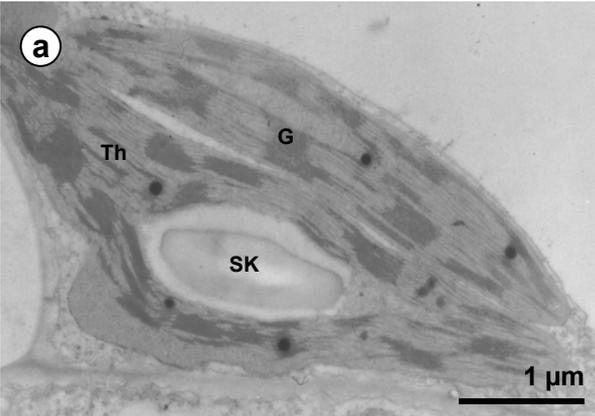


Bildseite XV (rechts)

Zytologische Untersuchungen nach CMV-Infektion auftretender Symptome an Tomatenpflanzen (15 d p.i.):

- (a) Palisadenparenchymzelle nicht infizierter Pflanze: Zwei intakte Chloroplasten (Längsschnitt) mit und ohne Stärkekorn (SK), gut zu erkennende Thylakoidmembranen (Th) und Granastapel (G).
- (b) Palisadenparenchymzelle nicht infizierter Pflanze: Intakter Chloroplast (Querschnitt); SK: Stärkekorn, G: Granastapel.
- (c) Palisadenparenchymzelle aus chlorotischem Blattgewebe, Isolat A: Degenerierter Chloroplast mit starker Vesikulierung (V), aufgeweiteten Granathylakoiden (G) und ohne Stromathylakoide.
- (d) Palisadenparenchymzelle aus chlorotischem Blattgewebe, Isolat A: Degenerierter Chloroplast, membranöse Strukturen (ME) sowie virusähnliche Partikel (VLP) in Cytoplasma.
- (e) Palisadenparenchymzelle aus chlorotischem Blattgewebe, Isolat A: Membranöse Überreste (ME) eines degenerierten Chloroplasten.
- (f) Palisadenparenchymzelle aus chlorotischem Blattgewebe, Isolat A: Degenerierter Chloroplast und virusähnliche Partikel (VLP).
- (g) Palisadenparenchymzelle aus chlorotischem Blattgewebe, Isolat A: Membranöse Strukturen (ME) im Cytoplasma, virusähnliche Partikel (VLP) in Cytoplasma und Vakuole.

Bildseite XV

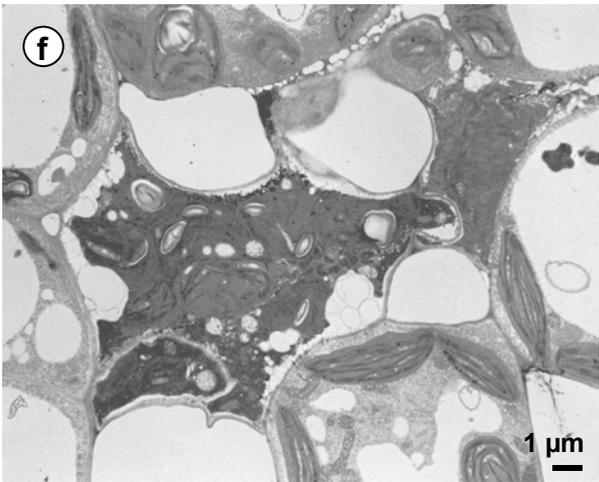
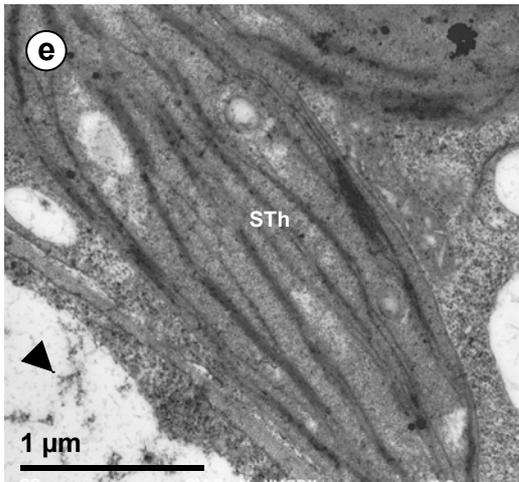
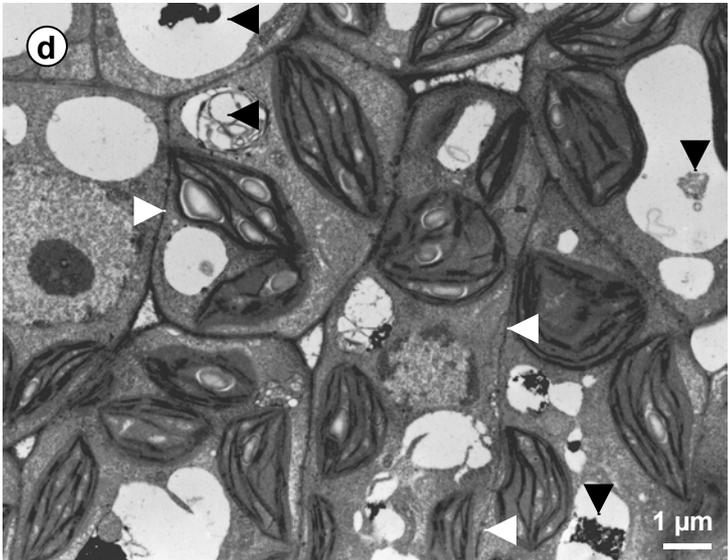
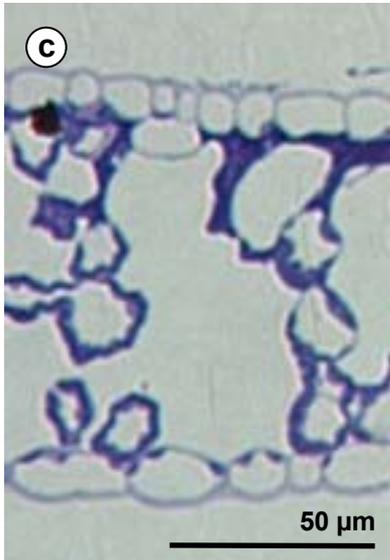
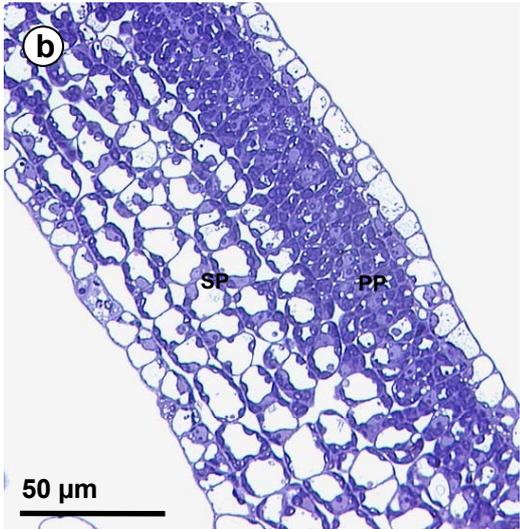
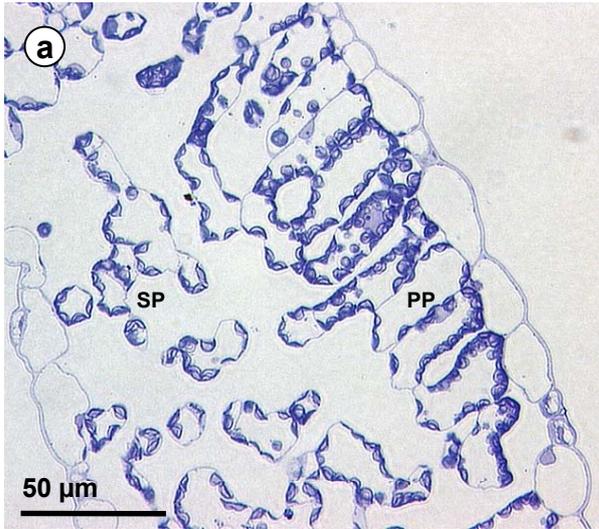


Bildseite XVI (rechts)

Histologische und zytologische Untersuchungen nach CMV-Infektion auftretender Symptome an Tomatenpflanzen (15 d p.i.):

- (a) Querschnitt durch nicht infiziertes Blattgewebe. PP: Palisadenparenchym, SP: Schwammparenchym.
- (b) Querschnitt durch Blattgewebe mit Fadenblättrigkeit, Isolat C: Gehemmte Gewebedifferenzierung und kaum Interzellularräume, reduzierte Zellgröße, mehrreihiges Palisadenparenchym (PP). SP: Schwammparenchym.
- (c) Querschnitt durch Blattgewebe mit Fadenblättrigkeit, Isolat C: Reduzierte Gewebedifferenzierung und kollabierte Mesophyllzellen. PP: Palisadenparenchym, SP: Schwammparenchym.
- (d) Palisadenparenchymzellen aus Blattgewebe mit Fadenblättrigkeit, Isolat C: Zellen klein, dicht gepackt und mit ungewöhnlich viel Cytoplasma, Aggregate in Vakuolen (schwarze Pfeile), schmale Zellwände (weiße Pfeile).
- (e) Palisadenparenchymzelle aus Blattgewebe mit Fadenblättrigkeit, Isolat C: Fast ausschließlich Stromathylakoide (STh) in Chloroplasten, Aggregate in Vakuole (schwarzer Pfeil).
- (f) Palisadenparenchymzellen aus Blattgewebe mit Fadenblättrigkeit, Isolat C: Kollabierte Zelle.

Bildseite XVI

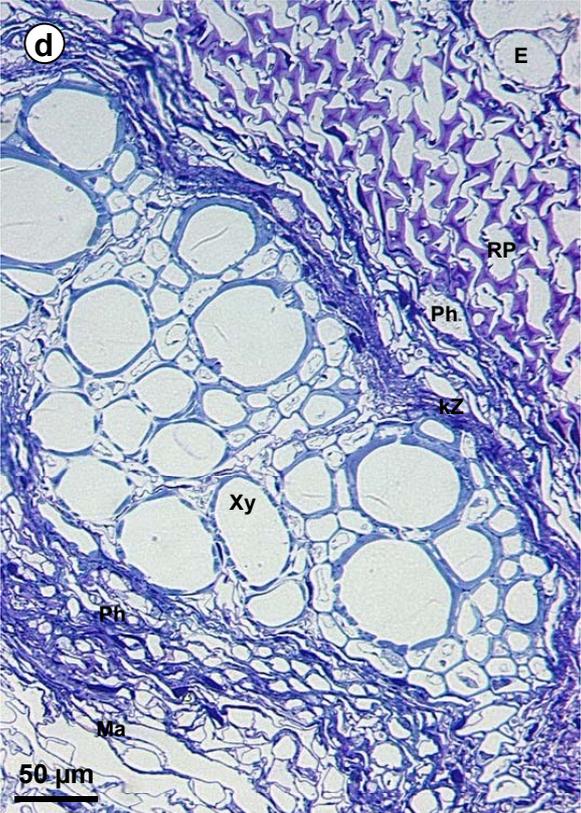
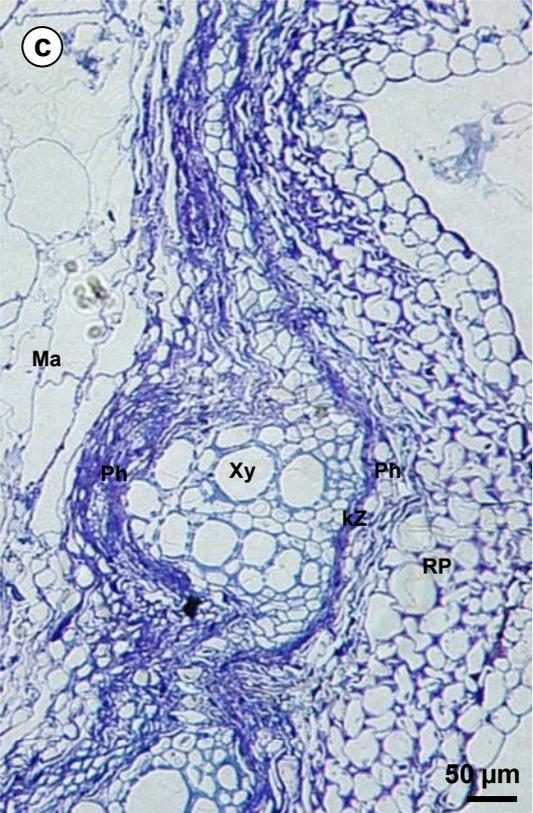
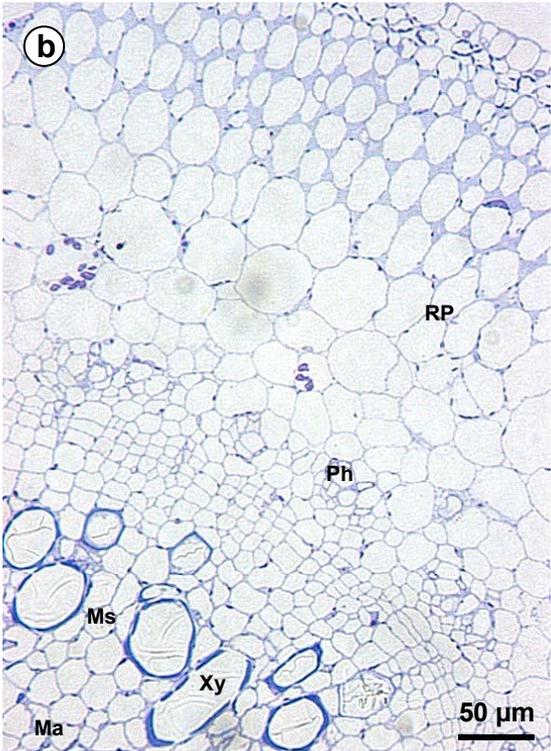
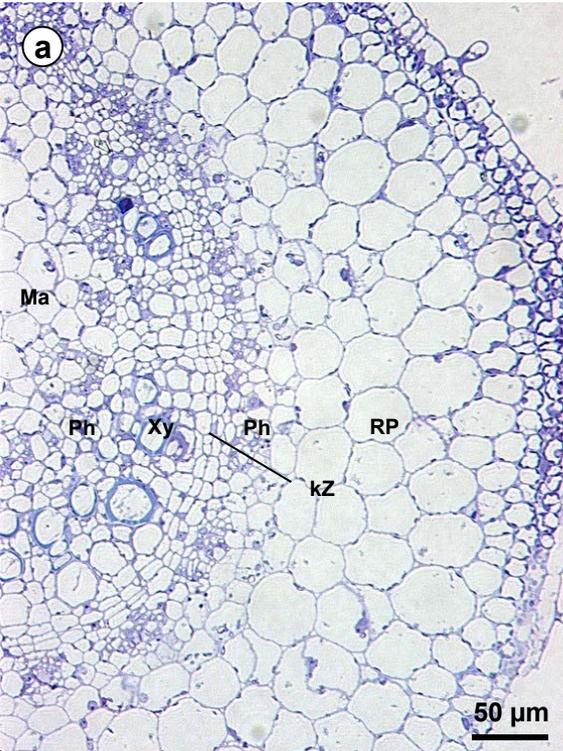


Bildseite XVII (rechts)

Histologische Untersuchungen nach CMV-Infektion auftretender Symptome an Tomatenpflanzen (15 d p.i.):

- (a) Querschnitt durch Stiel eines nicht infizierten Fiederblättchens. Ma: Mark, Ph : Phloem, Xy : Xylem, kZ : kambiale Zellen, RP : Rindenparenchym.
- (b) Querschnitt durch Stängel nicht infizierter Pflanzen. Ma: Mark, Ms: Markstrahlen, Ph : Phloem, Xy : Xylem, RP : Rindenparenchym.
- (c) Querschnitt durch nekrotisierten Stängel, Isolat C: Phloem (Ph), kambiale Zellen (kZ) und Teile des Rindenparenchyms (RP) nekrotisiert. Ma: Mark, Xy : Xylem.
- (d) Querschnitt durch nekrotisierten Stängel, Isolat C: Alle Zellen außer Xylem (Xy) und Epidermis (E) nekrotisiert. Ma: Mark, Ph: Phloem, kZ: kambiale Zellen, RP: Rindenparenchym.

Bildseite XVII



4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die vergleichende Untersuchung mehrerer CMV-Isolate bezüglich ihrer Entwicklung bzw. Schädigung an verschiedenen Wirtspflanzen unter möglichst standardisierten Bedingungen. Dazu waren die zu untersuchenden Isolate zunächst zu reinigen, um das Aufbringen einer definierten Virusmenge auf die Versuchspflanzen zu ermöglichen. Durch die Inokulationsmethode, d.h. das Auftragen geringer Mengen der Virussuspensionen in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Keimblätter, und die Inokulation aller zu vergleichenden Versuchspflanzen bzw. Isolate zur gleichen Zeit und unter den gleichen Bedingungen, konnte eine weitere Standardisierung erreicht werden. Anhand von Symptomausprägung, Pflanzenwachstum sowie fein- und ultrastruktureller Veränderungen nach Virusinfektion sollten die Auswirkungen der CMV-Isolate auf die Entwicklung der Versuchspflanzen dokumentiert werden. Des Weiteren war mittels ELISA der Einfluss verschiedener Wirtspflanzen auf die Virusvermehrung festzustellen. Zur Interpretation der Ergebnisse wurde eine molekularbiologische Typisierung der Isolate sowie ein Nachweis eventuell vorhandener Satelliten-RNA durchgeführt.

Für die Versuche wurden sechs dem Institut zur Verfügung stehende CMV-Isolate ausgewählt, von denen das Isolat 2 (S-CMV) (KAPER & WATERWORTH 1973, KAPER & DIAZ-RUIZ 1977) bereits bekannt war. Als Vergleichsstandard dienten die hinreichend beschriebenen Isolate K-CMV (TIEN *et al.* 1982, HELLWALD & PALUKAITIS 1994), Fny-CMV (ROOSSINCK & PALUKAITIS 1990, PALUKAITIS *et al.* 1992) und Q-CMV (FRANCKI 1964, FRANCKI *et al.* 1966). Die zahlreichen Isolate von CMV werden auf Basis biologischer und serologischer Eigenschaften sowie Übereinstimmungen in der Nukleinsäuresequenz in die zwei großen Untergruppen I (S-I) und II (S-II) aufgeteilt (PALUKAITIS *et al.* 1992, ROOSSINCK *et al.* 1999a). Neuere phylogenetische Analysen legen eine weitere Unterteilung der S-I-Isolate in die Gruppen IA und IB nahe. Dabei haben alle bisher beschriebenen S-IB-Isolate ihren Ursprung in Asien, während die Isolate der Gruppe IA und II weltweit verbreitet sind (ROOSSINCK *et al.* 1999b). Die Isolate K-CMV und Fny-CMV werden der Untergruppe I bzw. den Gruppen IB und IA, in dieser Reihenfolge, zugeordnet. Das Isolat Q-CMV wird zu der Untergruppe II gezählt (PALUKAITIS *et al.* 1992, ROOSSINCK *et al.* 1999b). Von mindestens einem Vertreter jeder Untergruppe sind mittlerweile die Sequenzen des gesamten Virusgenoms bekannt (PALUKAITIS *et al.* 1992, ROOSSINCK 2001). Bei den Isolaten Fny-CMV und Q-CMV sind alle Sequenzen bekannt, bei K-CMV die von RNA 2 und 3 (GOULD & SYMONS 1982, REZAIAN *et al.* 1984, 1985, RIZZO & PALUKAITIS 1988, 1989, 1990, PALUKAITIS *et al.* 1992, HELLWALD & PALUKAITIS 1994, ROOSSINCK *et al.* 1999b).

CMV kann die Replikation von Satelliten-RNA unterstützen. Die Satelliten mit einer Größe von 330 bis 405 Nukleotiden haben keine funktionellen ORFs (open reading frames), sind bezüglich Replikation und Enkapsidierung vollständig abhängig von ihren Helferviren und können das Erscheinungsbild der Viruserkrankung dramatisch verändern. Dabei besteht eine Drei-Wege-Interaktion zwischen Satelliten-RNAs, Helferviren

und Wirtspflanzen, deren genauen Zusammenhänge noch nicht geklärt sind (MOSSOP & FRANCKI 1978, 1979, ROOSSINCK & PALUKAITIS 1991, PALUKAITIS *et al.* 1992, ROOSSINCK *et al.* 1997). So wird z.B. die Replikation von WL1-Satelliten-RNA in Zucchini zwar von dem CMV-Isolat Fny, nicht aber von Sny, unterstützt. In Tabak findet aber auch in Assoziation mit Sny-CMV eine Replikation dieser Satelliten auf einem normalen Level statt (ROOSSINCK & PALUKAITIS 1991, ROOSSINCK *et al.* 1997). Allgemein ist die Replikation der meisten Satelliten-RNAs in *Solanaceen* sehr effizient und in *Curcubitaceen* gering, und zwar in Anwesenheit fast aller CMV-Stämme (KAPER & TOUSIGNANT 1977, MOSSOP & FRANCKI 1979, PALUKAITIS & ZAITLIN 1984).

In vielen Fällen führt die Coreplikation der Satelliten-RNA zu einer verminderten Replikation des Helferviren-Genoms, was in der Regel auch mit einer Reduktion der durch die Helferviren induzierten Krankheitssymptome einhergeht (KAPER & TOUSIGNANT 1977, MOSSOP & FRANCKI 1979, WATERWORTH *et al.* 1979, PALUKAITIS 1988, TIEN & WU 1991, PIAZZOLLA *et al.* 1998). Es gibt allerdings auch Ausnahmen, bei denen die Satelliten zu einer Verstärkung der Pathogenität der Helferviren führen. Letzteres wurde bisher an Tabak-, Paprika- und Tomatenpflanzen beobachtet (KAPER & TOUSIGNANT 1977, KAPER & WATERWORTH 1977, WATERWORTH *et al.* 1979, TAKANAMI 1981, GONSALVES *et al.* 1982, PALUKAITIS 1988, ROOSSINCK *et al.* 1992, SLEAT *et al.* 1994, PIAZZOLLA *et al.* 1998). Allerdings können sich Geno- und Phänotyp der Satelliten-RNA sehr leicht und schnell verändern (ARANDA *et al.* 1993, PALUKAITIS & ROOSSINCK 1996), weshalb die ausgedehnte Verwendung von CMV-Satelliten-RNA zur biologischen Kontrolle von CMV nicht unumstritten ist (TIEN & WU 1991)

Zur Einordnung der vorliegenden Arbeit in den Kontext anderer Untersuchungen war zunächst eine molekularbiologische Typisierung der CMV-Isolate durchzuführen. Die Multiplex-RT-PCR mit den Primern LS 2.2, LS 0.8 (REZAIAN *et al.* 1984) und FNY 1.8 (ANONYMOUS 1998) ermöglichte eine Zuordnung der Isolate 1, 4, K und Fny in die Untergruppe I (S-I) und der Isolate 2, 5, 10, 11 und Q in die Untergruppe II (S-II). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von ANONYMOUS (1998) wurde für die S-I-Isolate ein Fragment mit ca. 400 bp und für die S-II-Isolate ein Fragment mit 1400 bp amplifiziert. Durch die RT-PCR mit generellen CMV-Hüllprotein-Primern und anschließendem MspI-Verdau (RIZOS *et al.* 1992) konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Die Hüllprotein-Primer 3'CP (-) und 5'CP (+) basieren auf CMV-Q RNA3 und amplifizieren ein 870 bp Fragment aller CMV-Isolate. Untersuchungen der Nukleotid-Sequenz dieses DNA-Produktes zeigten, dass es das komplette CMV-Hüllprotein-Gen enthält (RIZOS *et al.* 1992). Ein solches Fragment konnte für alle verwendeten Isolate nachgewiesen werden. Eine zweite blässere Bande von einem DNA-Produkt mit ca. 820 bp, die in den Untersuchungen von RIZOS *et al.* (1992) und ANONYMOUS (1998) bei den meisten getesteten CMV-Isolaten auftrat, wurde in den eigenen Untersuchungen nicht sichtbar. Dieses kleinere Fragment scheint von der CMV-RNA 2 auszugehen (RIZOS *et al.* 1992).

Die Elektrophorese nach Restriktion mit MspI ergab zwei charakteristische Bandenmuster. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von RIZOS *et al.* (1992) und ANONYMOUS (1998) wurden bei den Isolaten der Untergruppe I zwei Restriktions-Fragmente mit ca. 540 bzw. 340 bp, bei den Isolaten der Untergruppe II vier Fragmente mit ca. 250, 200, 160 und 130 bp sichtbar. In ANONYMOUS (1998) wurde ein abweichendes Bandenmuster bei einigen der 44 untersuchten CMV-Isolate beobachtet, die als S-I α , S-I β , S-I γ und nonI-nonII bezeichnet wurden. Bei S-I α und S-I β traten ähnliche Muster wie bei den Isolaten der Untergruppe I auf, doch war bei S-I α - und S-I β -Isolaten das 340 bp große Fragment durch ein kleineres, bei den S-I β -Isolaten zusätzlich das 540 bp große Fragment durch ein größeres Fragment ersetzt. Die Restriktion der S-I γ -Isolate ergab drei Banden, wobei die mittlere auf gleicher Höhe der zweiten Bande der S-I α - und S-I β -Isolate lag. Bei der Elektrophorese der nonI-nonII-Isolate wurden vier Banden sichtbar, welche weder mit denen der Isolate der Untergruppe I noch mit denen der Untergruppe II korrespondierten. Allerdings wurde für alle diese Isolate, wie für die SI-Isolate mit dem für die Isolate der Untergruppe I spezifischen Primerpaar LS 2.2 / FNY 1.8, ein charakteristisches Fragment amplifiziert. Mit dem Primerpaar LS 2.2 / LS 0.8 wurde nur bei den Isolaten der Untergruppe II ein spezifisches Fragment in der Elektrophorese dargestellt. Obwohl die auch in dieser Arbeit verwendeten Isolate K-CMV und Fny-CMV von ANONYMOUS (1998) der Gruppe S-I α bzw. S-I zugeordnet wurden, konnten solche Unterschiede im Bandenmuster zwischen den Isolaten der Untergruppen I in den eigenen Untersuchungen nicht festgestellt werden.

In Anbetracht des Einflusses von Satelliten auf das Helfervirus sowie die Symptomausprägung infizierter Pflanzen, waren die Isolate auch auf das Vorhandensein von Satelliten-RNA zu prüfen. Die RT-PCR mit Primern zum generellen Nachweis von CMV-Satelliten-RNA ergab, dass alle in den Versuchen eingesetzten CMV-Isolate mit Satelliten-RNA assoziiert waren. Für jedes Isolat wurde, wie für die Positivkontrolle (CMV mit Carna5), ein ca. 280 bp großes Fragment amplifiziert. Um welche Satelliten-RNA es sich jeweils handelte, konnte mit den verwendeten Primern CMVsat53S und CMVsat256C nicht geklärt werden (S. WINTER, pers. Mitt).

Abgesehen von vereinzelt regional und zeitlich begrenzten Epidemien tritt CMV-Satelliten-RNA unter natürlichen Bedingungen auf dem Feld nur selten auf (KEARNEY *et al.* 1990, PALUKAITIS *et al.* 1992, ARANDA *et al.* 1993, ALONSO-PRADOS *et al.* 1998, ESCRIU *et al.* 2000, GARCÍA-ARENAL *et al.* 2000). Dagegen sind sie für ihr spontanes und häufiges Auftreten in Gewächshausversuchen mit CMV bekannt. So erhielten viele CMV-Isolate, die in Gewächshausversuchen wiederholt auf Pflanzen inokuliert wurden, welche die Replikation von Satelliten-RNA unterstützen, wie z.B. Tabak und *N. clevelandii*, letztendlich Satelliten-RNA (GOULD *et al.* 1978, GARCIA-LUQUE *et al.* 1984, PALUKAITIS *et al.* 1992, ROOSSINCK *et al.* 1992). Über die Ursachen dieses Phänomens gibt es bisher nur einige Hypothesen, die von PALUKAITIS *et al.* (1992) zusammengefasst werden. Als mögliche Gründe werden eine vermehrte Replikation bereits unterschwellig vorhandener Satelliten-RNA unter günstigen Bedingungen, die leichtere Übertragung von Satelliten auf mechanische Art sowie ein *de no-*

vo Auftreten aus genetischem Material der Helferviren oder Wirtspflanzen diskutiert. Doch unabhängig von den tatsächlichen Zusammenhängen ist es nicht ungewöhnlich, dass alle in den eigenen Untersuchungen verwendeten Isolate, die zu Erhaltung und Vermehrung schon zahlreiche Passagen über Tabak und andere *Nicotiana*-Arten im Gewächshaus durchgemacht haben, mit Satelliten-RNA assoziiert waren.

Durch die Analyse der doppelsträngigen RNA konnte die Replikationssituation in den infizierten Pflanzen erfasst werden. Bei ssRNA-Viren tritt während ihrer Replikation in den Pflanzenzellen doppelsträngige RNA als Replikationsform der Virus-RNA auf, welche in infizierten Pflanzen, unabhängig von deren Art, immer vorhanden ist. Bei der Darstellung der dsRNA-Profile in der Elektrophorese wird ein für die jeweilige Virusgruppe charakteristisches Bandenmuster sichtbar, welches auf Anzahl und Molekulargewicht der dsRNA-Segmente basiert (VALVERDE *et al.* 1986, VALVERDE *et al.* 1990). Die dsRNAs viraler Satelliten können mit dieser Methode ebenfalls erfasst werden. Bei CMV-infizierten Pflanzen werden in der Elektrophorese die drei genomischen RNAs 1, 2 und 3 sowie die subgenomische RNA 4 dargestellt (VALVERDE *et al.* 1990). Das ungefähre Molekulargewicht der dsRNA-Segmente von CMV und Carna5 wurden anhand ihrer Migration durch ein Polyacrylamid-Gel definiert (KAPER & DIAZ-RUIZ 1977, VALVERDE *et al.* 1986).

Die Isolierung von dsRNA aus infizierten Tabakpflanzen und die Darstellung der dsRNA-Profile in der Elektrophorese zeigte bei allen Isolaten das für CMV typische Muster aus 4 Banden. Die Satelliten waren als kleinere Moleküle ebenfalls in der Elektrophorese sichtbar, womit der positive Nachweis der Satelliten-RNA mittels RT-PCR bei allen Isolaten bestätigt werden konnte. Die im Vergleich zu den Banden viraler dsRNA wesentlich stärker ausgeprägten Banden für die dsSatelliten-RNA ließen zudem auf ein hohes Niveau der Akkumulation von Satelliten-RNA in den infizierten Tabakpflanzen schließen. Dass sich Satelliten-RNA sehr stark in infizierten Pflanzen akkumulieren kann und dabei oft sogar die Menge an viraler RNA übersteigt, ist nicht ungewöhnlich (PALUKAITIS & ZAITLIN 1984, PALUKAITIS *et al.* 1992). Zusätzlich wurden bei allen Isolaten außer den Isolaten 1 und Fny eine weitere schwache dsRNA-Bande mit einer Größe von ca. 650 bp dargestellt, deren Ursache unbekannt ist. Doppelsträngige RNAs ungeklärten Ursprungs, die weder den CMV-RNAs 1, 2, 3 und 4 noch Satelliten-RNA zugeordnet werden können, wurden auch von VALVERDE *et al.* (1990) in CMV-infizierten Pflanzen detektiert und scheinen bei einigen Isolaten konsequent aufzutreten. Obwohl dsRNA in der Regel nur in infizierten Pflanzen nachgewiesen werden kann, gibt es in Abhängigkeit der Pflanzenart einige Ausnahmen. Solche nicht-virale, zelluläre dsRNA tritt z.B. in gesunden Paprika-, nicht aber in Tabakpflanzen, auf (VALVERDE *et al.* 1990).

CMV hat mit über 1000 Wirtspflanzenarten aus mehr als 85 Pflanzenfamilien den größten Wirkkreis aller bekannten Viren, darunter Mono- und Dikotyledonen, krautige Pflanzen, Sträucher, Gehölze, Unkräuter sowie Nutz- und Zierpflanzen (MEYER-KAHSNITZ 1993, PALUKAITIS *et al.* 1992, ROOSSINCK *et al.* 1999a., ROOSSINCK *et al.* 2002). Darunter gibt es auch einige Pflanzen, die nicht von allen CMV-Isolaten

infiziert bzw. systemisch infiziert werden, wie z.B. Mais (RAO & FRANCKI 1982, ZHANG & PALUKAITIS 1993), *Lactuca saligna* (EDWARDS & GONSALVES 1983, EDWARDS *et al.* 1983), *Vigna unguiculata* (EDWARDS *et al.* 1983, LAKSHMAN & GONSALVES 1985, DANIELS & CAMPBELL 1992), *Vicia faba* (RAO & FRANCKI 1982) und *Phaseolus vulgaris* (EDWARDS & GONSALVES 1983).

In dieser Arbeit sollten Unterschiede im Krankheitsverlauf nach erfolgreicher systemischer Infektion mit den CMV-Isolaten untersucht werden. Die für die Versuche verwendeten CMV-empfindlichen Pflanzen mussten sich für die Inokulationsmethode sowie die Durchführung der Versuche im Gewächshaus eignen. Die *Nicotiana*-Arten wurden sowohl aufgrund ihrer charakteristischen Symptomausprägung nach CMV-Infektion als auch zur Vermehrung der Isolate verwendet. Tomate, Paprika, Gurke und Feldsalat sind wichtige Nutzpflanzen, bei deren Kultur CMV zu Problemen führen kann. Von TOMLINSON (1987) wird CMV als das Virus mit größter ökonomischer Bedeutung in Sellerie, Kuhbohne, *Cucurbitaceen*, Salat, Paprika und Tomate aufgelistet.

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die vorliegenden Untersuchungen war die Herstellung von Inokula mit definierter Viruskonzentration. Die beste Möglichkeit ein Inokulum mit vergleichbarem Virustiter zu erhalten, ist eine Virusreinigung mit anschließender photometrischer Messung der Viruskonzentration (HELLWALD, pers. Mitt.). Dabei zeigte sich, dass schon bei Vermehrung und Reinigung der CMV-Isolate deutliche Unterschiede zwischen den Isolaten auftraten. Eine erfolgreiche Virusisolierung ist von zahlreichen Faktoren wie den Wirtspflanzen, Zeitintervall zwischen Inokulation und Ernte sowie dem Virus-Isolat abhängig und Unterschiede in der Effektivität einer Reinigungsmethode je nach CMV-Isolat wurden schon des öfteren beobachtet (PALUKAITIS *et al.* 1992, HULL 2002, J. HAMACHER, pers. Mitt.). Als bester Wirt zur Vermehrung der meisten CMV-Isolate gilt *N. clevelandii*, aber auch *N. tabacum*, *N. glutinosa*, *Cucumis sativus* und *Cucurbita pepo* werden verwendet (PALUKAITIS *et al.* 1992). Aufgrund des langsamen Wachstums von *N. clevelandii* und der weniger deutlichen systemischen Symptome erfolgte bei den eigenen Versuchen die Vermehrung der CMV-Isolate an *N. tabacum* „Samsun-NN“ und *N. rustica*. Auch *N. glutinosa* wurde als Vermehrungspflanze getestet, stellte sich aber als nicht geeignet heraus, da trotz starker Symptome die Virusausbeute sehr gering war.

Besonders bei den S-I-Isolaten wurden mit der angewendeten Methode, modifiziert nach SCOTT (1963), zunächst nur sehr geringe Viruserträge erzielt. Mittels Biotest der während der Reinigung anfallenden Fraktionen konnten hohe Virusverluste insbesondere in der organischen Phase bzw. bei den niedertourigen Zentrifugationen bestätigt werden. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der Zusammenlagerung der Viruspartikel zu größeren Aggregaten und damit einhergehenden veränderten Sedimentationseigenschaften (HAMACHER, pers. Mitt.). Durch mehrmaliges Waschen der organischen Phase konnten die Reinigungsergebnisse wesentlich verbessert und Viruserträge von 0,1 bis 1,1 mg Virus / g Blattmaterial erzielt werden. Dabei wurden bei den Isolaten der Untergruppe I in der Regel wesentlich höhere Erträge erzielt als bei den Isolaten der

Untergruppe II, was auf eine stärkere Vermehrung der S-I-Isolate in den verwendeten Wirten schließen ließ.

Für eine umfassende vergleichende Bewertung der wirtsschädigenden Wirkung der neun CMV-Isolate wurde der Einfluss der Infektion auf Symptomausprägung, Wachstum, Chlorophyllgehalt und Fruchtansatz verschiedener Wirtspflanzen untersucht. In gezielten Versuchen wurde zudem die Bedeutung von Inokulumdichte, Pflanzensorte sowie der Nährstoffversorgung für den Krankheitsverlauf geprüft. Bei der Erfassung und Bewertung der Symptome war zu unterscheiden zwischen lokalen Symptomen am Ort der Inokulation und den systemischen Symptomen, welche nach Transport der Viren in den nachwachsenden Pflanzenteilen auftreten. Die Virus-Wirt-Kombination entscheidet darüber, ob lediglich lokale, systemische oder beide Arten von Symptomen ausgebildet werden (MEYER-KAHSNITZ 1993).

Lokale Symptome sind in der Regel nicht von ökonomischer Bedeutung aber wichtig bei der biologischen Differenzierung von Viren. An inokulierten Blättern können chlorotische oder nekrotische Läsionen auftreten, die sich in Form und Schärfe der Abgrenzung unterscheiden können. Neben der Art der Läsionen dient oft das Auftreten oder Ausbleiben lokaler Symptome an bestimmten Wirtspflanzen als Differenzierungsmerkmal. Dabei bedeutet das Erscheinen lokaler Läsionen unter Versuchsbedingungen bzw. nach mechanischer Inokulierung nicht automatisch, dass diese Symptome auch unter natürlichen Bedingungen, z.B. nach Aphiden-Übertragung, auftreten (AGRIOS 1997, HULL 2002). Unter den gegebenen Versuchsbedingungen konnten auf Paprika-, Tomaten- und Feldsalatpflanzen in keinem Fall lokale Symptome beobachtet werden. Die inokulierten Laubblätter der *Nicotiana*-Arten sowie die fleischigen Keimblätter der Gurke zeigten dagegen oft deutliche Lokalläsionen, wie sie in der Literatur auch hinreichend beschrieben werden (MEYER-KAHSNITZ 1993, ZHANG *et al.* 1994, ŠUTIĆ *et al.* 1999). Für einen Vergleich der CMV-Isolate eignete sich die Bonitur lokaler Symptome weder bei den *Nicotiana*-Arten noch bei den Gurkenpflanzen, da sie sich in Zeitpunkt und Dauer ihres Auftretens sowie teilweise auch in ihrer Ausprägung, unabhängig von dem jeweiligen CMV-Isolat, sehr unterscheiden.

Dementsprechend divergent sind auch die Daten in der Literatur zu diesem Thema. So sollen LS-CMV und die meisten anderen S-II-Isolate nekrotische Ringflecken auf den inokulierten Tabakblättern induzieren, während nach Infektion mit Fny-CMV und den meisten anderen S-I-Isolaten keine lokalen Nekrosen auftreten (ZHANG *et al.* 1994). Bei ANONYMOUS (1998) wird dagegen von deutlichen, allerdings nicht näher beschrieben, lokalen Symptomen an Tabak nach Inokulation mit Fny-CMV berichtet, aber nicht nach Inokulation mit K-CMV. Für die Isolate der Untergruppe II wurden meistens, aber nicht immer, lokale Symptome festgestellt. Von den 9 in dieser Arbeit verwendeten Isolaten induzierten alle 5 S-II-Isolate nekrotische Ringflecken an *N.tabacum* „Samsun-NN“. Bei K-CMV, Fny-CMV und den anderen S-I-Isolaten zeigten sich zwar oft keine, in einigen Fällen aber ebenfalls chlorotische oder nekrotische Lokalläsionen. An *N. glutinosa* traten nach Inokulation mit den Isolaten der Untergruppe II stets lokale Symptome auf, wohingegen in keinem der Versuche eine lokale Reaktion auf die Isolate

der Untergruppe I festgestellt wurde. Das wird für K-CMV und Fny-CMV in ANONYMOUS (1998) bestätigt, aber für zahlreiche S-I-Isolate wird wiederum das Erscheinen lokaler Symptome an *N. glutinosa* angegeben und nicht alle der dort getesteten S-II-Isolate induzierten lokale Symptome.

Eine systemische Infektion kann unter den entsprechenden Bedingungen völlig ohne offensichtliche pathologische Veränderungen des Wirtes ablaufen, aber auch zu einem schnellen Absterben der gesamten Pflanze führen (AGRIOS 1997, HULL 2002). Dazwischen gibt es eine Vielzahl möglicher krankhafter Veränderungen, die an Blatt, Stängel, Blüte, Frucht und Wurzel auftreten und die Wirtspflanzen mehr oder weniger schädigen können (MEYER-KAHSNITZ 1993, HULL 2002). Dabei treten die verschiedenen Symptome je nach Virus und Wirt in spezifischer Kombination und/oder Reihenfolge auf (HULL 2002). Schwere Symptome haben für gewöhnlich dementsprechende Wachstumsdepressionen zur Folge, insbesondere wenn ein Chlorophyllmangel der Blätter vorliegt (AGRIOS 1997, HULL 2002). Leichte Wachstumsreduktionen treten wahrscheinlich auch in maskierten oder latenten Infektionen auf, wenn ansonsten kein pathologischen Veränderungen zu beobachten sind. Häufig sind Blattflächen und Internodien reduziert, wohingegen die Anzahl der Blätter nur geringfügig beeinträchtigt wird (HULL 2002). Bei einer Verkürzung der Internodien spricht man von Stauchung oder in seiner extremsten Form von Rosettenwachstum. Bei zwergwüchsigen Pflanzen sind nicht nur die Internodien verkürzt, sondern alle Pflanzenorgane sind in ihrem Wachstum reduziert, so dass die Proportionen nicht übereinstimmen (MEYER-KAHSNITZ 1993). Die meisten auftretenden Veränderungen sind zwar typisch, aber nicht spezifisch für Virusinfektionen und können auch andere biotische und abiotische Ursachen haben. Systemische Infektionen sind in der Regel mit Ertrags- und Qualitätseinbußen oder zu mindestens mit einer Vitalitätsminderung der betroffenen Pflanzen gekoppelt (MEYER-KAHSNITZ 1993, AGRIOS 1997, HULL 2002).

Entsprechend dem großen Wirtspflanzenkreis ist auch die Vielfalt der durch CMV ausgelösten systemischen Symptome enorm. Je nach Wirtspflanze können alle Pflanzenorgane betroffen sein und die möglichen Wirtsreaktionen reichen von keinen sichtbaren Veränderungen bis zu systemischen Nekrosen der kompletten Pflanze (MARTELLI & RUSSO 1985, PALUKAITIS *et al.* 1992, AGRIOS 1997). Das Virus kann z.B. an Spinat und Tomaten zu starken Ausfällen bzw. zum Zusammenbruch der ganzen Pflanzen führen, tritt aber auch latent in einigen Obstgehölzen auf (MEYER-KAHSNITZ 1993). In den vorliegenden Untersuchungen zeigten sich individuell für ein Isolat oder für eine Gruppe von Isolaten große Unterschiede sowohl in der Art der Symptome als auch in der Schwere der pathologischen Veränderungen. Die Vielfältigkeit und Unterschiedlichkeit der auftretenden Symptome, selbst innerhalb einer Wirtsart, machte eine vergleichende Einschätzung der Wirtspflanzenbeeinträchtigung sehr schwierig. Individuell für jedes Virus-Wirt-System entwickelte Boniturschemata, in denen sowohl die virusinduzierten Blatt- und Wuchsabnormalitäten als auch eine eventuelle Reduktion des Pflanzenwachstums berücksichtigt wurden, gestatteten eine möglichst objektive Beurteilung. Um auch weniger augenfällige Wuchsdepressionen zu erfassen wurde je nach Wirtspflanzenart die Pflanzenlänge, Anzahl der Blätter und die Trockenmasse der

infizierten Pflanzen bestimmt. Neben Virus- und Wirtsgenom wird der Krankheitsverlauf noch durch Umweltfaktoren beeinflusst. Aufgrund dieser Interaktionen und der zahlreichen unterschiedlichen Symptome ist es unter natürlichen und experimentellen Bedingungen schwierig, beständige Muster in der Symptomausprägung zu erkennen (MARTELLI & RUSSO 1985).

Die teilweise vertretene Auffassung, dass die Isolate der Untergruppe I generell schwerere Symptome induzieren als die der Untergruppe II (HAACK & RICHTER 1987, HAASE *et al.* 1989, HORD *et al.* 2001), konnte in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Zwar waren bei einigen der verwendeten Wirtspflanzenarten auch Untergruppen-spezifische Unterschiede in der Symptomausprägung zu beobachten, doch in den meisten Virus-Wirt-Systemen traten deutliche Unterschiede zwischen den Isolaten bezüglich des Krankheitsverlaufs auf, ohne dass ein Zusammenhang mit der Untergruppenzugehörigkeit festzustellen war. In den von DANIELS & CHAMPBELL (1992) durchgeführten Untersuchungen werden die Wirtspflanzen *Vigna unguiculata* und *N. glutinosa* als geeignet zur Identifizierung der CMV-Untergruppen beschrieben, während die ebenfalls verwendete Paprikasorte „Yolo Wonder B“ in diesem Zusammenhang nicht erwähnt wird. Bei den eigenen Versuchen war eine solche Unterscheidung nur an genannter Paprikasorte und an *N. rustica* möglich. Die induzierten Reaktionen an *N. glutinosa* und allen anderen verwendeten Pflanzenarten und -sorten ließen eine eindeutige Differenzierung der CMV-Isolate in Untergruppen nicht zu.

In Abhängigkeit von Paprikasorte und CMV-Isolat werden als mögliche Symptome Ringflecken, chlorotisches Mosaik, gelbe Flecken, Nekrosen, Blattvershmälerungen, Hervorhebung der Blattaderung, Stauchungen, mangelnde Fruchtbildung sowie die Ausbildung kleiner und missgebildeter Früchte, häufig mit Nekrosen an der Oberfläche und teilweise untypisch verlängerten Fruchtstielen, beschrieben (MEYER-KAHSNITZ 1993, ŠUTIĆ *et al.* 1999). In den eigenen Versuchen waren nach Inokulation mit den Isolaten der Untergruppe II leichte Blattverfärbungen oder keine offensichtlichen Reaktionen der Pflanzen festzustellen, während die Isolate der Untergruppe I, insbesondere die Isolate 4 und K-CMV, starke Blattdeformationen, Wuchsdepressionen sowie eine signifikante Reduktion der Fruchtbildung induzierten. Die gestörte Fruchtbildung wird auf Missbildungen der Blüten sowie Pollensterilität zurückgeführt (ŠUTIĆ *et al.* 1999). Insgesamt war eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Blattdeformationen, Stauchungen und gestörter generativer Entwicklung festzustellen. Dagegen stellten KEARNEY *et al.* (1990) und RODRÍGUEZ-ALVARADO *et al.* (1995) an Paprika, welche mit Isolaten der Untergruppe II infiziert waren, auch schwere Symptome, wie Blattdeformationen und Stauchungen, fest. Milde Symptome konnten in den Untersuchungen von RODRÍGUEZ-ALVARADO *et al.* (1995) aber nur nach Infektion mit S-II-Isolaten festgestellt werden und S-CMV induzierte wie in der vorliegenden Arbeit ein mildes Mosaik. Das völlige Ausbleiben von Symptomen nach CMV-Infektion wird nicht erwähnt

Die an *N. rustica* beobachteten charakteristischen Unterschiede in der Symptomausprägung sind hinreichend bekannt. Nach Infektion mit den Isolaten der Untergruppe I war

ein je nach Isolat mehr oder weniger kontrastreiches Mosaik aus dunkelgrünen, blasigen Auftreibungen und chlorotischen Blattbereichen charakteristisch. Blatt- und Wuchsdeformationen konnten auch auftreten. Dagegen induzierten die Isolate der Untergruppe II in erster Linie ölig glänzende interkostale Chlorosen. Dabei schienen die Pflanzen durch eine Infektion mit den S-I-Isolaten intensiver beeinträchtigt als durch die S-II-Isolate.

DANIELS & CAMPBELL (1992) berichten in ihren Untersuchungen kalifornischer CMV-Isolate, dass alle S-II-Isolate an *N. glutinosa* systemische Nekrosen induzierten, die zum Absterben junger Pflanzen führten, während die S-I-Isolate systemische Mosaiksymptome hervorriefen. Obwohl die Pflanzen in den hier durchgeführten Versuchen in einem sehr frühen Stadium und mit hoher Viruskonzentration (0,1 mg Virus/ml) inokuliert wurden, konnten letale Nekrosen an *N. glutinosa* in keinem Fall beobachtet werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von ANONYMOUS (1998) waren auch keine Untergruppen-spezifischen Unterschiede in der Symptomausprägung festzustellen. Dagegen stellten SINGH *et al.* (1995) nach Infektion mit S-I-Isolaten deutliche Blattkräuselungen und -deformationen, nach Infektion mit S-II-Isolaten mildes Mosaik und nur vereinzelte deformierte Blätter an *N. glutinosa* fest. Neben den je nach Virusstamm an *N. glutinosa* auftretenden schwachen bis starken Mosaiksymptomen, Adernvergilbungen und Blattdeformationen (RAO & FRANCKI 1982, MEYER-KAHSNITZ 1993, SINGH *et al.* 1995), konnten auch Kräuselungen bzw. blasige Auftreibungen an den Blättern erscheinen (BRUCKART & LORBEER 1976, SINGH *et al.* 1995). Des weiteren induzierten die S-II-Isolate 5, 10 und 11 und das S-I-Isolat K-CMV vor allem schwere Wuchsdepressionen sowohl an *N. glutinosa* als auch an *N. clevelandii*. Dagegen konnte weder bei *N. rustica* noch bei *N. tabacum* „Samsun-NN“ ein Einfluss der CMV-Infektion auf das Pflanzenwachstum festgestellt werden.

An *N. tabacum* „Samsun-NN“ zeigten sich die üblichen an Tabak beschriebenen systemischen Chlorosen bzw. Verfärbungen der Blätter (MEYER-KAHSNITZ 1993, ZHANG *et al.* 1994, ŠUTIĆ *et al.* 1999), die mit Ausnahme von Fny-CMV nach Infektion mit den S-I-Isolaten stärker ausgeprägt waren. Während nach ZHANG *et al.* (1994) die meisten S-II-Isolate eine milde systemische Sprenkelung und die S-I-Isolate in der Regel schweres systemisches Mosaik an Tabak verursachen, wurden die 44 getesteten CMV-Isolate in ANONYMOUS (1998) bezüglich der Symptomausprägung an Tabak unabhängig von der Untergruppenzugehörigkeit sehr unterschiedlich eingestuft. So wurden z.B. für Fny-CMV (S-IA) schwere und für K-CMV (S-IB) milde Symptome festgestellt. Dagegen bonitierten RAO & FRANCKI (1982) an Tabak der Sorte „White Burley“ nach Infektion mit K-CMV wiederum schweres systemisches Mosaik und Blattdeformationen. In den eigenen Untersuchungen induzierte K-CMV schwere Symptome, während die Veränderung nach Infektion mit Fny-CMV relativ moderat bzw. ähnlich stark wie nach Infektion mit dem S-II-Isolat S-CMV ausfielen, das von den hier verwendeten Isolaten der Untergruppe II die stärksten Reaktionen an Tabak und *N. rustica* verursachte, bei DODDS & LEE (1984) aber von allen Isolaten die mildesten Symptome an Tabak und anderen Wirtspflanzen induzierte.

Mosaik, Blattvershmälerungen bzw. Fadenblättrigkeit und Wachstumshemmungen werden als typische Symptome an Tomatenpflanzen nach CMV-Infektion beschrieben (MEYER-KAHSNITZ 1993, ŠUTIĆ *et al.* 1999). Im Rahmen einer Erhebung in New York und auf den Bermudas wurde eine große Variabilität der Symptomausprägung CMV-infizierter Tomatenpflanzen, von keinen sichtbaren Reaktionen über leichte Kräuselungen oder Vergilbungen, Mosaik bis zu schweren Deformationen, festgestellt (KEARNEY *et al.* 1990). Nach Infektion mit den S-II-Isolaten 10, 11 und Q-CMV kam es bei Bildung von Stängelnekrosen und dem Absterben der Triebspitzen schon früh zu einem Wachstumsstillstand und schließlich zum Zusammenbruch der ganzen Pflanze. Solche irreversiblen Schäden an Tomaten werden im Zusammenhang mit Satelliten-RNA (MEYER-KAHSNITZ 1993, SLEAT *et al.* 1994, GALLITELLI 2000) sowie als Reaktion auf virulente CMV-Stämme genannt (ŠUTIĆ *et al.* 1999). Die Assoziation des auch als „tomato lethal necrosis disease“ bezeichneten Krankheitsverlaufes mit den Isolaten der Untergruppe II (CRESCENZI *et al.* 1993, GALLITELLI 2000) wurde durch die Beobachtungen bei den Isolaten 10, 11 und Q-CMV bestätigt. Die ebenfalls der Untergruppe II zugeordneten Isolate 2 und 5 induzierten allerdings nur leichte Blattverfärbungen. Starke Wuchsdeformationen sowie deutliche Wachstumshemmungen traten auch nach Infektion mit den S-I-Isolaten K-CMV und Fny-CMV auf.

Mosaik, Fadenblättrigkeit und Wachstumsdepressionen an infizierten Tomaten sowie unabhängig von der Untergruppenzugehörigkeit auftretende Unterschiede in der Schwere der Symptomausprägung wurden auch von HELLWALD *et al.* (2000) bei vergleichenden Untersuchungen einer Auswahl von S-I-Isolaten festgestellt. Dabei verursachten die Isolate Fny-CMV, T-CMV, Le-CMV und MB-CMV mildere Symptome als die Isolate K-CMV, PRC-CMV und NT-CMV. In den vorliegenden Versuchen induzierte das Isolat K-CMV zwar schwerere Wuchsdepressionen als Fny-CMV. Letzteres verursachte aber für gewöhnlich zusätzlich extreme Wuchsabnormalitäten in Form verdrehter Blätter und Blattstängel sowie gestauchter bzw. verkümmelter Triebspitzen, die den Pflanzen eine ungewöhnlich buschige Erscheinung gaben. Dieses Krankheitsbild wird auch als „tomato top stunting“ oder „curl stunt“ nach Infektion von Freilandtomaten im Mittelmeerraum mit Isolaten der Gruppe S-IB in Assoziation mit Satelliten-RNA beschrieben (JORDÁ *et al.* 1992, GALLITELLI 2000). Bei den betroffenen Pflanzen ist mit drastischen Ertragsverlusten zu rechnen. Die wenigen Früchte sind kleiner und unregelmäßig abgereift und daher oft nicht zu vermarkten (GALLITELLI 2000). Die Verwendung der Trockenmasse-Reduktion als Parameter für die Schwere der Symptome CMV-infizierter Tomatenpflanzen (HELLWALD *et al.* 2000) scheint daher nicht in allen Fällen ausreichend zur Einschätzung der Wirtspflanzenbeeinträchtigung. Auch nach Infektion mit dem S-I-Isolat 4 traten deutliche Blattdeformationen auf, welche nicht in einer Wachstumsreduktion resultierten.

Ebenfalls problematisch sind Rückschlüsse auf die tatsächlich zu erwartenden Verluste aufgrund der Symptomausprägung, was das Beispiel der CMV-induzierten als „tomato fruit necrosis“ oder „internal browning“ bezeichneten Krankheit demonstriert (JORDÁ *et al.* 1992, CRESCENZI *et al.* 1993). Dabei kommt es zu ausgedehnten Nekrosen im Fruchttinneren. Bei alleiniger Infektion mit dem entsprechendem CMV-Isolat zeigen die

Pflanzen zusätzlich die charakteristische Fadenblättrigkeit. In Assoziation mit einer als Tfn-satRNA bezeichneten Satelliten-RNA treten aber ansonsten keine verdächtigen Anzeichen einer Erkrankung auf, was zu enormen ökonomischen Verlusten führen kann (CRESCENZI *et al.* 1993, GALLITELLI 2000). Die Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit mehrerer Parameter für vergleichende Untersuchungen dieser Art sowie die Schwierigkeit, das Schädigungspotential der zahlreichen CMV-Isolate einzuschätzen. Ein Zusammenhang zwischen Virus-induzierten Wachstumsdepressionen und einem Chlorophyllmangel der Blätter (HULL 2002) konnte ebenfalls in keinem der hier verwendeten Wirt-Virus-Systeme bestätigt werden. Bei keiner der mittels Spadmeter durchgeführten Messungen wurde ein signifikanter Einfluss der CMV-Infektion auf den Chlorophyllgehalt der Wirtspflanzen festgestellt.

Als Reaktion von Gurkenpflanzen auf eine CMV-Infektion werden lokale Chlorosen, systemisches Mosaik auf Blättern und Früchten, Wachstumshemmungen, unnatürliche Verzweigungen direkt an der Pflanzenbasis (Buschigkeit) und eine gehemmte Frucht- und Blütenbildung beschrieben (RAO & FRANCKI 1982, AHMAD & SCOTT 1985, MEYER-KAHSNITZ 1993, ŠUTIĆ *et al.* 1999). Im Vergleich mit den anderen Wirtspflanzenarten waren die durch die CMV-Isolate ausgelösten Schäden an Gurkenpflanzen relativ moderat und auch die Vielfalt möglicher Symptome war vergleichsweise eingeschränkt. Als systemische Reaktion wurden ein mehr oder weniger stark ausgeprägtes Mosaik der Blätter und teilweise eine Reduktion des Wachstums festgestellt. Der Einfluss der Infektion auf Fruchtbildung bzw. Früchte wurde nicht untersucht. Ein Zusammenhang zwischen der Gruppierung der Isolate und dem Krankheitsverlauf war wiederum nicht zu beobachten. Sowohl an der empfindlichen Sorte „Vorgebirgstraube“ als auch an der CMV-toleranten Sorte „Othello“ wurden die stärksten Reaktionen durch die S-I-Isolate K-CMV und Fny-CMV sowie die S-II-Isolate 5, 10 und 11 hervorgerufen, wobei die Symptome an der Sorte „Othello“ erwartungsgemäß deutlich milder ausfielen. Ein signifikanter Einfluss auf die Biomasse der Pflanzen konnte nur an der Sorte „Vorgebirgstraube“ und nur nach Infektion mit K-CMV nachgewiesen werden

Pflanzen können auch mit mehreren Viren gleichzeitig infiziert sein und dabei Symptome entwickeln, die keines der jeweiligen Viren allein induziert hätte (AGRIOS 1997). Auch zahlreiche Mischinfektionen mit CMV sind bekannt, die zu teilweise gravierenden Veränderungen im Krankheitsverlauf führen (PALUKAITIS & GARCÍA-ARENAL 2003). So sind z.B. in Tomate und Paprika die Ertragsverluste bei Mischinfektionen mit Potato Virus Y besonders hoch (MEYER-KAHSNITZ 1993, GALLITELLI 2000). Blütensterilität von Tomaten resultiert aus Mischinfektionen mit TMV (ŠUTIĆ *et al.* 1999). Mischinfektionen mit Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) induzierten Stauungen und Vergilbungen an Süßkartoffeln. In diesem Fall ist die Anwesenheit von SPFMV als Helfervirus in der Wirtspflanze sogar erforderlich für eine erfolgreiche Infektion mit CMV (COHEN *et al.* 1988).

Gemischte Infektionen mit CMV-Isolaten beider Untergruppen konnten ebenfalls nachgewiesen werden (QUIOT *et al.* 1979, KEARNEY *et al.* 1990, HORD *et al.* 2001). Das Auftreten untypischer Symptome wird dabei nicht erwähnt. Allerdings kommen ge-

mischte Infektionen mit verschiedenen CMV-Stämmen in der Natur vergleichsweise selten vor (PERRY *et al.* 1993, GALLITELLI 2000). Das gleiche gilt dementsprechend für Neukombinationen der Gene in natürlichen Populationen, wobei in diesem Fall als weiterer selektiv wirkender Faktor eine verminderte Aphiden-Übertragbarkeit diskutiert wird (ZITTER & GONSALVES 1991, FRAILE *et al.* 1997, GALLITELLI 2000, GARCÍA-ARENAL *et al.* 2000). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit gemischten Inokulationen zweier Isolate trat ebenfalls in keinem Fall ein Krankheitsbild auf, das sich von beiden inokulierten Isolaten wesentlich unterschied. Weder zwischen den Isolaten derselben Untergruppe noch zwischen denen beider Untergruppen konnte eine signifikante synergistische oder antagonistische Wechselwirkung nachgewiesen werden. Auch bei den Versuchen mit Pseudorekombinanten scheinen die Neukombinationen in der Regel die Eigenschaften eines der beiden Spender-Isolate zu zeigen (RAO & FRANCKI 1982, ZHANG *et al.* 1994, HELLWALD *et al.* 2000). Einige der in diesen Versuchen hergestellten Kombinationen entwickelten aber auch einzigartige bzw. neue Eigenschaften, die mit keinem der Isolate aus denen sie konstruiert wurden assoziiert werden konnten (RAO & FRANCKI 1982, PALUKAITIS *et al.* 1992).

Die Messdaten innerhalb einer Versuchsvariante variierten im allgemeinen sehr stark, so dass nicht immer signifikante Differenzen auftraten, auch wenn sich bei mehrmals wiederholten Versuchen reproduzierbare Unterschiede zeigten. HELLWALD *et al.* (2000) berichten bei ihren Versuchen mit Tomatenpflanzen von ähnlichen Problemen. Die Versuchswiederholungen zeigten des Weiteren, dass Zeitpunkt und Dauer der auftretenden CMV-induzierten Veränderungen auch innerhalb desselben Wirt-Isolat-Systems sehr unterschiedlich ausfallen konnten bzw. von anderen nicht Virus-spezifischen Faktoren stark beeinflusst wurden. Daher war ein Zusammenhang zwischen CMV-Isolat und der zeitlichen Abfolge der Symptome nicht herzustellen. Als Ausnahme wurde bei dem Isolat Q-CMV an allen verwendeten *Nicotiana*-Arten ein deutlich verlangsamter Krankheitsverlauf im Vergleich mit allen anderen Isolaten beobachtet. Bei den Isolaten Fny-CMV und Sny-CMV wurden aber deutliche Unterschiede in der Geschwindigkeit der Symptominduktion an Zucchini festgestellt. Fny-CMV induzierte schwere systemische Symptome 3 – 4 Tage nach Inokulation, während die mit Sny-CMV inokulierten Pflanzen nach 6 – 7 Tagen ein leichtes Mosaik zeigten (ROOSSINCK & PALUKAITIS 1990, GAL-ON *et al.* 1994).

Für Anzahl, Ausmaß und Dauer der auftretenden Veränderungen sind neben Virus- und Wirtsgenom aber auch äußere Faktoren, wie Licht, Temperatur und Ernährungszustand der Pflanzen von Bedeutung (MEYER-KAHSNITZ 1993, ELSTNER *et al.* 1996, AGRIOS 1997). Dass sich die Isolate der Untergruppe I und II in ihrer Thermoresistenz unterscheiden, ist hinreichend bekannt und wurde hier nicht untersucht. So induzieren z.B. die Isolate der Untergruppe II im Gegensatz zu den Isolaten der Untergruppe I keine systemischen Symptome an Tabak, *Chenopodium quinoa* und *Vigna unguiculata* bei Temperaturen über 26 – 28 °C (PALUKAITIS *et al.* 1992, DANIELS & CAMPBELL 1992). Allgemein sind Temperatureinflüsse sehr variabel und wiederum abhängig von Wirtspflanze und CMV-Isolat (ROOSSINCK 1991). Da eine Dunkelphase kurz nach der Inokulation den Infektionserfolg erhöht (ELSTNER *et al.* 1996), wurden die Pflanzen

stets in den Abendstunden inokuliert. Für eine optimale Virusvermehrung und Ausbildung von Symptomen sind gute Lichtverhältnisse erforderlich (MEYER-KAHSNITZ 1993). Auch in den eigenen Untersuchungen wurde, bedingt durch eine geringere Lichtintensität im Winter, eine deutliche Verlangsamung der Krankheitsverlaufes festgestellt, trotz Durchführung der Versuche in einem klimagesteuerten Gewächshaus mit Zusatzbeleuchtung. Daher wurden alle weiteren Versuche im Frühjahr und Sommer durchgeführt. Bezüglich der Nährstoffversorgung gilt, dass Pflanzen, die unter optimalen Bedingungen gezogen wurden, im allgemeinen anfälliger sind als solche, die unter reduzierten Bedingungen gehalten wurden (ELSTNER *et al.* 1996, AGRIOS 1997). Bei keiner der in dieser Arbeit untersuchten Wirt-Virus-Systeme konnte ein Einfluss einer erhöhten Nährstoffversorgung auf Infektionserfolg und Krankheitsverlauf nachgewiesen werden.

Äußere Faktoren haben dementsprechend auch einen großen Einfluss auf die Verbreitung der Isolate bzw. die Zusammensetzung der CMV-Population. So dominierten in Paprikakulturen in Kalifornien die Isolate der Untergruppe I (DANIELS & CAMPBELL 1992, RODRÍGUEZ-ALVARADO *et al.* 1995), in New York die der Untergruppe II (KEARNEY *et al.* 1990). Während in einigen Erhebungen die Isolate beider CMV-Untergruppen in vielen Kulturen gleichermaßen nachgewiesen wurden (QUIOT *et al.* 1979, JONES & McLEAN 1989, RIST & LORBEER 1989, JONES & McKIRDY 1990, KEARNEY *et al.* 1990, PERRY *et al.* 1993), lassen andere Untersuchungen vermuten, dass die Isolate der Untergruppe I weiter verbreitet sind bzw. häufiger auftreten (LUIS-ARTEAGA *et al.* 1988, DANIELS & CAMPBELL 1992, CRESCENZI *et al.* 1993, SINGH *et al.* 1995, FRAILE *et al.* 1997, GARCÍA-ARENAL *et al.* 2000, HORD *et al.* 2001). Allgemein gilt die Auffassung, dass die S-I-Isolate in den tropischen und subtropischen, die S-II-Isolate in den gemäßigten Breiten dominieren (HAASE *et al.* 1989, SINGH *et al.* 1995). Unter den klimatischen Bedingungen in Deutschland sollen die S-II-Isolate vorherrschen (HAASE *et al.* 1989), und auch die in dieser Arbeit verwendeten Isolate 5, 10 und 11 aus der Region Rheinland waren alle der Untergruppe II zuzuordnen. Dass diese geographischen Unterschiede primär auf den jeweils vorherrschenden klimatischen Verhältnissen bzw. der unterschiedlichen Temperatursensibilität der CMV-Isolate basieren, wird durch die in gemäßigten Breiten beobachtete Verschiebung der CMV-Population zu Gunsten der S-I-Isolate während der Sommermonate bestätigt (QUIOT *et al.* 1979, HAACK & RICHTER 1987, HAASE *et al.* 1989, DANIELS & CHAMPBELL 1992, CRESCENZI *et al.* 1993).

Die Komplexität der Wechselwirkungen zwischen Virus, Wirt, Klima, Virusübertragung und -überdauerung verdeutlichen epidemiologische Studien CMV-infizierter Tomatenbestände in Italien. Bei S-II-Isolaten, welche letale Nekrosen an Tomaten verursachten, zeigte sich eine positive Korrelation zwischen deren Abwesenheit im Sommer, dem natürlichen Verschwinden bestimmter Unkräuter zur gleichen Zeit und dem Krankheitsverlauf bzw. dem frühzeitigem Absterben der infizierten Tomatenpflanzen. In diesem Fall gewährleisteten Unkräuter nicht nur eine Überdauerung der Viren im Winter, sondern auch über die Sommermonate (wahrscheinlich im Saatgut) bis zum Herbst (CRESCENZI *et al.* 1993). Die Einführung neuer Isolate in einer Region kann zu tief-

greifenden Veränderungen in der Virus-Population führen. So traten Mitte der 80er Jahre in Italien erstmals die ursprünglich aus Asien stammenden Isolate der Gruppe S-IB auf. Mittlerweile machen sie 50 % der CMV-Population aus, wobei immer noch unklar ist, von wo und wie die Isolate nach Italien eingeführt wurden (GALLITELLI 2000).

Pathogenität und Virulenz der zahlreichen CMV-Isolate können beträchtlich variieren (PALUKAITIS *et al.* 1992, AGRIOS 1997, WATERWORTH & HADIDI 1998, GALLITELLI 2000), wobei die Prävalenz eines Virus und auch das Ausmaß der induzierten Symptome kein zuverlässiger Hinweis auf den letztendlich verursachten Schaden sind (WATERWORTH & HADIDI 1998, GALLITELLI 2000). Untersuchungen über die Korrelation von Ertragsverlusten und verschiedenen Indikatoren, wie Inzidenz, Schwere und Dauer der Erkrankung, zeigen, dass bestimmte Zusammenhänge nur unter streng definierten Bedingungen gültig sind (WATERWORTH & HADIDI 1998). Die bei der Diskussion der vorliegenden Ergebnisse mit Berichten früherer Arbeiten auftretenden Widersprüche verdeutlichen die Schwierigkeit, eine so heterogene Virusgruppe biologisch zu charakterisieren. Die hohe Variabilität des Krankheitsbildes und die komplexen Wechselwirkungen in Wirt-Virus-Systemen machen es erforderlich, solche Biotests im direkten Vergleich bzw. in Relation mit bekannten und hinreichend beschriebenen Isolaten durchzuführen (ANONYMOUS 1998). Vergleichende Untersuchungen einer Gruppe unbekannter CMV-Isolate untereinander sind dagegen nur wenig aussagekräftig. Zumal einige Beschreibungen, neben den auftretenden Widersprüchen, sehr wage sind bzw. zur Verallgemeinerung neigen, in dem Bemühen bestimmte Reaktionsmuster oder -gruppen aufzuzeigen, was aber den tatsächlichen Gegebenheiten oft nicht gerecht wird. Virus-induzierte Schäden sind schwer zu bemessen und die angewandten Methoden sehr unterschiedlich (TOMLINSON 1987, WATERWORTH & HADIDI 1998). In zahlreichen Beschreibungen von CMV-Isolaten wurde auf eine Gruppierung der Isolate verzichtet (GALLITELLI 2000). So sind letztendlich, trotz unzähliger Berichte über CMV-Isolate aus allen Teilen der Welt, die verfügbaren Informationen, welche zum Vergleich bzw. zu Erstellung eines Gesamtbildes herangezogen werden können, eher spärlich.

Nach Virusinfektionen auftretende makroskopische Symptome sind eine unmittelbare Folge histologischer und zytologischer Veränderungen in den Pflanzen (HULL 2002). Ausgehend von charakteristischen Symptomen wurden daher Strukturveränderungen in Geweben und Zellen als Folge einer Infektion mit verschiedenen CMV-Isolaten an *N. rustica*, *N. tabacum* „Samsun-NN“ und Tomatenpflanzen analysiert. Zwar steht den Pflanzen nur ein begrenztes Reaktionsspektrum an zellulären Veränderungen zur Verfügung, welche nicht nur durch Viren sondern auch durch zahlreiche andere biotische und abiotische Stressoren ausgelöst werden können (QUADT 1994, ELSTNER *et al.* 1996, FINK 1999). Unter Berücksichtigung der makroskopisch sichtbaren Symptome und im unmittelbarem Vergleich mit entsprechenden Gewebeproben nicht infizierter Pflanzen, konnten die beobachteten Strukturveränderungen aber als eindeutig CMV-induziert erfasst werden.

Das in den Gewebeproben systemischer Chlorosen CMV-infizierter *N. rustica* und *N. tabacum* „Samsun-NN“ beobachtete Phänomen einer gehemmten Zellbildung und –differenzierung (Hypoplasie) bei gleichzeitig reduzierter Zellgröße (Hypotrophie) wird oft für die chlorotischen Bereiche bei Mosaiksymptomen oder Blattverfärbungen nach Virusinfektion beschrieben (ESAU 1967, HULL 2002). Die benachbarten grünen Bereiche können normal entwickelt sein oder eine vermehrte Zellteilung (Hyperplasie) zeigen und sich zwischen den vergilbten Bereichen mit vermindertem Wachstum aufwölben (ESAU 1967). Obwohl bei den nach CMV-Infektion auftretenden dunkelgrünen, aufgewölbten Bereichen an *N. rustica* ebenfalls eine Hypotrophie der Zellen auftrat, kam es im Gegensatz zu chlorotischem Gewebe nicht zu einer Reduktion der Blattdicke, da die untypisch abgerundeten Zellen des Palisadenparenchyms in bis zu fünf Reihen übereinander lagen. Die gleichen Gewebeänderungen in Form von Hyperplasie und Hypotrophie zeigten sich bei CMV-infizierten Tomatenblättern mit dem Symptom der Fadenblättrigkeit. In diesem Gewebe war auch besonders deutlich die für Hypotrophie beschriebene mangelnde Verdickung und Lignifizierung der Zellwände (FINK 1999) zu erkennen.

Die bei den zytologischen Untersuchungen chlorotischer Blattgewebe vor allem festgestellte Veränderung bzw. Schädigung der Chloroplasten in Form von vermehrter Vesikulierung (peripheres Retikulum), Aufweitung, Wellung und Abbau von Thylakoidmembranen, verstärktem Auftreten größerer osmiophiler Globuli (Plastoglobuli), Formveränderungen, Cytoplasma-Einschlüssen bzw. Invaginationen sowie dem Anschwellen der Chloroplasten mit einer pathologischen Akkumulation abnorm großer Stärkekörner ist ebenfalls charakteristisch für virus-induzierte chlorotische Verfärbungen (ESAU 1967, FINK 1999, HULL 2002) und wird auch für Chloroplasten CMV-infizierter Tabakblätter beschrieben (HONDA & MATSUI 1968, EHARA & MISAWA 1975). Eine zusätzlich zu beobachtende reduzierte Anzahl von Chloroplasten in chlorotischem Gewebe wird auf eine gehemmte Teilung der Organellen in den betroffenen Zellen zurückgeführt (EHARA & MISAWA 1975). Die in dieser Arbeit festgestellten, auf bestimmte Bereiche des Mesophylls beschränkten Stärkeakkumulationen, werden wahrscheinlich durch eine virusbedingte Störung des enzymatischen Stärkeabbaus verursacht (AGRIOS 1997), da Phloem-Nekrosen, welche gleichmäßige Stärkeanreicherungen durch Virus-induzierte Phloem-Blockaden hervorrufen (HAMACHER & QUADT 1991, QUADT 1994, FINK 1999), in den betroffenen Geweben nicht festgestellt wurden. Das periphere Retikulum bzw. die periphere Vesikulierung entsteht durch das Ablösen der inneren Membran der Chloroplastenhülle und der Bildung von Vesikeln zwischen der Doppelmembran der Chloroplasten (GUNNING & STEER 1977, FINK 1999).

Die in chlorotischem Blattgewebe von *N. rustica* und *N. tabacum* „Samsun-NN“ des öfteren zu beobachtende abnormale Lappung bzw. Verformung der Zellkerne werden zwar im Zusammenhang mit Virusinfektionen beschrieben, viele Viren haben aber keinen sichtbaren zytologischen Effekt auf Zellkerne (HULL 2002) und Berichte über dieses Phänomen nach CMV-Infektion lagen nicht vor. Veränderungen der Mitochondrien traten nur im Gewebe CMV-induzierter systemischer Chlorosen an *N. tabacum* „Samsun-NN“ in Form von Verformungen oder cytoplasmatischen Invaginationen auf. Mito-

chondrien scheinen allgemein weniger sensitiv als Plastiden auf Stresseinflüsse zu reagieren und pathologische Veränderungen treten in der Regel dementsprechend später auf (FINK 1999). Bei dem Symptom der Adernaufhellung an *N. rustica* zeigten die Mesophyllzellen in der Nachbarschaft der Leitbündel ähnliche zytologische Veränderungen wie in chlorotischen Blattbereichen. Nur bei den nach Infektion einiger CMV-Isolate an *N. rustica* auftretenden ölig glänzenden Blattarealen war in den Zellen der oberen Epidermis regelmäßig eine Deformierung der antiklinalen Zellwände festzustellen. Berichte über dieses Phänomen in der Literatur lagen nicht vor.

Für die Art der sich entwickelnden Symptome ist auch der Infektionszeitpunkt von Bedeutung. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden die Pflanzen zu einem sehr frühen Zeitpunkt, teilweise sogar im Keimblattstadium, inokuliert. Bei Infektionen vollständig ausgereifter Blätter zeigen sich weniger ausgeprägte histologische Reaktionen und es treten im Wesentlichen zytologische Veränderungen der Chloroplasten auf (FINK 1999). Daneben stellten EHARA & MISAWA (1975) in Studien zur Chloroplastenstruktur in Zellen CMV-infizierter Tabakblätter eine Abhängigkeit zwischen dem Grad der auftretenden Abnormalitäten und dem Entwicklungsstadium der Chloroplasten zum Zeitpunkt der Infektion fest, wobei die größten Zerstörungen an den Chloroplasten zu beobachten waren, welche sich zum Zeitpunkt der Inokulation im Stadium eines Proplastiden befanden. Ähnliche Unterschiede werden auch von HAMACHER (1994) und QUADT (1994) beschrieben.

Dass im Gegensatz dazu in den nicht chlorotischen Geweben infizierter Blätter für gewöhnlich keine zytologischen Veränderungen auftreten (HONDA & MATSUI 1974), konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Chloroplasten in dunkelgrünen blasigen Auftreibungen an *N. rustica* und insbesondere in Tomatenblättern mit dem Symptom der Fadenblättrigkeit besaßen allerdings auffällig wenig Granathylakoide. Zusammen mit der beobachteten Ausbildung eines mehrreihigen Palisadenparenchyms (Hyperplasie) gegenüber dem einreihigen Palisadenparenchym nicht infizierter Blätter ergab sich damit eine augenfällige Ähnlichkeit zu dem Aufbau bzw. den strukturellen Eigenschaften sog. „Sonnenblätter“, welche aufgrund dieser strukturellen Unterschiede bei Lichtsättigung eine höhere photosynthetische Produktivität erreichen als sog. „Schattenblätter“ mit einreihigem Palisadenparenchym und stärker ausgeprägten Granastapeln in den Chloroplasten (LÜTTGE *et al.* 1988). Da sowohl die Schädigung der Chloroplasten chlorotischer Blattareale an *N. rustica* als auch die reduzierte Assimilationsfläche bei der Fadenblättrigkeit an Tomate eine Einschränkung der Photosynthese zur Folge haben (FINK 1999), stellt sich die Frage, ob es sich hier um einen Effekt handelt, diese mangelnden Photosynthese-Leistung zu kompensieren.

Die oben beschriebenen sekundären oder indirekten Auswirkungen von Virusinfektionen auf die Struktur des Wirtspflanzengewebes sind oft eine Folge von Veränderungen des Stoffwechsels oder hormonellen Gleichgewichts der Wirtspflanzen, können aber auch durch zahlreiche andere biotische und abiotische Faktoren verursacht werden und sind somit nicht virusspezifisch (ESAU 1967, LESEMANN 1991, FINK 1999). An virusspezifischen intrazellulären Veränderung (LESEMANN 1991) konnten in dieser

Arbeit neben Virionen bzw. Virus-ähnlichen Partikeln und Virusaggregaten, auch Vesikel und membranöse Strukturen im Cytoplasma, erweiterte Plasmodesmen mit tubulären Verlängerungen ins Cytoplasma sowie Tonoplast-assoziierte Vesikel mit fibrillärem Inhalt in CMV-infiziertem Blattmaterial beobachtet werden.

Insbesondere in den Zellen chlorotischer Blattbereiche traten in der Regel vermehrt granuläre Partikel und dunkel kontrastierte Aggregate auf, die in Zellen gesunder Pflanzen nicht beobachtet werden konnten, so dass es sich wahrscheinlich um Viren, Virusbestandteile oder zumindest um Virus-induzierte Strukturen handelte. Einzelne oder im lockeren Verband bzw. nicht in charakteristischen Aggregaten im Cytoplasma vorliegende CMV-Partikel sind ohne eine spezifische Markierung oder Behandlung nur schwer von cytoplasmatischen Ribosomen zu unterscheiden, da sie sich in Form und Größe sehr ähnlich sind (HONDA & MATSUI 1974, FRANCKI *et al.* 1985). Eine Reihe von Autoren berichten von Virus-ähnlichen Partikeln in Cytoplasma und Vakuolen CMV-infizierter Zellen (ESAU 1967, HONDA & MATSUI 1974, EHARA & MISAWA 1975, FRANCKI *et al.* 1985). Auch das Phänomen einer wesentlich höheren Menge an Viruspartikel in den vergilbten Bereichen als in den grünen und dunkelgrünen Arealen virus-infizierter Blätter ist bekannt (HONDA & MATSUI 1974, EHARA & MISAWA 1975, HULL 2002). Bei den eigenen Untersuchungen konnten solche Virus-ähnlichen Partikel vor allem verteilt im Cytoplasma und seltener in den Vakuolen chlorotischer Blattbereiche festgestellt werden.

Bei den Gewebeproben aus chlorotischen Blattbereichen mit dem Isolat K-CMV infizierter Tomatenpflanzen waren Virus-ähnliche Partikel auffällig oft auch im Verbund mit membranösen Überresten degenerierter Chloroplasten zu beobachten. HONDA & MATSUI (1974) und HONDA *et al.* (1974) stellten zwar in einer beträchtlichen Anzahl von Zellkernen CMV-infizierter Tabakblätter bzw. -protoplasten Partikel im Nucleoplasma fest, aber nie in Chloroplasten und Mitochondrien. FRANCKI *et al.* (1985) berichten über das regelmäßige Auftreten Virus-ähnlicher Partikel in den Zellkernen mit T-CMV infizierter *N. clevelandii*, nicht aber *N. tabacum*. EHARA & MISAWA (1975) konnten Viruspartikel assoziiert mit den äußeren Chloroplastenmembranen oder degenerierten Thylakoidmembranen in chlorotischem Gewebe infizierter Tabakblätter feststellen. Da immer nur wenige degenerierte Chloroplasten betroffen sind, ist aber davon auszugehen, dass Chloroplasten bei der Virussynthese nur eine geringe Rolle spielen und die strukturellen Veränderungen kein direkter Effekt der Virusvermehrung sind (EHARA & MISAWA 1975).

Eine eindeutige Identifizierung von Viruspartikeln in den Zellen war nur in lokalen Chlorosen von *N. rustica* nach Infektion mit dem CMV-Isolat 4 möglich. In diesem Fall zeigten sich aber in beinahe allen Zellen zahlreiche Viren bzw. Virusaggregate in Cytoplasma und Vakuolen, wobei kristalline Aggregate der Viruspartikel ausschließlich in den Vakuolen gebildet wurden. Viele isometrische Viren bilden kristalline Anordnungen in infizierten Zellen, wobei diese Fähigkeit abhängig von den Eigenschaften des entsprechenden Virus ist und in keinem Zusammenhang steht mit der Viruskonzentration in den Zellen oder der Fähigkeit des gereinigten Virus Kristalle zu bilden (HULL

2002). Dagegen scheint die Ionenstärke in der Vakuole bzw. im Cytoplasma eine Rolle zu spielen. So kommt es zum Beispiel bei Anwelken von virus-infiziertem Gewebe häufiger zu Kristallbildungen (HAMACHER, pers. Mitt.). Für die meisten Isolate der Cucumovirus-Gruppe ist die Bildung solcher Kristalle in den Pflanzenzellen allerdings untypisch bzw. diese Formationen treten nur bei einigen wenigen Isolaten und Wirtspflanzen auf. So konnten bei Untersuchungen mit sechs CMV-Isolaten und drei TAV-Isolaten an *N. clevelandii* und *N. tabacum* kristalline Virusaggregate nur in Zellen von *N. clevelandii* nach Infektion mit T-CMV und C-TAV sowie in den Vakuolen mit T-CMV und V-TAV infizierter *N. clevelandii*-Zellen festgestellt werden (FRANCKI et al. 1985). In gereinigten Virussuspensionen kann die Anordnung der ausgefällten CMV-Partikel je nach verwendetem Verfahren bzw. pH-Wert und Salzgehalt der verwendeten Lösungen sehr unterschiedlich ausfallen (EHARA et al. 1976).

Ausschließlich in infiziertem chlorotischem Gewebe von *N. rustica* und *N. tabacum* „Samsun-NN“ wurden regelmäßig erweiterte Plasmodesmen sowie mit Plasmodesmen assoziierte tubuläre Ausstülpungen festgestellt. Solche Strukturen können bei einer ganzen Reihe von Viren verschiedener Gruppenzugehörigkeit auftreten (FRANCKI et al. 1985, HULL 2002) und werden für mit Q-CMV und N-TAV infizierte Zellen von *N. glutinosa* beschrieben (FRANCKI et al. 1985). Bei den mit dem CMV-Isolat 4 infizierten Gewebeproben von *N. rustica* mit dem Symptom der Adernaufhellung waren in wenigen Fällen Virus-ähnliche Partikel in den erweiterten Plasmodesmen und tubulären Ausstülpungen zu beobachten. Viruspartikel bei der Passage durch die Plasmodesmen treten sehr oft bei Como- und Nepoviren auf (FRANCKI et al. 1985, QUADT 1994) und werden auch für mit TAV infizierte Zellen von *N. glutinosa* und *Chrysanthemum morifolium* beschrieben (LAWSON & HEARON 1970, FRANCKI et al. 1985).

Das in den chlorotischen Geweben der CMV-infizierten Versuchspflanzen festgestellte verstärkte Auftreten von Vesikeln und membranösen Strukturen wird ebenfalls vielfach für Virusinfektionen beschrieben (ESAU 1967, HONDA & MATSUI 1968, LESEMANN 1991, FINK 1999, HULL 2002) und mit der Virusreplikation in Verbindung gebracht (LESEMANN 1991). Demnach ist die Virusreplikation assoziiert mit bestimmten Vesikel-Formationen bzw. spezifischen Membranen, bei denen es sich entweder um frei im Cytoplasma liegende glatte Vesikel oder Membran-assoziierte Ausstülpungen des Cytoplasmas, in Verbindung mit verschiedenen Organellen, handelt (LESEMANN 1991). Dabei scheint nur ein schwacher Zusammenhang zwischen den Orten der Virusreplikation und den taxonomischen Verwandtschaftsgraden der Viren zu bestehen (CILLO et al. 2002). Die in dieser Arbeit in chlorotischem Gewebe CMV-infizierter *N. rustica* und *N. tabacum* „Samsun-NN“ häufig auftretenden Tonoplast-assoziierten Vesikel mit fibrillärem Inhalt werden von HATTA & FRANCKI (1981) als charakteristisch für mit Cucumoviren infizierte Zellen beschrieben. Zytochemische Enzym-Nachweisverfahren deuten daraufhin, dass die Vesikel doppelsträngige RNA beinhalten, was auf den Tonoplasten als Ort der Cucumovirus-Replikation hinweist (HATTA & FRANCKI 1981). CILLO et al. (2002) konnten im Blattgewebe von Tabak und Gurke nach Infektion mit Fny-CMV mittels *in situ*-Lokalisation der viruskodierten Proteine 1a und 2a, welche an der CMV-Replikation beteiligt sind (HAYES & BUCK 1990), ebenfalls eine

Verbindung der Virusreplikation mit dem Tonoplasten feststellen. Die Akkumulation dieser Proteine in den infizierten Zellen war immer auf den Tonoplasten und die Bereiche in direkter Nachbarschaft zur Vakuole beschränkt. Nach Meinung der Autoren legt allerdings die Tatsache, dass diese Strukturen auch noch viele Wochen nach Infektion beobachtet werden konnten, nahe, dass es sich nicht um vorübergehende Strukturen handelt, die allein mit der Virusreplikation assoziiert sind.

Das Ausmaß der durch Virus-Isolate oder –Stämme verursachten Symptome wird durch eine Kombination viraler und wirtsspezifischer Faktoren bestimmt (HULL 2002). Die komplexen Wechselwirkungen zwischen Virus- und Wirtsgenom werden durch die Versuche mit Pseudorekombinanten aus unterschiedlichen CMV-Isolaten zur Lokalisierung spezifischer Eigenschaften auf dem Virusgenom verdeutlicht (RAO & FRANCKI 1982, EDWARDS *et al.* 1983, LAKSHMAN & GONSALVES 1985, ROOSSINCK & PALUKAITIS 1990, SHINTAKU *et al.* 1992, ZHANG *et al.* 1994, HELLWALD *et al.* 2000). So ist die Fähigkeit von Fny-CMV zur schnellen Induktion schwerer systemischer Symptome an bestimmten Zucchini-Sorten auf der RNA 1 lokalisiert (ROOSSINCK & PALUKAITIS 1990), zur Induktion schwerer Symptome an Tabak dagegen auf RNA 1 und 2 (ZHANG *et al.* 1994), während wiederum das Auftreten lokaler Ringflecken an Tabak nach Infektion mit LS-CMV auf der RNA 3 dieses Isolates determiniert ist (ZHANG *et al.* 1994). Die Symptomausprägung an Tomaten wurde mittels Pseudorekombinanten von NT-CMV und Fny-CMV auf RNA 2 festgelegt (HELLWALD *et al.* 2000). Diese Untersuchungen zeigen, dass in Abhängigkeit von CMV-Isolat und Wirtspflanzenart alle drei CMV-RNAs sowie deren Kombinationen eine Funktion bei der phänotypischen Ausprägung der Wirt-Virus-Interaktionen erfüllen können, wobei RNA 2 und 3 im Vergleich mit RNA 1 eine besondere Rolle zu spielen scheinen (RAO & FRANCKI 1982, HELLWALD *et al.* 2000). Zwischen den CMV-Isolaten ist unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit die Kombination aller RNAs problemlos möglich, während zwischen CMV und TAV oder PSV zwar der Austausch von RNA 3, nicht aber von RNA 1 oder 2, möglich ist (RAO & FRANCKI 1981, SUZUKI *et al.* 2003). Somit sind alle CMV-Isolate, trotz teilweise beträchtlicher Unterschiede in der Art der induzierten Symptome, der Nukleotidsequenz und anderer Eigenschaften, genetisch vollständig kompatibel und als Isolate/Stämme ein und desselben Virus zu betrachten (PALUKAITIS *et al.* 1992).

In Übereinstimmung mit früheren Berichten zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass sich die auftretenden Unterschiede in der Wirtspflanzenreaktion nicht zur Differenzierung der CMV-Isolate eignen (AHMAD & SCOTT 1985, DANIELS & CAMPBELL 1992, WAHYUNI *et al.* 1992, ANONYMOUS 1998). Bei vielen verschiedenen Wirtspflanzen und der Berücksichtigung auch kleinerer Unterschiede in der Symptomausprägung verhält sich im Prinzip jedes Isolat individuell verschieden bzw. wie ein separater Stamm (AHMAD & SCOTT 1985, DANIELS & CAMPBELL 1992). Die Koinfektion mit Satelliten-RNA, die insbesondere unter experimentellen Bedingungen im Gewächshaus häufig auftritt, so auch in den vorliegenden Untersuchungen, kann zu weiteren Modifikationen in der Symptomausprägung führen (KAPER & TOUSIGNANT 1977, KAPER & WATERWORTH 1977, MOSSOP & FRANCKI 1979,

WATERWORTH *et al.* 1979, TAKANAMI 1981, GONSALVES *et al.* 1982, PALUKAITIS 1988, JORDÁ *et al.* 1992, ROOSSINCK *et al.* 1992, CRESCENZI *et al.* 1993, GALLITELLI 2000).

Der Zusammenhang zwischen Virusbefall und Symptomausprägung sollte durch Testung der Versuchspflanzen mittels ELISA untersucht werden. Die Viruskonzentration in CMV-infizierten Pflanzen steigt für einige Tage nach der Infektion an und nimmt dann stetig wieder ab (AGRIOS 1997). Die systemische Infektion wird von allen fünf Genen des CMV-Genoms mitbestimmt und kann in Abhängigkeit von Wirtspflanze und CMV-Isolat sehr unterschiedlich ausfallen (ROOSSINCK & PALUKAITIS 1990, GAL-ON *et al.* 1994, 1996, 1997, HELLWALD & PALUKAITIS 1994, 1995, DING *et al.* 1995, KAPLAN *et al.* 1995, 1997, CANTO *et al.* 1997, CANTO & PALUKAITIS 2001, SOARDS *et al.* 2002, SALÁNKI *et al.* 2004). Auch äußere Einflussfaktoren beeinflussen den Infektionsverlauf, so dass an verschiedenen Tagen, zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführte ELISA nur schwer miteinander vergleichbar sind (MEYER-KAHSNITZ 1993). Rückschlüsse von dem ELISA-Messwert auf die exakt vorhandene Virusmenge sind in der Regel nicht möglich, da in diesem Testverfahren Virusantigen, d.h. Untereinheiten, Virusbruchstücke und Viruspartikel bestimmt werden. Es lässt sich jedoch nicht feststellen, wie viele von den genannten Fraktionen in der Probelösung vorhanden sind und vom γ -Globulin gebunden wurden (KORPRADITSKUL *et al.* 1980). Außerdem kann in den unterschiedlichen Teilen der Pflanzen und selbst innerhalb der Blätter, die deutliche Symptome zeigen, die Viruskonzentration stark variieren (HULL 2002).

Dass schwere Symptome nicht zwangsläufig mit einer hohen Viruskonzentration in den betroffenen Pflanzen korrelieren und umgekehrt, ist hinreichend bekannt (HULL 2002). In zahlreichen Untersuchungen wurde eine Abhängigkeit dieser Zusammenhänge von dem jeweiligen Wirt-Virus-Modell festgestellt (GIERSIEPEN 1993). Eine generelle Korrelation zwischen der Quantität viraler Replikation bzw. der systemischen Ausbreitung von Viren in der Pflanze und der Schwere der Krankheit, konnte auch in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Hohe Viruskonzentrationen wurden sowohl in symptomlosen Pflanzen als auch in Pflanzen mit starken Virussymptomen nachgewiesen. Vielmehr schien die Relation von Virusbefall und Wirtspflanzenbeeinträchtigung wiederum spezifisch für die jeweilige Wirt-Isolat-Kombination zu sein. An *N. rustica*, *N. tabacum* „Samsun-NN“ und Paprika war eine gewisse Übereinstimmung zwischen ELISA-Messwerten und Symptomausprägung festzustellen, während an *N. glutinosa*, Tomate, Gurke und Feldsalat kein Zusammenhang zwischen Virusbefall und Wirtspflanzenschädigung zu erkennen war. So wurden z.B. an Tomatenpflanzen mit nur leichten Blattsymptomen nach Infektion mit den Isolaten 1 und S-CMV höhere Extinktionswerte gemessen als an den schwer geschädigten Pflanzen nach Infektion mit den Isolaten 10,11 und Q-CMV.

Während die Messwerte CMV-infizierter *N. glutinosa* in Relation zu den starken Symptomen allgemein relativ niedrig ausfielen, wurden in beiden Gurkensorten teilweise sehr hohe Extinktionswerte gemessen, trotz sehr milder Symptome insbesondere an der CMV-toleranten Sorte „Othello“. Obwohl die Sorte „Othello“ nach Inokulation mit dem

Isolat 1 keine, mit den Isolaten K-CMV und Fny-CMV nur sehr schwache Reaktionen zeigte, wurden in den betroffenen Pflanzen ähnlich hohe Extinktionswerte gemessen wie in der Sorte „Vorgebirgstraube“. Allerdings konnte bei allen anderen Isolaten nur ein schwacher oder kein Nachweis einer erfolgreichen Infektion erbracht werden. Die Begriffe zur Beschreibung der verschiedenen Arten der Reaktionen und Empfänglichkeiten der Pflanzen gegenüber Pflanzenviren, werden häufig in sich widersprechender, mehrdeutiger Weise verwendet (HULL 2002). So wird in GALLITELLI (1998) bei einer Toleranz gegenüber CMV von einer gehemmten systemischen Ausbreitung des Virus gesprochen, während TOMLINSON (1987) Toleranz als eine systemische Infektion ohne die Entwicklung von Symptomen beschreibt. Letzteres stimmt mit der Definition von HULL (2002) überein, wobei es sich bei toleranten Pflanzen um empfängliche Wirte handelt, in denen sich das Virus ungestört replizieren und ausbreiten kann, aber nur einen geringen oder keinen Effekt auf die Pflanzenentwicklung hat.

Der Einfluss der Inokulumdichte auf Infektionserfolg, Krankheitsverlauf und Virusvermehrung bzw. systemische Verbreitung war wesentlich geringer als vermutet. In Abhängigkeit von Wirtspflanze und CMV-Isolat war in einem Bereich von 0,1 - 0,01 mg Virus/ml für gewöhnlich weder bei der Erfassung der Wirtspflanzenbeeinträchtigung noch in dem ELISA-Test ein Unterschied festzustellen. ROOSSINCK (1991) konnte bei der Inokulation der jungen Blätter von Zuckermelonen im 2 – 3-Blattstadium mit 0,2 mg/ml viraler RNA wesentlich höhere Infektionsraten erreichen als bei Inokulation der Keimblätter mit 0,1 mg/ml, wobei nicht geprüft wurde, welcher der beiden veränderten Faktoren ausschlaggebend ist. Doch lassen die eigenen Ergebnisse vermuten, dass auch in diesem Fall der unterschiedliche Infektionserfolg im wesentlichen auf dem Entwicklungsstadium der Pflanzen bzw. der inokulierten Blätter sowie der Größe des inokulierten Areals basieren. Während bei Inokulation mit 0,0001 mg Virus/ml in keinem Versuch mehr eine eindeutige Reaktion der Wirtspflanzen festzustellen war, konnte mittels ELISA in der Regel noch ein Virusnachweis erbracht werden. In Paprika waren die Messwerte genauso hoch wie bei den mit 0,001 mg Virus/ml inokulierten Pflanzen, und die Isolate 4 und K-CMV konnten selbst bei einer Inokulumdichte von 0,00001 mg/ml noch eindeutig nachgewiesen werden. Insgesamt war die Nachweisbarkeit mittels ELISA in allen Wirt-Virus-Systemen sehr gut. Selbst in den Feldsalatpflanzen, die augenscheinlich keine Reaktion auf die CMV-Infektion zeigten, konnte in den meisten Fällen ein eindeutiger Virusnachweis erbracht werden, wobei in allen drei Sorten nach Inokulation mit den Isolaten 4, S-CMV und K-CMV die stärksten Reaktionen gemessen wurde.

Genauere Kenntnisse der Wirt-Virus-Interaktion sind unverzichtbar zur Erfassung und Einschätzung von Viruserkrankungen und somit Voraussetzung für die Entwicklung und Koordination von Kontrollmaßnahmen (TOMLINSON 1987, WATERWORTH & HADIDI 1998, GALLITELLI 2000, ZAITLIN & PALUKAITIS 2000, HULL 2002, PALUKAITIS & GARCÍA-ARENAL 2003). Die hier ausführlich dargelegten und diskutierten Besonderheiten und Probleme bei der Erfassung und Beurteilung CMV- bzw. Virus-induzierter Erkrankungen, verdeutlichen die Notwendigkeit umfangreicher, aufeinander abgestimmter, vergleichender Untersuchungen, die sowohl die Einbeziehung

einer größeren Anzahl von Isolaten und Wirtspflanzen als auch die Kombination verschiedener Techniken erlaubt (ANONYMOUS 1998).

Die geeignetste Methode zum Nachweis sehr geringer Virusmengen in infiziertem Gewebe ist die RT-PCR (SINGH *et al.* 1995, ANONYMOUS 1998). PCR ist grundsätzlich sensitiver als serologische Methoden und außerdem kann mittels PCR je nach Wahl der Primer sogar noch eine weitergehende Typisierung der CMV-Isolate erbracht werden als die klassische Unterteilung in die Untergruppen I und II (ANONYMOUS 1998). Für einen CMV-Nachweis reicht der ELISA in der Regel ebenfalls völlig aus, da CMV selbst in natürlich infizierten Proben für gewöhnlich in hohen Konzentrationen vorliegt, und hat bei einer großen Anzahl von Proben den Vorteil, dass er schnell und einfach durchzuführen ist (ANONYMOUS 1998). Als Mittel zur Differenzierung sind die meisten ELISA-Tests bzw. Antiseren weniger geeignet. Serologische Studien zeigen, dass es nur einige wenige monoklonale Antikörper (Mabs) mit einer ausreichenden Spezifität zur zuverlässigen Differenzierung der CMV-Isolate in die Untergruppen I und II gibt (HAASE *et al.* 1989, PORTA *et al.* 1989, KEARNEY *et al.* 1990, ANONYMOUS 1998). Die Wahl der Methoden hängt letztendlich von der Anzahl der Proben, den Möglichkeiten und vor allem dem jeweiligen Bedarf bzw. der zu klärenden Frage ab (ANONYMOUS 1998).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass weder zwischen Symptomausprägung und der Nukleotidsequenz bzw. der genetischen Verwandtschaft der Isolate noch zwischen Wirtspflanzenbeeinträchtigung und systemischer Verbreitung und Konzentration der Viren in der Pflanze ein genereller Zusammenhang besteht, und somit keiner dieser Merkmale einen zuverlässigen Hinweis auf das Schädigungspotential der verschiedenen CMV-Isolate geben kann.

5 Zusammenfassung

Cucumber mosaic virus (CMV) ist eine sehr heterogene Virusgruppe, deren unzählige Isolate sich teilweise beträchtlich in ihrer Pathogenität, Virulenz und vielen anderen Eigenschaften unterscheiden. Ziel der Arbeit war es, 9 CMV-Isolate, darunter die hinreichend beschriebenen Isolate K-CMV, Fny-CMV und Q-CMV mittels RT-PCR, Wirtspflanzenreaktion, DAS- und TAS-ELISA in simultanen, standardisierten Versuchen zu vergleichen und Zusammenhänge und Wechselwirkungen aufzuzeigen. Dazu wurden Tomaten-, Paprikapflanzen, verschiedene *Nicotiana*-Arten, Gurken- und Feldsalatsorten mit Suspensionen definierter Viruskonzentration der gereinigten Isolate inokuliert.

1. Die RT-PCR mit zwei Untergruppen-spezifischen Primerpaaren erlaubte die Typisierung der verwendeten Isolate in die CMV-Untergruppen S-I und S-II. Mittels RT-PCR mit generellen CMV-Hüllprotein-Primern und anschließendem MspI-Verdau konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Bei der Elektrophorese wurden zwei für die jeweilige Untergruppe charakteristische Bandenmuster sichtbar. Davon abweichende Muster waren nicht zu erkennen. Die Analyse doppelsträngiger RNA aus infizierten Tabakpflanzen ergab bei allen Isolaten das für CMV typische Muster aus 4 Banden.
2. In der RT-PCR mit generellen Primern für Satelliten-RNA konnten bei allen Isolaten Satelliten nachgewiesen werden. Eine genauere Bestimmung der Satelliten-RNA war mit den verwendeten Primern nicht möglich. Bei der elektrophoretischen Darstellung der dsRNA-Profile wurden die Satelliten als kleinere Moleküle ebenfalls erfasst und der positive Nachweis der RT-PCR bestätigt. Die im Vergleich zu den Banden viraler dsRNA wesentlich stärker ausgeprägten Banden und die Assoziation aller Isolate mit Satelliten-RNA, bestätigten die Beobachtung, dass Satelliten verstärkt in Gewächshausversuchen auftreten.
3. Die Bonitur lokaler Symptome eignete sich nicht für einen Vergleich der Isolate, da sie sich unabhängig von dem jeweiligen CMV-Isolat sehr unterschiedlich entwickeln konnten. Die Vielfalt der durch CMV ausgelösten systemischen Symptome war sehr groß und reichte von keinen sichtbaren Veränderungen bis zur systemischen Nekrotisierung der kompletten Pflanze. Eine Korrelation zwischen Symptomausprägung und Untergruppenzugehörigkeit konnte nicht festgestellt werden. Mit Ausnahme eines stark verzögerten Krankheitsverlaufs an allen verwendeten *Nicotiana*-Arten nach Infektion mit dem Isolat Q-CMV, war kein Zusammenhang zwischen Isolat und der zeitlichen Abfolge der Symptome herzustellen.
4. Weder zwischen den Isolaten derselben Untergruppe, noch zwischen denen beider Untergruppen konnte in gemischten Infektionen eine signifikante synergistische oder antagonistische Wechselwirkung nachgewiesen werden.

5. Dass Wuchsdepressionen bzw. Biomasse-Reduktion und Wuchsdeformationen nicht zwangsläufig miteinander korrelierten, verdeutlichte die Notwendigkeit mehrerer Parameter für eine hinreichende Einschätzung der Wirtspflanzenbeeinträchtigung. Ein Einfluss der CMV-Infektion auf den Chlorophyllgehalt der Blätter konnte in keinem der verwendeten Wirt-Virus-Systeme nachgewiesen werden.
6. Durch eine geringere Lichtintensität wurde der Krankheitsverlauf deutlich verzögert. Ein Einfluss der Nährstoffversorgung auf Virusbefall und Wirtspflanzenreaktion konnte nicht nachgewiesen werden. Der Einfluss der Inokulumdichte auf Infektions- und Krankheitsverlauf war wesentlich geringer als vermutet. Bei den Inokulationen mit 0,1 und 0,01 mg Virus/ml wurden für gewöhnlich keine Unterschiede festgestellt. Einen größeren Effekt scheint das Entwicklungsstadium der Pflanzen bzw. der inokulierten Blätter sowie die Größe des inokuliertes Areal zu haben.
7. In den histologischen und zytologischen Untersuchungen konnten die Auswirkungen der CMV-Infektion auf das entsprechende Wirtsgewebe verdeutlicht werden. Mit Ausnahme der beobachteten kristallinen Virusaggregate in den Zellen von *N. rustica* nach lokaler Infektion mit dem CMV-Isolat 4 konnten weder CMV- noch Isolat-spezifische strukturelle Veränderungen festgestellt werden. Die in erster Linie auftretenden indirekten Effekte der CMV-Infektion auf das Wirtsgewebe waren eng mit den entsprechenden makroskopischen Symptomen verknüpft und bestätigten die bei der Bonitur der Symptome festgestellten Unterschiede.
8. Mittels ELISA wurden, in Abhängigkeit des jeweiligen Wirt-Isolat-Systems, hohe Viruskonzentrationen sowohl in symptomlosen Pflanzen als auch in Pflanzen mit starken Virussymptomen nachgewiesen. Bei der CMV-toleranten Gurkensorte „Othello“ wurden trotz ausbleibender oder sehr milder Symptome teilweise ähnlich hohe Extinktionswerte gemessen wie in der empfindlichen Sorte „Vorgebirgstraube“. Die Sensitivität beider ELISA-Verfahren war in allen Wirt-Virus-Systemen sehr gut. Während bei Inokulationen mit 0,0001 mg Virus/ml keine Wirtspflanzenreaktionen mehr festzustellen waren, konnte in der Regel noch ein Virusnachweis erbracht werden. Auch die Feldsalatpflanzen wurden meistens positiv getestet, obwohl alle drei Sorten keine Reaktion auf die CMV-Infektion zeigten.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass kein genereller Zusammenhang zwischen Wirtspflanzenbeeinträchtigung, der systemischen Verbreitung und Konzentration der Viren in der Pflanze sowie der Nukleotidsequenz bzw. der genetischen Verwandtschaft der Isolate besteht, und keiner dieser Merkmale einen zuverlässigen Hinweis auf das Schädigungspotential der verschiedenen CMV-Isolate geben kann.

6 Literaturverzeichnis

- AGRIOS, G.N., 1997: Plant Pathology, 4th ed.. Academic Press, San Diego.
- AHMAD, I.B. and SCOTT, H.A., 1985: Identification and serotyping of cucumber mosaic and peanut stunt viruses from Arkansas. *Plant Disease* **69**, 891-893.
- ALONSO-PRADOS, J.L., ARANDA, M.A., MALPICA, J.M., GARCÍA-ARENAL, F. and FRAILE, A., 1998: Satellite RNA of cucumber mosaic cucumovirus spreads epidemically in natural populations of its helper virus. *Phytopathology* **88**, 520-524.
- ANONYMOUS, 1998 : Detection and biodiversity of cucumber mosaic cucumovirus. Conclusions from a ringtest of European Union Cost 823 (New technologies to improve phytodiagnosis). *Journal of Plant Pathology* **80** (2), 133-149.
- ARANDA, M.A., FRAILE, A. and GARCÍA-ARENAL, F., 1993: Genetic variability and evolution of the satellite RNA of cucumber mosaic virus during natural epidemics. *Journal of Virology* **67**, 5896-5901.
- BOUHIDA, M. and LOCKHART, B.E., 1990: Increase in importance of cucumber mosaic virus infection in greenhouse-grown bananas in Morocco. *Phytopathology* **80**, 981.
- BRUCKART, W.L. and LORBEER, J.W., 1976: Cucumber mosaic virus in weed hosts near commercial fields of lettuce and celery. *Phytopathology* **66**, 253-259.
- BRUNT, A.A., CABTREE, K., DALLWITZ, M.J., GIBBS, A.J. and WATSON, L., 1997: *Viruses of Plants, Descriptions and Lists from the VIDE Database*. CAB INTERNATIONAL, University Press, Cambridge.
- CANTO, T. and PALUKAITIS, P., 2001: A cucumber mosaic virus (CMV) RNA 1 transgene mediates suppression of the homologous viral RNA 1 constitutively and prevents CMV entry into the phloem. *Journal of Virology* **75**, 9114-9120.
- CANTO, T., PRIOR, D.A.M., HELLWALD, K.-H., OPARKA, K.J. and PALUKAITIS, P., 1997: Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of CMV. *Virology* **237**, 237-248.
- CASPER, R. and MEYER, S., 1981: Die Anwendung des ELISA-Verfahrens zum Nachweis pflanzenpathogener Viren. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* **33**, 49 – 54.

- CHOMCZYNSKI, P. and SACCHI, N., 1987: Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytic Biochemistry* **162**, 156-159.
- CILLO, F., ROBERTS, I. and PALUKAITIS, P., 2002: *In situ* localization and tissue distribution of the replication-associated proteins of cucumber mosaic virus in tobacco and cucumber. *Journal of Virology* **76**, 10654-10664.
- CLARK, M.F. and ADAMS, A.N., 1977: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**, 475-483.
- COHEN, J., LOEBENSTEIN, G. and SPIEGEL, S., 1988: Infection of sweet potato by cucumber mosaic virus depends on the presence of sweet potato feathery mottle virus. *Plant Disease* **72**, 583-585.
- CRESCENZI, A., BARBAROSSA, L., GALLITELLI, D. and MARTELLI, G.P., 1993: Cucumber mosaic cucumovirus populations in Italy under natural epidemic conditions and after a satellite-mediated protection test. *Plant Disease* **77**, 28-33.
- DALTON, A.J., 1955: A chrome-osmium fixative for electron microscopy. *Anatomic Records* **121**, 281.
- DANIELS, J. and CAMPBELL, R.N., 1992: Characterization of cucumber mosaic virus isolates from California. *Plant Disease* **76**, 1245-1250.
- DING, S.W., ANDERSON, B.J., HAASE, H.R. and SYMONS, R.H., 1994: New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology* **198**, 593-601.
- DING, S.W., LI, W-X. and SYMONS, R.H., 1995: A novel naturally occurring hybrid gene encoded by plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO Journal* **14**, 5762-5772.
- DODDS, J.A. and LEE, S.Q., 1984: Cross protection between strains of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* **74**, 801.
- DOOLITTLE, S.P., 1916: A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology* **6**, 145-147.
- EDWARDS, M.C. and GONSALVES, D., 1983: Grouping of seven biologically defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide mapping. *Phytopathology* **73**, 1117-1120.

- EDWARDS, M.C., GONSALVES, D. and PROVVIDENTI, R., 1983: Genetic analysis of cucumber mosaic virus in relation to host resistance: location of determinants for pathogenicity to certain legumes and *Lactuca saligna*. *Phytopathology* **73**, 269-273.
- EHARA, Y. and MISAWA, T., 1975: Occurrence of abnormal chloroplasts in tobacco leaves infected systemically with the ordinary strain of cucumber mosaic virus. *Phytopathologische Zeitschrift* **84**, 233-252.
- EHARA, Y., MISAWA, T. and NAGAYAMA, H., 1976: Arrangement of cucumber mosaic virus particles in the virus aggregates. *Phytopathologische Zeitschrift* **87**, 28.
- ELSTNER, E.F., OSSWALD, W. und SCHNEIDER, I., 1996: *Phytopathologie: Allgemeine und biochemische Grundlagen*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- ESAU, K., 1967: Anatomy of plant virus infections. *Annual Review of Phytopathology* **5**, 45-76.
- ESCRIU, F., FRAILE, A. and GARCÍA-ARENAL, F., 2000: Evolution of virulence in natural populations of the satellite RNA of Cucumber mosaic virus. *Phytopathology* **90**, 480-485.
- FINK, S., 1999: Pathological and regenerative plant anatomy. *Handbuch der Pflanzenanatomie*; Bd. 14, Teil 6: Spezieller Teil. Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
- FLASINSKI, S., SCOTT, S., XIA, J.Q., SUN, C. and BARNETT, O.W., 1990: Diseases of *Peperonia*, *Impatiens* and *Hibbertia* caused by cucumber mosaic virus. *Phytopathology* **80**, 1061.
- FORD, R.E., BECZNER, L. and HAMILTON, R.I., 1988: Turnip, cucumber, and ribgrass mosaic viruses isolated from *Hesperis matronalis* in British Columbia. *Plant Disease* **72**, 101-106.
- FRAILE, A., ALONSO-PRADOS, J.L., ARANDA, M.A., BERNAL, J.J., MALPICA, J. and GARCÍA-ARENAL, F., 1997: Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of tripartite RNA plant virus. *Journal of Virology* **71**, 934-940.
- FRANCKI, R.I.B., 1964: Inhibition of cucumber mosaic virus infectivity by leaf extracts. *Virology* **24**, 193-199.
- FRANCKI, R.I.B., MILNE, R.G. and HATTA, T., 1985: *Atlas of Plant Viruses*, Vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida.

- FRANCKI, R.I.B., RANGLES, J.W., CHAMBERS, T.C. and WILSON, S.B., 1966: Some properties of purified cucumber mosaic virus (Q strain). *Virology* **28**, 729-741.
- GALLITELLI, D., 1998: Present status of controlling cucumber mosaic virus, pp. 507-523 in: *Plant Virus Disease Control*. (A. HADIDI, R.K. KHETARPAL and H. KOGANEZAWA, eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota.
- GALLITELLI, D., 2000: The ecology of cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus Research* **71**, 9-21.
- GAL-ON, A., KAPLAN, I. and PALUKAITIS, P., 1996: Characterization of cucumber mosaic virus: II. Identification of movement protein sequences that influence its accumulation and systemic infection in tobacco. *Virology* **226**, 354-361.
- GAL-ON, A., KAPLAN, I. and PALUKAITIS, P., 1997: Characterization of cucumber mosaic virus: III. Localization of sequences in the movement protein controlling systemic infection in cucurbits. *Virology* **230**, 343-349.
- GAL-ON, A., KAPLAN, I., ROOSSINCK, M.J. and PALUKAITIS, P., 1994: The kinetics of infection of zucchini squash by cucumber mosaic virus indicate a function for RNA 1 in virus movement. *Virology* **205**, 280-289.
- GARCÍA-ARENAL, F., ESCRIU, F., ARANDA, M.A., ALONSO-PRADOS, J.L., MALPICA, J.M. and FRAILE, A., 2000: Molecular epidemiology of cucumber mosaic virus and its satellite RNA. *Virus Research* **71**, 1-8.
- GARCIA-LUQUE, I., KAPER, J.M., DIAZ-RUIZ, J.R. and RUBIO-HUERTOS, M., 1984: Emergence and characterization of satellite RNAs associated with Spanish cucumber mosaic virus. *Journal of General Virology* **65**, 539-547.
- GERLACH, D., 1984: *Botanische Mikrotechnik*. Gustav Thieme Verlag, Stuttgart.
- GEYER, G., 1973: *Ultrahistochemie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- GIERSIPEEN, R., 1993: Untersuchungen zur Charakterisierung des Kirschblattrollvirus (CLRv) als Ursache einer Eschenvirose. Dissertation, Universität Bonn, 135 S..
- GILLASPIE, A.G., Jr., HAJIMORAD, M.R. and GHABRIAL, S.A., 1998: Characterization of a severe strain of cucumber mosaic virus seedborne in cowpea. *Plant Disease* **82**, 419-422.

- GONSALVES, D., PROVVIDENTI, R. and EDWARDS, M.C., 1982: Tomato white leaf: The relation of an apparent satellite RNA and cucumber mosaic virus. *Phytopathology* **72**, 1533-1538.
- GOULD, A.R., PALUKAITIS, P., SYMONS, R.H. and MOSSOP, D.W., 1978: Characterization of satellite RNA associated with cucumber mosaic virus. *Virology* **84**, 443-445.
- GOULD, A.R. and SYMONS, R.H., 1982: Cucumber mosaic virus RNA 3. Determination of the nucleotide sequence provides the amino acid sequences of protein 3A and viral coat protein. *European Journal of Biochemistry* **126**, 217-226.
- GREEN, S.K., LEE, D.R. and HORNE, N.M., 1988: Survey for viruses of soybean, mung bean, and peanut in Java, Indonesia. *Plant Disease* **72**, 994.
- GUNNING, B.E.S. und STEER, M.W., 1977: *Biologie der Pflanzenzelle, ein Bildatlas*, 1. Aufl.. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart / New York.
- HAACK, I. and RICHTER, J., 1987: Differenzierung von Isolaten des Gurkenmosaik-Virus (cucumber mosaic virus) mit Hilfe von Testpflanzen. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* **23**, 435-441.
- HAASE, A., RICHTER, J. and RABENSTEIN, F. (1989): Monoclonal antibodies for detection and serotyping of cucumber mosaic virus. *Journal of Phytopathology* **127**, 129-136.
- HABILI, N. and FRANCKI, R.I.B., 1974: A reexamination of the molecular size of cucumber mosaic virus and its coat protein. *Virology* **57**, 392-401.
- HAMACHER, J., 1994: *Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Laubbäumen unter verschiedenen Stresseinwirkungen*. Dr. Kovač Verlag, Hamburg.
- HAMACHER, J. and QUADT, A., 1991: Light- and electron microscopic studies of cherry leaf roll virus (CLR) on European ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Journal of Phytopathology* **131**, 215-226.
- HAQ, Q.M.R., SINGH, B.P. and SRIVASTAVA, K.M., 1996: Biological, serological and molecular characterization of a cucumber mosaic virus isolate from India. *Plant Pathology* **45**, 823-828.
- HATTA, T. and FRANCKI, R.I.B., 1981: Cytopathic structures associated with tonoplast of plant cells infected with cucumber mosaic and tomato aspermy viruses. *Journal of General Virology* **53**, 343-346.

- HAYES, R.J. and BUCK, K.W., 1990: Complete replication of a eukaryotic virus RNA *in vitro* by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* **63**, 363-368.
- HELLWALD, K.-H. and PALUKAITIS, P., 1994: Nucleotide sequence and infectivity of cucumber mosaic cucumovirus (strain K) RNA2 involved in breakage of replicase-mediated resistance in tobacco. *Journal of General Virology* **75**, 2121-2125.
- HELLWALD, K.-H. and PALUKAITIS, P., 1995: Viral RNA as a potential target for two independent mechanisms of replicase-mediated resistance against cucumber mosaic virus. *Cell* **83**, 937-946.
- HELLWALD, K.-H., ZIMMERMANN, C. and BUCHENAUER, H., 2000: RNA 2 of cucumber mosaic virus subgroup I strain NT-CMV is involved in the induction of severe symptoms in tomato. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 95-99.
- HONDA, Y. and MATSUI, C., 1968: Electron microscopy of intracellular modifications of tobacco by mixed infections with cucumber mosaic and tobacco mosaic virus. *Phytopathology* **58**, 1230-1235.
- HONDA, Y. and MATSUI, C., 1974: Electron microscopy of cucumber mosaic virus-infected tobacco leaves showing mosaic symptoms. *Phytopathology* **64**, 534-539.
- HONDA, Y., MATSUI, C., OTSUKI, Y. and TABEKE, I., 1974: Ultrastructure of tobacco mesophyll protoplasts inoculated with cucumber mosaic virus. *Phytopathology* **64**, 30-34.
- HORD, M.J., GARCÍA, A., VILLALOBOS, H., RIVERA, C., MACAYA, G. and ROOSSINCK, M.J., 2001: Field survey of cucumber mosaic virus subgroups I and II in crop plants in Costa Rica. *Plant Disease* **85**, 952 – 954.
- HULL, R., 2002: *Matthews' Plant Virology*, 4th edn.. Academic Press, San Diego.
- ILARDI, V., MAZZEI, M., LORETI, S., TOMASSOLI, L. and BARBA, M., 1995: Biomolecular and serological methods to identify strains of cucumber mosaic virus on tomato. *EPPO Bulletin* **25**, 321-327.
- JAGGER, I.C., 1916: Experiments with the cucumber mosaic disease. *Phytopathology* **6**, 148-151.
- JONES, R.A.C. and McKIRDY, S.J., 1990: Seed-borne cucumber mosaic virus infection of subterranean clover in Western Australia. *Annals of Applied Biology* **116**, 73-86.

- JONES, R.A.C. and McLEAN, G.D., 1989: Virus diseases in lupins. *Annals of Applied Biology* **114**, 609-637.
- JORDÁ, C., ALFARO, A., ARANDA, M.A., MORIONES, E. and GARCÍA-ARENAL, F., 1992: Epidemic of cucumber mosaic virus plus satellite RNA in tomatoes in Eastern Spain. *Plant Disease* **76**, 363-366.
- JORDAN, R.L., DODDS, J.A. and OHR, H.D., 1983: Evidence for viruslike agents in avocado. *Phytopathology* **73**, 1130-1135.
- KAPER, J.M. and DIAZ-RUIZ, J.R., 1977: Molecular weights of the double-stranded RNAs of cucumber mosaic virus strain S and its associated RNA 5. *Virology* **80**, 214-217.
- KAPER, J.M. and TOUSIGNANT, M.E., 1977: Cucumber mosaic virus-associated RNA 5: I. Role of host plant and helper strain in determining amount of associated RNA 5 with virions. *Virology* **80**, 186-195.
- KAPER, J.M. and WATERWORTH, H.E., 1973: Comparison of molecular weights of single-stranded viral RNAs by two empirical methods. *Virology* **51**, 183-190.
- KAPER, J.M. and WATERWORTH, H.E., 1977: Cucumber mosaic virus associated RNA 5: Causal agent for tomato necrosis. *Science* **196**, 429-431.
- KAPLAN, I., GAL-ON, A. and PALUKAITIS, P., 1997: Characterization of cucumber mosaic virus. III. Localization of sequence in the movement protein controlling systemic infection in cucurbits. *Virology* **230**, 343-349.
- KAPLAN, I.B., SHINTAKU, M., LI, Q., ZHANG, L., MARSH, L.E. and PALUKAITIS, P., 1995: Complementation of virus movement in transgenic tobacco expressing the cucumber mosaic virus 3a gene. *Virology* **209**, 188-199.
- KARNOVSKY, M.J., 1965: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology*. **27**, 137A-138A.
- KEARNEY, C.M., ZITTER, T.A. and GONSALVES, D., 1990: A field survey for serogroups and the satellite RNA of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* **80**, 1238-1243.
- KOENIG, R. und PAUL, H.L., 1982: Detection and differentiation of plant viruses by various ELISA procedures. *Acta Horticulturae* **127**, 147-159.
- KÖHLER, W., SCHACHTEL, G. und VOLESKE, P., 1996: Biostatistik, 2. Aufl.. Springer-Verlag.

- KORPRADITSKUL, P., CASPER, R., und LESEMANN, D.E., 1980: Some aspects of estimating virus antigen concentration by ELISA. *Acta Horticulturae* **110**, 99-105.
- LAKSHMAN, D.K. and GONSALVES, D., 1985: Genetic analyses of two large-lesion isolates of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* **75**, 758-762.
- LAWSON, R.H. and HEARON, S., 1970: Subcellular localisation of chrysanthemum aspermy virus in tobacco and chrysanthemum leaf tissue. *Virology* **41**, 30-37.
- LESEMANN, D.-E., 1991: Specific cytological alterations in virus-infected plant cells, p. 147-159. In K. Mendgen and D.-E. Lesemann (ed.), *Electron microscopy of plant pathogens*. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
- LIN, H.-X., RUBIO, L., SMYTHE, A., JIMINEZ, M. and FALK, B.W., 2003: Genetic diversity and biological variation among California isolates of cucumber mosaic virus. *Journal of General Virology* **84**, 249-258.
- LIU, S., HE, X., PARK, G., JOSEFSSON, C. and PERRY, K.L., 2002: A conserved capsid protein surface domain of cucumber mosaic virus is essential for efficient aphid vector transmission. *Journal of Virology* **76**, 9756-9762.
- LUIS-ARTEAGA, M., ALVAREZ, J.M., ALONSO-PRADOS, J.L., BERNAL, J.J., GARCIA-ARENAL, F., LAVIÑA, A., BATLLE, A. and MORIONES, E., 1998: Occurrence, distribution and relative incidence of mosaic viruses infecting field-grown melon in Spain. *Plant Disease* **82**, 979-982.
- LUIS-ARTEAGA, M., RODRIGUEZ-CEREZO, E., MAESTRO, C. and GARCIA-ARENAL, F., 1988: Detection and characterization of an isolate of cucumber mosaic virus (CMV) infecting borage (*Borago officinalis* L.) in Spain. *Plant Disease* **72**, 265-267.
- LÜTTGE, U., KLUGE, M. und BAUER, G., 1988: *Botanik*. VCH Verlag, Weinheim.
- MARTELLI, G.P. and RUSSO, M., 1985: Virus-host relationships, symptomatological and ultrastructural aspects, pp. 163-205 in: *The Plant Viruses, Vol. I: Polyhedral virions with tripartite genomes*. (R.I.B. FRANCKI, ed.). Plenum, New York.
- MEYER-KAHSNITZ, S., 1993: *Angewandte Pflanzenvirologie*. Bernard Thalacker Verlag, Braunschweig.
- MORRIS, T.J. and DODDS, J.A., 1979: Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* **69**, 854-858.

- MOSSOP, D.W. and FRANCKI, R.I.B., 1978: Survival of a satellite RNA *in vivo* and its dependence on cucumber mosaic virus for replication. *Virology* **86**, 562-566.
- MOSSOP, D.W. and FRANCKI, R.I.B., 1979: Comparative studies on two satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Virology* **95**, 395-404.
- OWEN, J. and PALUKAITIS, P., 1988: Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* **166**, 495-502.
- PALUKAITIS, P., 1988: Pathogenicity regulation by satellite RNAs of cucumber mosaic virus: minor nucleotide sequence changes alter host responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **1**, 175-181.
- PALUKAITIS, P. and GARCIA-ARENAL, F., 2003: Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, Vol. **62**, 241 – 323.
- PALUKAITIS, P. and ROOSSINCK, M.J., 1996: Spontaneous change of benign satellite RNA of cucumber mosaic virus to a pathogenic variant. *Nature Biotechnology* **14**, 1264-1268.
- PALUKAITIS, P., ROOSSINCK, M.J., DIETZGEN, R.G. & FRANCKI, R.I.B., 1992: Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research*, Vol. **41**, 281 – 348.
- PALUKAITIS, P. and ZAITLIN, M., 1984: Satellite RNAs of cucumber mosaic virus: characterization of two new satellites. *Virology* **132**, 426-435.
- PEDEN, K.W.C. and SYMONS, R.H., 1973: Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome. *Virology* **53**, 487-492.
- PERRY, K.L., HABILI, N. and DIETZGEN, R.G., 1993: A varied population of cucumber mosaic virus from peppers. *Plant Pathology* **42**, 806-810.
- PIAZZOLLA, P., CRESCENZI, A., DE BASI, M. and TAMBURRO, A.M., 1998: Circular dichroism studies of CMV-D and CMV-S: Two strains of cucumber mosaic cucumovirus with a different biological behavior. *Archives of Virology* **143**, 2305-2312.
- PORTA, C., DEVERGNE, J.C., CARDIN, L., BRIAND, J.P. and VAN REGENMORTEL, M.H.V., 1989: Serotype specificity of monoclonal antibodies to cucumber mosaic virus. *Archives of Virology* **104**, 271-285.
- QUADT, A., 1994: Untersuchungen an Laubbäumen unter Stresseinfluss durch Viren und abiotische Faktoren. Dissertation, Universität Bonn, 163 S..

- QUIOT, J.B., DEVERGNE, J.C., CARDIN, L., VERBRUGGHE, M., MARCHOUX, G. and LABONNE, G., 1979: Ecologie et epidemiologie du virus de la mosaïque du concombre dans le Sud-est de la France. VII. Repartition de deux types de populations virales dans des cultures sensibles. *Annales de Phytopathologie* **11**, 359-373.
- RAO, A.L.N. and FRANCKI, R.I.B., 1981: Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses: VI. Partial compatibility of genome segments from the two viruses. *Virology* **114**, 573-575.
- RAO, A.L.N. and FRANCKI, R.I.B., 1982: Distribution of determinants for symptom production and host range on the three RNA components of cucumber mosaic virus. *Journal of General Virology* **61**, 197-205.
- REYNOLDS, E.S., 1963: The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *Journal Cellular Biology* **17**, 208 – 212.
- REZAIAN, M.A., WILLIAMS, R.H.V., GORDON, K.H., GOULD, A.R. and SYMONS, R.H., 1984: Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA 2 reveals a translation product significantly homologous to corresponding proteins of other viruses. *European Journal of Biochemistry* **143**, 277-284.
- REZAIAN, M.A., WILLIAMS, R.H.V. and SYMONS, R.H., 1985: Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA 1. Presence of a sequence complementary to part of the viral satellite RNA and homologies with other viral RNAs. *European Journal of Biochemistry* **150**, 331-339.
- RIST, D.L. and LORBEER, J.W., 1987: Weed reservoirs of cucumber mosaic virus (CMV) and broad bean wilt virus (BBWV) and their association with the CMV and BBWV diseases of commercial lettuce. *Phytopathology* **77**, 1618.
- RIST, D.L. and LORBEER, J.W., 1989: Occurrence and overwintering of cucumber mosaic virus and broad bean wilt virus in weeds growing near commercial lettuce fields in New York. *Phytopathology* **79**, 65-69.
- RIZOS, H., GUNN, L.V., PARES, R.D. and GILLINGS, M.R., 1992: Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology* **73**, 2099-2103.
- RIZZO, T.M. and PALUKAITIS, P., 1988: Nucleotide sequence and evolutionary relationship of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 2. *Journal of General Virology* **69**, 1777-1787.

- RIZZO, T.M. and PALUKAITIS, P., 1989: Nucleotide sequence and evolutionary relationship of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 1. *Journal of General Virology* **70**, 1-11.
- RIZZO, T.M. and PALUKAITIS, P., 1990: Construction of full-length cDNA clones of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2 and 3: Generation of infectious RNA transcripts. *Mol. Gen. Genet.* **222**, 249-256.
- RODRÍGUEZ-ALVARADO, G., KURATH, G. and DODDS, J.A., 1995: Heterogeneity in pepper isolates of cucumber mosaic virus. *Plant Disease* **79**, 450-455.
- ROOSSINCK, M.J., 1991: Temperature-sensitive replication of cucumber mosaic virus in muskmelon (*Cucumis melo* cv. Iroquois), maps to RNA 1 of a slow strain. *Journal of General Virology* **72**, 1747-1750.
- ROOSSINCK, M.J., 2001: Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution. *Molecular Plant Pathology*. **2**, 59-63.
- ROOSSINCK, M.J., 2002: Evolutionary history of cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses. *Journal of Virology* **76**, 3382-3387.
- ROOSSINCK, M.J., BUJORSKI, J., DING, S.W., HAJIMORAD, R., HANADA, K., SCOTT, S. and TOUSIGNANT, M., 1999a: Family Bromoviridae, 923-935 in: *Virus Taxonomy - Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. M.H.V. VAN REGENMORTEL, C. M. FAUQUET and D.H.L. BISHOP, eds. Academic Press, San Diego, CA.
- ROOSSINCK, M.J., KAPLAN, I. and PALUKAITIS, P., 1997: Support of a cucumber mosaic virus satellite RNA maps to a single amino acid proximal to the helicase domain of the helper virus. *Journal of Virology* **71**, 608 – 612.
- ROOSSINCK, M.J. and PALUKAITIS, P., 1990: Rapid induction and severity of symptoms in zucchini squash (*Cucurbita pepo*) map to RNA 1 of cucumber mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **3**, 188-192.
- ROOSSINCK, M.J. and PALUKAITIS, P., 1991: Differential replication in zucchini squash of a cucumber mosaic virus satellite RNA maps to RNA 1 of the helper virus. *Virology* **181**, 371-373.
- ROOSSINCK, M.J., SLEAT, D. and PALUKAITIS, P., 1992: Satellite RNAs of plant viruses: Structures and biological effects. *Microbiological Reviews* **56**, 265-279.
- ROOSSINCK, M.J., ZHANG, L. and HELLWALD, K.-H., 1999b: Rearrangements in the 5' non-translated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus

- RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of Virology* **73**, 6752-6758.
- RYBICKI, E.P. and PIETERSEN, G., 1999: Plant virus disease problems in the developing world. *Advances in Virus Research* **53**, 127-175.
- SALÁNKI, K., GELLÉRT, Á., HUPPERT, E., NÁRAY-SZABÓ, G. and BALÁZS, E., 2004: Compatibility of the movement protein and coat protein of cucumoviruses is required for cell-to-cell movement. *Journal of General Virology* **85**, 1039-1048.
- SCOTT, H., 1963: Purification of cucumber mosaic virus. *Virology* **20**, 103 – 106.
- SHINTAKU, M.H., ZHANG, L. and PALUKAITIS, P., 1992: A single amino acid substitution in the coat protein of cucumber mosaic virus induces chlorosis in tobacco. *Plant Cell* **4**, 751-757.
- SINGH, Z., JONES, R.A.C. and JONES, M.G.K., 1995: Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Disease* **79**, 713-716.
- SITTE, H., 1985: Ultramikrotomie. *MTA – Journal Extra* **10**, 9-25.
- SLEAT, D.E., ZHANG, L. and PALUKAITIS, P., 1994: Mapping determinants within cucumber mosaic virus and its satellite RNA for the induction of necrosis in tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 189-195.
- SOARDS, A.J., MURPHY, A.M., PALUKAITIS, P. and CARR, J.P., 2002: Virulence and differential local and systemic spread of cucumber mosaic virus in tobacco are affected by the CMV 2b protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 647-653.
- SPURR, A.R., 1969: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* **26**, 31-43.
- ŠUTIĆ, D.D., FORD, R.E. and TOŠIĆ, M.T., 1999: Handbook of plant virus diseases. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- SUZUKI, M., YOSHIDA, M., YOSHINUMA, T. and HIBI, T., 2003: Interaction of replicase components between cucumber mosaic virus and peanut stunt virus. *Journal of General Virology* **84**, 1931-1939.
- TAKANAMI, Y., 1981: A striking change in symptoms on cucumber mosaic virus-infected tobacco plants induced by satellite RNA. *Virology* **109**, 120-126.

- TIEN, P., RAO, A.L.N. and HATTA, T., 1982: Cucumber mosaic virus from cornflower in China. *Plant Disease* **66**, 337-339.
- TIEN, P. and WU, G., 1991: Satellite RNA for biocontrol of plant disease. *Advances in Virus Research* **39**, 321-339.
- TOMLINSON, J.A., 1987: Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Annals of Applied Biology* **110**, 661-681.
- TOMLINSON, J.A., CARTER, A.L., DALE, W.T. and SIMPSON, C.J., 1970: Weed plants as sources of cucumber mosaic virus. *Annals of Applied Biology* **66**, 11-16.
- TOMLINSON, J.A. and WALKER, V.M., 1973: Further studies on seed transmission in the ecology of some aphid-transmitted viruses. *Annals of Applied Biology* **73**, 292-289.
- ULLMAN, D.E., CHO, J.J. and GERMAN, T.L., 1991: Occurrence and distribution of cucurbit viruses in the Hawaiian Islands. *Plant Disease* **75**, 367-370.
- VALVERDE, R.A., DODDS, J.A. and HEICK, J.A., 1986: Double-stranded ribonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. *Phytopathology* **76**, 459-465.
- VALVERDE, R.A., NAMETH, S.T. and JORDON, R.L., 1990: Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* **74**, 255-258.
- VARVERI, C. and BOUTSIKA, K., 1999: Characterization of cucumber mosaic cucumovirus isolates in Greece. *Plant Pathology* **48**, 95-100.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V., HENDRY, D.A., and BALTZ, T., 1972: Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. *Virology* **49**, 647-653.
- WATERWORTH, H.E. and HADIDI, A., 1998: Economic losses due to plant viruses, pp. 1-13 in: *Plant Virus Disease Control*. (A. HADIDI, R.K. KHETARPAL and H. KOGANEZAWA, eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota.
- WATERWORTH, H.E., KAPER, J.M. and TOUSIGNANT, M.E., 1979: CARNA 5, the small cucumber mosaic virus-dependent replicating RNA, regulates disease expression. *Science* **204**, 845-849.
- WAHYUNI, W.S., DIETZGEN, R.G., HANADA, K. and FRANCKI, R.I.B., 1992: Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus. *Plant Pathology* **41**, 282-297.

- WOHLFAHRT-BOTTERMANN, K.E., 1957: Kontrastierung tierischer Zellen und Gewebe im Rahmen ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchung an ultradünnen Schnitten. *Die Naturwissenschaften* **44**, 287-288.
- YANG, Y., KIM, K.S., and ANDERSON, E.J., 1997: Seed transmission of cucumber mosaic virus in spinach. *Phytopathology* **87**, 924-931.
- YUDIN, L.S., WALL, G.C., QUINTUGUA, R.J., JOHNSON, M.W. and CHO, J., 1990: Identification of virus diseases of cucurbits on Guam. *Phytopathology* **80**, 1063.
- ZAITLIN, M. and PALUKAITIS, P., 2000: Advances in understanding plant virus and virus diseases. *Annual Review of Phytopathology* **38**, 117-143.
- ZHANG, L., HANADA, K. and PALUKAITIS, P., 1994: Mapping local and systemic symptom determinants of cucumber mosaic cucumovirus in tobacco. *Journal of General Virology* **75**, 3185-3191.
- ZHANG, L. and PALUKAITIS, P., 1993: Sequences in LS-CMV controlling infection of maize map to the 5' half of RNA 3. *Phytopathology* **83**, 1349.
- ZITTER, T. and GONSALVES, D., 1991: Differentiation of pseudorecombinants of two cucumber mosaic virus strains by biological properties and aphid transmission. *Phytopathology* **81**, 139-143.

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen herzlichen Dank aussprechen, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. H.-W. Dehne für die Überlassung des Themas und die Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung.

Herrn Prof. Dr. G. Noga für die Übernahme des Korreferats.

Herrn PD. Dr. E.-C. Oerke für seine hilfreichen Anregungen und die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Herrn PD Dr. Joachim Hamacher für zahlreiche freundschaftliche Diskussionen, moralische Unterstützung sowie Betreuung und Hilfe bei den serologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Frau I. Neukirchen für die tatkräftige Hilfe bei der Anfertigung der mikroskopischen Präparate und die Entwicklung der Filme.

Herrn Dr. K.-H. Hellwald und Herrn Prof. Dr. H. Buchenauer für die Möglichkeit in ihrem Labor am Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Hohenheim zahlreiche Isolate zu typisieren sowie für den wissenschaftlichen Austausch und Hilfestellung.

Herrn Dr. S. Winter und seiner Arbeitsgruppe von der BBA in Braunschweig für die Hilfe bei der molekularbiologischen Charakterisierung der Isolate, die gewissenhafte und zügige Beantwortung aller Rückfragen sowie der kritischen Durchsicht der entsprechenden Abschnitte in der vorliegenden Arbeit. Bei der Familie Winter bedanke ich mich herzlich für die liebevolle Unterkunft in Braunschweig.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die moralische Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld.