

**Verbreitung, Diversität und Übertragung des
Mykovirus PhV und seine Auswirkung auf
Plasmopara halstedii, den Falschen
Mehltauerreger der Sonnenblume**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

Institut für Botanik
Fachgebiet Biodiversität und pflanzliche Interaktion

vorgelegt von
Wolfgang Grasse

aus
Stuttgart Bad Cannstatt
2015

1. Prodekan	Prof. Dr. Lutz Graeve
1. berichtende Person	Prof. Dr. Otmar Spring
2. berichtende Person	Prof. Dr. Artur Pfitzner
Zusätzlicher Prüfer	Prof. Dr. Ralf Vögele

Eingereicht am: 10.09.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2015

Inhaltsverzeichnis

Prolog	4
Phylogenetische Betrachtung des <i>Plasmopara halstedii</i> Virus.....	8
1.1 Einleitung.....	8
1.2 Material und Methoden	10
1.2.1 BLAST	10
1.2.2 Alignements.....	10
1.2.3 Phylogenetische Betrachtung.....	10
1.3 Ergebnisse	11
1.3.1 RNA abhängige RNA Polymerase	11
1.3.2 Hüllprotein.....	15
1.3.3 Verknüpfung der verschiedenen Viren und Sequenzen.....	17
1.4 Diskussion.....	19
Die Verbreitung und genetische Diversität des <i>Plasmopara halstedii</i> Virus in weltweiten Populationen des falschen Mehltaus der Sonnenblume	22
2.1 Einleitung.....	22
2.2 Material und Methoden	24
2.2.1 <i>Plasmopara halstedii</i> Isolate	24
2.2.2 Nukleinsäure Extraktion und cDNA Synthese	24
2.2.3 PCR basiertes Virus Screening	25
2.2.4 Vervielfältigung und Sequenzierung der cDNA	25
2.2.5 Sequenzvergleiche und phylogenetische Analysen	27
2.2.6 Modellierung der Sekundär Strukturen	28
2.3 Ergebnisse	29
2.3.1 Vorkommen und Verteilung von PhV.....	29
2.3.2 Sequenzvariationen in den ORFs.....	33
2.3.3 Sequenzvariationen in den UTRs.....	36
2.3.4 Phylogenetische Analyse der gesamten Sequenzen	39
2.4 Diskussion.....	42

Die Auswirkungen des Virus auf seinen Wirt <i>Plasmopara halstedii</i>, den Erreger des falschen Mehltaus der Sonnenblume.	46
3.1 Einleitung	46
3.2 Material und Methoden	48
3.2.1 Verwendete <i>Plasmopara halstedii</i> Isolate	48
3.2.2 Kultivierung von <i>Plasmopara halstedii</i>	48
3.2.3 Induktion der Sporulation	49
3.2.4 <i>Whole Seedling inoculation</i>	49
3.2.5 Vermehrung auf Blattscheiben	50
3.2.6 Isolierung von Sporangien	50
3.2.7 Herstellung von <i>P. halstedii</i> Zoosporen Klonen	50
3.2.8 Virus Extraktion aus <i>Plasmopara halstedii</i>	51
3.2.9 Infektion von <i>Plasmopara halstedii</i> mit PhV	52
3.2.10 Kontrollen zur Virusübertragung	52
3.2.11 Pathogenitätstest	52
3.2.12 Resistenztests gegenüber Metalaxyl	53
3.2.13 Aggressivitätstests	53
3.2.14 Statistische Auswertung	54
3.3 Ergebnisse	55
3.3.1 Identifizierung von virusfreien Isolaten und Generierung isogener Stämme mit Virus	55
3.3.2 Pathogenität und Aggressivität von virusfreien und virushaltigen Stämmen	56
3.4 Diskussion	61
Versuche zur Transformation von <i>Plasmopara halstedii</i>	64
4.1 Einleitung	64
4.2 Material und Methoden	66
4.2.1 Übersicht der Vektorherstellung	66
4.2.2 RNA Extraktion und spezifische cDNA Synthese	69
4.2.3 Adapter PCR	70
4.2.5 Vermehrung und Überprüfung der Vektoren	74
4.2.6 Inokulation	75
4.2.7 Mechanische Perforation	76
4.2.8 Elektroporation	77

4.2.9 Kontrolle der Transformation.....	79
4.3 Ergebnisse	81
4.3.1 Konstruktion und Überprüfung der Vektoren.....	81
4.3.2 Inokulationsversuche	81
4.3.3 Mechanische Perforation	82
4.3.4 Elektroporation	83
4.4 Diskussion.....	88
Epilog und Ausblick.....	93
Zusammenfassung.....	95
Conclusions	97
Literatur	98
Abkürzungsverzeichnis	106
Material.....	107
Anhang	109
<i>Curriculum vitae</i>.....	112

Prolog

Das *Plasmopara halstedii* Virus (PhV) befällt, wie der Name nahe legt, den Erreger des Falschen Mehltaus der Sonnenblume, *Plasmopara halstedii*. Der Wirt dieses Virus gehört zu den obligat biotrophen Oomyceten und wird in die Familie Peronosporaceae eingeordnet. Die erste Erwähnung des Virus erfolgte in einer Kurzmitteilung von Gulya *et al.* (1990) in der über virusähnliche Partikel in *P. halstedii* berichtet wurde. Die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen von PhV wurden von Gulya *et al.* (1992) gezeigt und stammten aus Sporangien und Hyphen eines Feldisolates des Oomyceten aus Nord Dakota. In diesen Bildern zeigte sich, dass die Viruspartikel im gesamten Oomyceten in sehr großer Zahl vorliegen und nicht auf bestimmte Bereiche beschränkt sind. Im selben Jahr wurden zum ersten Mal die Viruspartikel aus *P. halstedii* isoliert und auf ihre Zusammensetzung untersucht (Mayhew *et al.*, 1992). In diesen beiden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es sich bei PhV um ein Virus mit etwa 37 nm Durchmesser und auf einzelsträngiger RNA basierenden Nukleotidsequenz handelt.

In späteren Arbeiten von Heller-Dohmen *et al.* (2008 und 2011) wurde das Virus umfassender charakterisiert und seine Verbreitung erfasst. So konnte die Existenz der ikosaedrischen, etwa 37 nm großen Partikel bestätigt und das Virus auf molekularbiologischer Ebene untersucht werden. Bei PhV handelt es sich um ein einzelsträngiges RNA (ss(+))RNA Virus mit positiver Leserichtung. Das Genom von PhV, das für zwei Proteine kodiert liegt in zwei unabhängigen Segmenten vor. Das größere RNA Segment mit 2793 Nukleotiden (nt.) kodiert in einem offenen Leserahmen (ORF) von 2745 nt. eine RNA abhängige RNA Polymerase (RdRp), die zur Vervielfältigung des viralen Genoms dient. Das zweite RNA Segment mit einer Größe von 1528 nt. beinhaltet einen ORF von 1128 nt. für das Hüllprotein (CP) des Virus. Beide RNA Segmente sind an ihrem 3' Ende polyadeniliert. Sequenzierungen der RNA Segmente zeigten eine sehr geringe genetische Diversität innerhalb von PhV bei Isolaten von *Plasmopara halstedii* aus verschiedenen geographischen Herkunft und unterschiedlichen Pathotypen des Oomyceten (Heller-Dohmen *et al.*, 2011).

Vergleichende Sequenz Analysen von Heller-Dohmen *et al.* (2008 und 2011) zeigten für die beiden RNA Segmente eine hohe Ähnlichkeit zum *Sclerophthora macrospora* Virus A (SMV-A), das den Erreger des Falschen Mehltaus am Reis infiziert (Yokoi *et al.*, 2003.).

Diese beiden Viren weisen Homologien in den Aminosäuresequenzen zu den Familien der Nodaviren und den Tombusviren auf (Heller-Dohmen *et al.*, 2011). Zu anderen bekannten Oomyceten Viren, wie SMV-B (Yokoi *et al.*, 1999) oder dem *Phytophthora infestans* RNA Virus 1 (PiRV-1; Cai *et al.*, 2009), wurden keine hohen Ähnlichkeiten gefunden. In einem ersten Kapitel dieser Arbeit soll die von Heller-Dohmen *et al.* (2011) postulierte Nähe von PhV zu Tombus- und Nodaviren durch Sequenzvergleich mit inzwischen erweiterten Datenbanken überprüft und so die phylogenetische Eingliederung von PhV präzisiert werden.

Die bisherigen Untersuchungen zur Diversität und Verbreitung von PhV basieren nur auf einer relativ eng begrenzten Anzahl von Proben (Heller-Dohmen *et al.* 2008, 2011). Insbesondere ist bislang unklar, seit wann PhV im Sonnenblumenanbau eine Rolle spielt und ob es Hinweise auf den Beginn der Ausbreitung gibt. Aus verschiedenen Quellen der USA und Ungarns stehen inzwischen weitere Isolate von *P. halstedii* zur Verfügung, die eine Prüfung des Vorkommens von PhV bis in die 1970er Jahre zurück ermöglichen. Das zweite Kapitel dieser Arbeit untersucht die genetische Vielfalt von PhV und die weltweite Verbreitung des Virus in seinem Wirt *P. halstedii*. Hierbei sollen bisherige Ergebnisse von Heller-Dohmen *et al.* (2008 und 2011) überprüft und ausgebaut werden. Studien in dieser Art liegen bisher weder für Oomycetenviren noch für andere Mykoviren vor.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der früheren Arbeiten (Gulya *et al.*, 1992; Heller-Dohmen *et al.*, 2008) zeigten, dass PhV in sehr großer Anzahl in *P. halstedii* auftritt. Ob PhV eine Auswirkung auf die Vitalität des Oomyceten und damit auf den Befall der Sonnenblume hat ist bisher gänzlich unbekannt. Die Frage soll im dritten Kapitel dieser Arbeit untersucht werden, in dem genetisch identische Stämme von *P. halstedii* erzeugt werden, die sich lediglich in der Präsenz bzw. Abwesenheit von PhV unterscheiden. Hierbei wird die Auswirkung der isogenen Stämme auf die Sonnenblume in verschiedenen Biotests untersucht.

Die stabile Transformation obligat biotropher Organismen stellt eine bisher noch ungelöste Aufgabe dar. So wurden in der Vergangenheit transiente Transformationen an beispielsweise *P. halstedii* durchgeführt (Hammer *et al.*, 2007) durchgeführt, diese konnten jedoch nicht über mehrere Oomyceten Generationen aufrechterhalten werden. Als neuer Ansatz für eine stabile Transformation sollen nun die viralen Sequenzen von PhV genutzt werden. Die Technik infektiöse cDNA Klone von RNA Viren zu erzeugen ist hierbei schon länger bekannt (Viry *et al.*, 1993). Das vierte Kapitel dieser Arbeit beinhaltet schließlich verschiedene Experimente,

die sich mit der Transformation von PhV in *P. halstedii* befassen. Hierbei soll untersucht werden, ob das Virus künstlich im Oomyceten hergestellt werden kann und damit Grundlagen zu einer stabilen Transformation von *P. halstedii* geschaffen werden könnten.

I

Phylogenetische Betrachtung des *Plasmopara halstedii* Virus

1.1 Einleitung

Das *Plasmopara halstedii* Virus (PhV) ist eines von wenigen bekannten Oomyceten Viren die auf einzelsträngiger RNA basieren. Neben PhV sind unter anderem die Viren SmV-A und SmV-B aus *Sclerophthora macrospora* (Yokoi *et al.*, 1999 und 2003) sowie die doppelsträngigen RNA Viren von *Phytophthora infestans* (PiRV-1 bis PiRV-4) (Cai *et al.*, 2009; 2012; 2013) bekannt. Zusätzlich sind virale DNA Sequenzen in *P. infestans* entdeckt worden, die bisher jedoch nicht genauer untersucht wurden (Tooley *et al.*, 1998). Während die phylogenetische Einordnung für PiRV in die Familie der Narnaviridae eindeutig ist, wurden PhV, SmV-A und SmV-B bisher nicht eindeutig klassifiziert. Die Experimente von Heller-Dohmen *et al.* (2011) zeigten, dass die Sequenz der RdRp von PhV Homologien zu Polymerasen der Nodaviren aufweist. Im Gegensatz hierzu zeigten die Hüllproteine von PhV keine Übereinstimmungen mit den Viren dieser Familie. Die Sequenz des Hüllproteins von PhV ähnelt stattdessen denen von Viren aus der Familie der Tombusviridae. Die Ähnlichkeiten der beiden Proteine zu den entsprechenden Virusfamilien wurde für SmV-A ebenfalls bestätigt (Heller-Dohmen *et al.*, 2011). Analog hierzu zeigten Sequenzvergleiche eine hohe Ähnlichkeit zwischen PhV und SmV-A (Heller-Dohmen *et al.*, 2011). Bei diesen Versuchen wurden die Aminosäuresequenzen der Hüllproteine (CP) und der RNA-abhängigen-RNA-Polymerasen (RdRp) miteinander verglichen. Eine Ähnlichkeit zu SmV-B konnte jedoch nicht gezeigt werden.

In neuen Studien wurde PhV wechselseitig der Noda- bzw. der Tombusviren Familie zugeordnet. So wird PhV in Untersuchungen zu RNA-DNA-Hybrid Viren (Diemer und Stedman, 2012; Roux *et al.*, 2013) in einer phylogenetischen Gruppe mit den Tombusviren geführt. Allerdings wurden für diese Einordnung lediglich die Sequenzen der Hüllproteine herangezogen. In einer Studie über die Supergruppe der Nodaviren wurden im Gegensatz hierzu die Sequenzen verschiedener Polymerasen miteinander verglichen (Ahola

und Karlin, 2015). Diese Vergleiche legen eine Einordnung von PhV und SMV-A in diese Supergruppe nahe. Eine Verbindung zwischen Tombus- und Nodaviren wurde in Arbeiten von Runckel *et al.* (2012) bei der Phylogenie des Lake Sinai Virus 1 und 2 (LSV) zum ersten Mal nahe gelegt. Hierbei bilden die Bienenviren LSV1, LSV2 und das Chronic Bee paralysis Virus (CBpV) eine eigene Gruppierung die beide Virusfamilien miteinander verbindet.

Da sich aus den bisherigen Arbeiten keine eindeutige phylogenetische Positionierung für die beiden Oomyceten Viren PhV und SMV-A ergibt, soll in diesem Kapitel ergründet werden, an welcher Stelle diese Viren einzuordnen sind. Hierbei sollen die beiden viralen Sequenzen sowohl getrennt als auch in einer kombinierten Form mit Sequenzen aus Datenbanken abgeglichen und phylogenetisch untersucht werden.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 BLAST

Für die Suche nach Viren, welche eine Ähnlichkeit zu PhV aufweisen, wurde das *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) der Datenbank *National Center for Biotechnological Information* (NCBI) genutzt. Hierbei wurden die in Aminosäuresequenz übersetzten, offenen Leserahmen der beiden RNA Segmente getrennt betrachtet. Für die Suche wurde der für Proteine spezifische BLASTp (Protein – Protein) Algorithmus auf die Sammlung *non redundant protein sequences* und auf die Metagenom Projekte von Lake Needwood und Global Ocean Sequences (GOS) angewandt. Für weitere Untersuchungen wurden die nächst ähnlichen Sequenzen im Vergleich zu RdRp und CP verwendet. Zusätzlich konnte durch BLASTp die wahrscheinliche Funktion der Proteine durch eine Einteilung in so genannte Superfamilien prognostiziert werden.

1.2.2 Alignments

Die aus den BLASTp erhaltenen Sequenzen anderer Viren wurden zur genaueren Untersuchung mit den vorhandenen Sequenzen von PhV (HM453713 und HM453718) aligniert. Hierzu wurden die Algorithmen *Muscle* und *ClustalW*, die in den Programmen MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) und Bioedit 7.2.5 (Hall, T. 1999) enthalten sind, genutzt. Die so generierten Alignments dienten als Grundlage für weitere phylogenetische Betrachtungen und ermöglichten die Hervorhebung funktionsspezifischer Abschnitte der beiden Proteine.

1.2.3 Phylogenetische Betrachtung

Zur phylogenetischen Einordnung der durch BLASTp erhaltenen viralen Aminosäuresequenzen wurden die mit *Muscle* erstellten Alignments verwendet. Hierbei wurde der *maximum likelihood* Algorithmus des Webserver Phylogeny.fr und des Programms MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) verwendet. Für eine weniger stringente Auftrennung wurde auf die Funktion gBlocks verzichtet, welche lediglich stark konservierte Bereiche in die Betrachtung aufnimmt. Die Berechnung der Ähnlichkeit wurde jeweils 1000 Mal wiederholt (*bootstraps* 1000). Der bestimmte Bootstrap Wert gibt hierbei die Wahrscheinlichkeit für die

Richtigkeit eines Knotens im Stammbaum in Prozent an. Als Außengruppe für beide Phylogenien wurde jeweils eine Gruppe an klar definierten weiter entfernt verwandten Viren verwendet. Die Darstellung der Stammbäume erfolgte mit dem Programm FigTree 1.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>).

1.3 Ergebnisse

1.3.1 RNA abhängige RNA Polymerase

Die Suche nach ähnlichen Aminosäuresequenzen mit BLASTp (Tab. 1.3.1) zeigte im Fall der RdRp höchste Ähnlichkeit (33%) mit qp1, einer nicht genauer bestimmten viralen Sequenz aus einer Abwasseranalyse in San Francisco (Greninger und deRisi, 2015). Weiter Ähnlichkeiten zeigte sich mit SMV-A aus *Sclerophthora macrospora*, welches ebenfalls bisher nicht klassifiziert wurde. Der Großteil der anderen gefundenen Viren mit Übereinstimmungen zur RdRp von PhV ordnete sich in die Familien der Alphanodaviren, Betanodaviren und Picornaviren ein. Die übereinstimmenden Abschnitte liegen alle im gleichen Bereich der Aminosäuresequenzen die auch für die Supergroup der RdRps von Nodaviren beschrieben sind (Ahola und Karlin, 2015). Insgesamt bestanden alle gefundenen Sequenzen aus einzelsträngiger RNA. Übereinstimmungen mit Sequenzen in Metagenom Datenbanken aus dem Lake Needwood und dem globalen Ozean Metagenom (GOS) wurden nicht gefunden.

Tabelle 1.3.1: Ergebnisse der Suche mit BLASTp nach AS Sequenzen die der RdRp von PhV ähneln sowie deren Übereinstimmung zu PhV.

Name	Punkte	Identität	GeneBank
qp1(Betegovirus) ^{A,1}	431	33%	AHA86934.1
Sclerophthora macrospora Virus A ^A	385	33%	NP_995577.1
Bat guano associated nodavirus ^{B,1}	236	29%	ADI48250.1
Mosinovirus ^{B,2}	207	26%	AIO11151.1
Alphanodavirus HB-2007/CHN ^{C,2}	197	25%	ADF97523.1
Tetnovirus 1 ^{D,1}	189	26%	ADK97708.1
Tiger grouper Nervous Necrosis Virus ^{E,3}	185	26%	AEK48154.1
Senegalese sole Iberian betanodavirus ^{E,3}	184	26%	YP_009047239
Asian seabass Nervous Necrosis Virus ^{E,3}	183	27%	ACX71277.1
Barfin flounder Nervous Necrosis Virus ^{E,3}	177	26%	YP_003288759
Atlantic halibut nodavirus ^{E,3}	173	26%	AAY34458.1
Pariacoto Virus ^{B,2}	162	26%	NP_620109.1
Tetnovirus 2 ^{D,1}	155	24%	ADK97710.1
Lake Sinai Virus 1 ^{A,2}	137	24%	AJR19147.1
Nodamura Virus ^{B,2}	135	23%	NP_077730.1
Flock house virus ^{B,2}	129	24%	ABS29339.1
Fesavirus 4 ^{D,2}	110	28%	AII82234.1

(A) unklassifizierte Viren; (B) unklassifizierte Nodaviren (C) Alphanodaviren; (D) Picornaviren; (E) Betanodaviren;

(1) unbekannter Wirt; (2) Arthropoden als Wirt; (3) Fische als Wirt

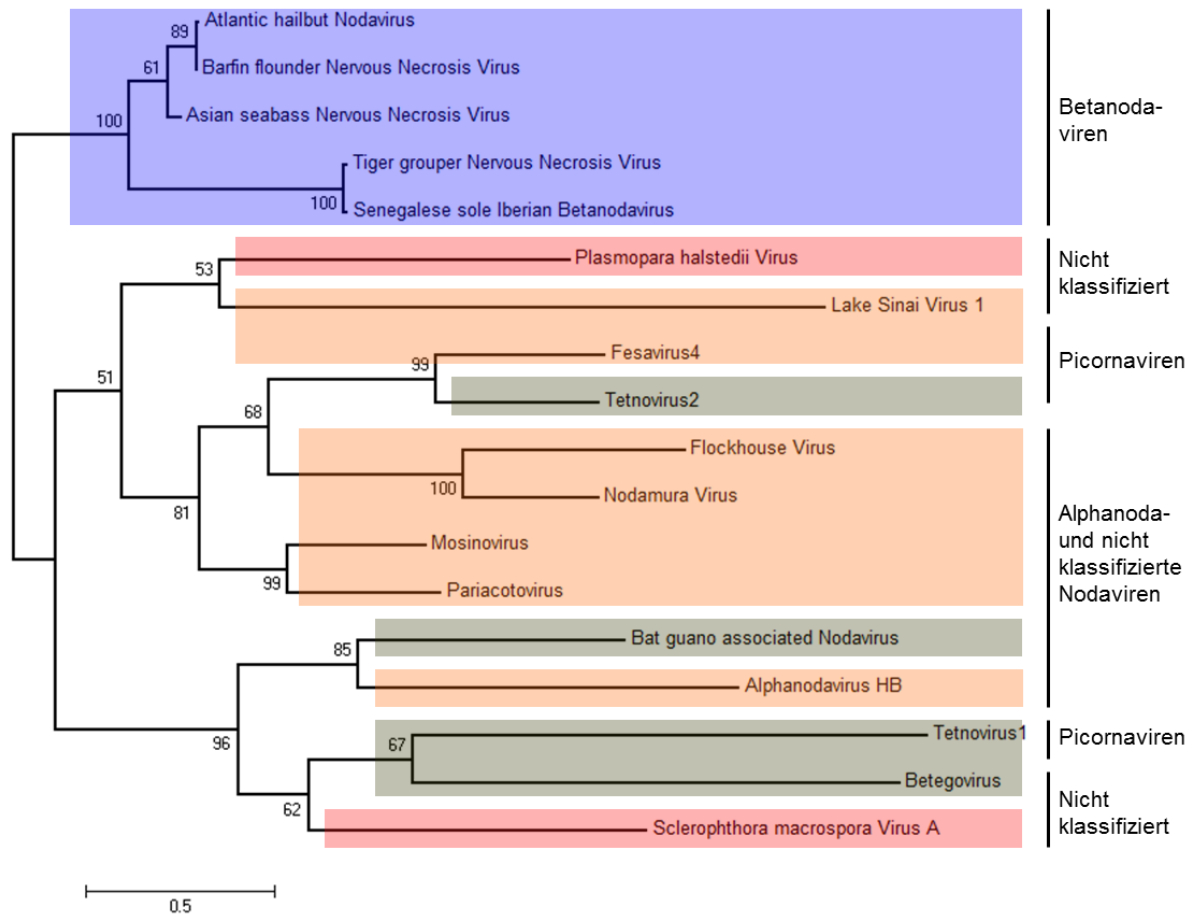


Abbildung 1.3.1: Phylogenetische Analyse von PhV, SMV-A und weiteren Viren aus den Familien der Alphanoda-, Betanoda- und Picornaviren auf Basis der AS Sequenz der RdRp. Die Berechnung wurde mit Maximum Likelihood und 1000 Bootstraps durchgeführt. Die Zahlen an den Knoten geben die Bootstrap Wahrscheinlichkeit in Prozent an. Die Wirte der Viren sind farblich abgegrenzt: Fische (blau), Arthropoden (orange), Oomyceten (rot) und unbekannte Wirte (braun).

Die Phylogenetische Analyse (Abb. 1.3.1) mit dem *Maximum Likelihood* Algorithmus und dem Poisson Model mit 1000 Bootstraps zeigte eine klare Gruppierung der Betanodaviren. Daher wurden die Betanodaviren als Außengruppe genutzt. Die weitere Aufteilung ermöglichte jedoch keine klaren Zuordnungen, da sich hierbei Alphanodaviren, Picornaviren und nicht klassifizierte Viren mit PhV und SMV-A durchmischten. Dies zeigte sich auch an den niedrigen *Bootstrap* Werten, die in dieser heterogenen Gruppe gehäuft auftreten. Das *Plasmopara halstedii* Virus zeigt sich von der Einordnung her ähnlich dem Lake Sinai Virus 1 (LSV1), welches bisher jedoch auch nicht klassifiziert wurde. Eine gemeinsame

Gruppierung von PhV und SMV-A lässt sich in diesem Modell nicht zeigen.

Für die weitere Einordnung von PhV und SMV-A wurden diese mit den RdRps der verschiedenen Virusfamilien, Noda- und Tombusviren, sowie den nicht klassifizierten Viren LSV1, CBpV und dem Tombunodavirus verglichen. Für diese Analyse wurden bis auf das Tombunodavirus ausschließlich Viren benutzt, die auch phenotypisch erfasst waren. Die phylogenetische Berechnung mit dem Maximum likelihood Algorithmus, sowie dem Poisson Modell und 1000 Bootstraps zeigte die klare Einteilung in die beiden großen Virusfamilien (Abb. 1.3.2). Hierbei zeigte sich ein Cluster von PhV und SMV-A, welches sich mit einer hohen Wahrscheinlichkeit (82) nahe den Betanodaviren und nahe an LSV1 und CBpV liegt.

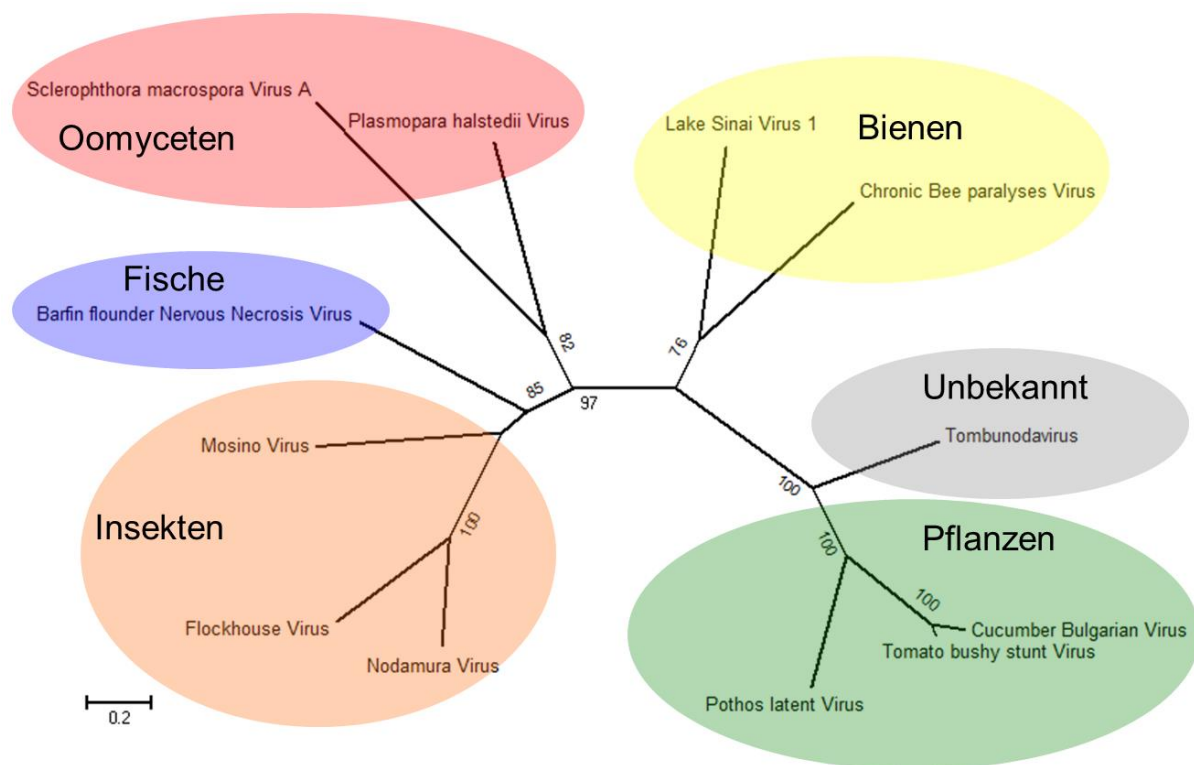


Abbildung 1.3.2: Phylogenetische Analyse von PhV und SMV-A sowie verschiedenen Noda- und Tombusviren auf Basis der AS Sequenz der RdRp angelehnt an Runckel *et al.* (2012). Die Berechnung wurde mit Maximum Likelihood und 1000 Bootstraps mit dem Poisson Algorithmus durchgeführt. Die Zahlen an den Knoten geben die Bootstrap Wahrscheinlichkeit in Prozent an. Die Wirte der verschiedenen Viren sind farblich dargestellt: Insekten (orange, Alphanodaviren und nicht klassifizierte Nodaviren), Fische (blau, Betanodaviren), Oomyceten (rot, nicht klassifiziert), Bienen (gelb, nicht klassifiziert), Pflanzen (grün, Tombusviren) und unbekannte Wirte (grau, nicht klassifiziert).

1.3.2 Hüllprotein

Bei Vergleichen der Aminosäuresequenz des Hüllproteins von PhV mit Einträgen in der Datenbank zeigte ein nicht näher klassifiziertes Tombunodavirus UC1 (Greninger und deRisi, 2015) mit 56% die höchste Übereinstimmung (Tab.1.3.2). Diese Sequenz entstammt wie qp1 ebenfalls einer Viromanalyse aus den Abwässern von San Francisco. Die mit 46% zweithöchste Übereinstimmung fand sich mit dem Hüllprotein des SMV-A. Zusätzlich zu verschiedenen ssRNA Viren, die größtenteils den Tombusviren zuzuordnen sind, wurden bei diesen Versuchen auch einige ssDNA Viren gefunden. Bei diesen zeigte sich die größte Ähnlichkeit zu PhV bei einer Probe, die Sewage associated circular Virus 13 genannt wird. Zusätzlich zu den *non redundant protein sequences* von NCBI wurden auch in den Datenbanken des Lake Needwood Viroms und des globalen Ozean Metagenom (GOS) Sequenzen mit einer Ähnlichkeit zum Hüllprotein von PhV gefunden. Insgesamt zeigte sich bei den Versuchen, dass die Aminosäuresequenz zwischen Position 35 und 230 mit der Superfamilie der S-Domänen viraler Hüllproteine übereinstimmt.

Die Phylogenetische Analyse der Sequenzen anderer Viren mit dem *Maximum Likelihood* Algorithmus und dem Poisson Model mit 1000 Bootstraps, die Ähnlichkeiten mit PhV aufwiesen, zeigte eine deutliche Unterscheidung in drei Gruppen sowie der Außengruppe bestehend aus Alphanecroviren (Abb. 1.3.3). Die erste Gruppe setzte sich ausschließlich aus Tombusviren zusammen und war deutlich von den zwei anderen, sehr heterogenen Gruppen, abgetrennt. Die zweite Gruppe, zu der auch PhV und SMV-A gehören, wurde mit zwei weiteren Sequenzen gebildet, von denen eine aus dem Viriom des Lake Needwood und eine weitere aus Abwässern von San Francisco stammte. Durch die geringen Bootstraps Werte mit 28 und 38 lassen sich die Ähnlichkeiten innerhalb dieser Gruppe nicht genau festlegen. Die andere Gruppe zeigte ausschließlich ssDNA Sequenzen, deren Wirte unbekannt sind und die verschiedenen Wasserproben entstammten.

Tabelle 1.3.2: Ergebnisse der Suche mit BLASTp nach AS Sequenzen die dem Hüllprotein von PhV ähneln sowie deren Übereinstimmung zu PhV

Name	Punkte	Identität	GeneBank
Tombunodavirus UC1 ^{A,1}	375	56%	AHA86928.1
Sclerophthora macrospora virus A ^A	319	46%	NP_995579.1
Sewage associated circular virus 13 ^{A,1,3}	114	33%	AIF34804.1
Circoviridae 2 LDMD-2013 ^{B,1,3}	105	29%	YP_00919631
Boiling Springs Lake RNA-DNA hybrid virus ^{C,1,3}	104	30%	YP_009094499
Hibiscus chlorotic ringspot virus ^{D,2}	80.9	29%	ABD48712.1
Pelargonium leaf curl virus ^{D,2}	79.7	29%	ABX57746.1
Tomato bushy stunt virus ^{D,2}	78.2	32%	BAF37070.1
Cucumber Bulgarian virus ^{D,2}	76.6	26%	AHZ96949.1
Pothos latent virus ^{D,2}	75.1	33%	YP_009032636
Neckar river virus ^{D,1}	73.9	27%	CAE55154.1
Pear latent virus ^{D,2}	72.8	31%	AAO92354.1
Lake Needwood Virome ^{C,1}			
GOS_9264 Marines Metagenom ^{C,1}	125	34%	EBA53686.1
GOS_10665 Marines Metagenom ^{C,1}	77	26%	ECU79312.1
Tabacco necrosis Virus A	90	23%	AAT69241.1
Olive mild mosaic Virus	37,7	35%	AIR95701.1

(A) unklassifizierte Viren; (B) Circoviridae; (C) Virale Sequenzen aus Umweltproben; (D) Tombusviridae

(1) unbekannter Wirt; (2) Pflanzen als Wirt; (3) ssDNA Viren

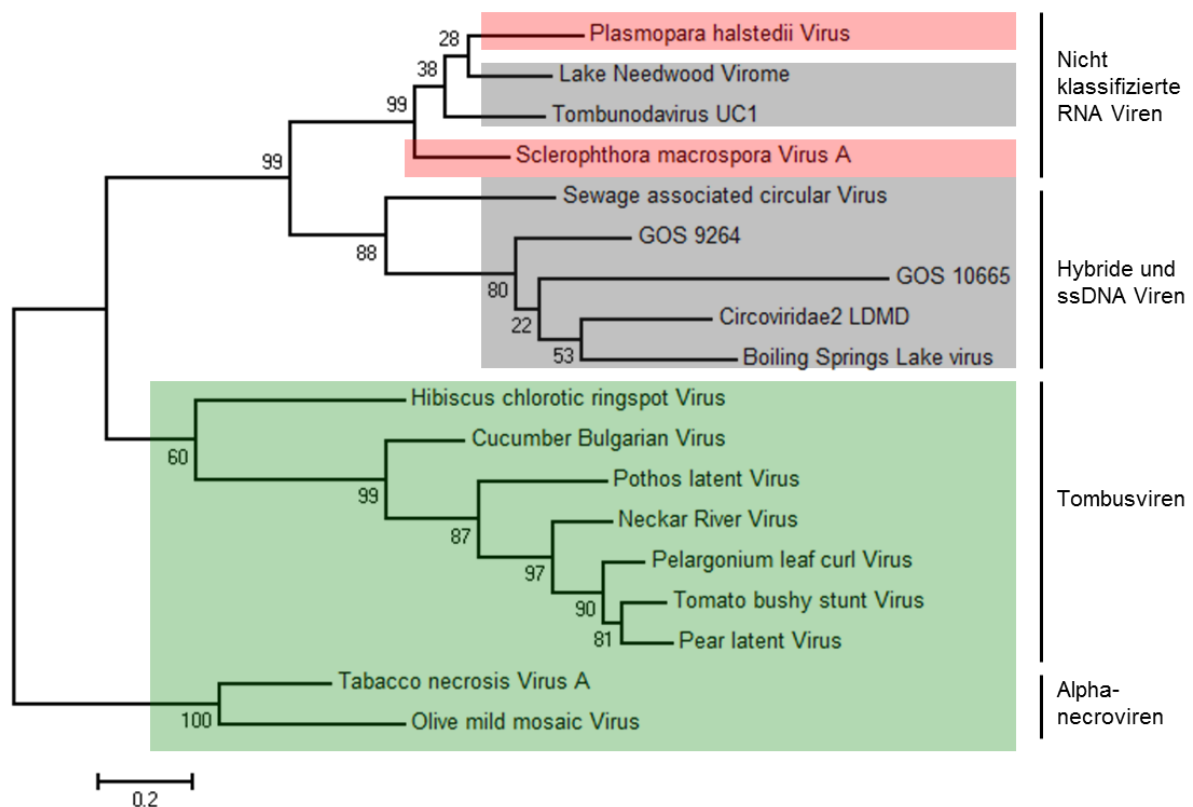


Abbildung 1.3.3: Phylogenetische Analyse von PhV, SMV-A und weiteren Viren aus den Familien der Tombusviren, auf Basis der AS Sequenz des Cp Proteins. Die Berechnung wurde mit Maximum Likelihood und 1000 Bootstraps durchgeführt. Die Zahlen an den Knoten geben die Bootstrap Wahrscheinlichkeit in Prozent an. Als Außengruppe wurden zwei Alphanecroviren OMMV und TNV-A gewählt. Die Wirte der Viren sind farblich abgegrenzt: Pflanzen (grün), Oomyceten (rot) und unbekannte Wirte (braun).

1.3.3 Verknüpfung der verschiedenen Viren und Sequenzen

Um die Einordnung der Oomyceten Viren aufgrund ihrer Genome zu bestimmen wurden die Sequenzen der RdRps mit denen der CPs als Modell fusioniert. Für die Vergleiche wurde dies mit den Sequenzen einiger anderer Viren aus den Familien der Noda- und Tombusviren, sowie LSV1, CBpV und dem Tombunodavirus ebenfalls durchgeführt. Diese theoretischen Polyproteine wurden mit dem *Maximum Likelihood* Algorithmus und dem Poisson Model mit 1000 Bootstraps miteinander verglichen (Abb. 1.3.4). Hierbei zeigte sich eine gute Unterscheidung in die Alphanoda-, Betanoda- und Tombusviren. Ebenfalls klar abgetrennt ist die Gruppe der Bienenviren aus LSV1 und CBpV. Die Position der Oomycetenviren PhV und SMV-A lässt sich jedoch nur ungefähr eingrenzen, so befindet sie sich zwischen den Bienen-

A phylogenetic tree showing the relationships between various viruses, grouped by host organism into colored ovals. The groups are: Fische (blue), Bienen (yellow), Oomyceten (pink), Unbekannt (grey), Pflanzen (green), and Insekten (orange). The tree is rooted at the bottom with a scale bar of 0.2. Bootstrap values are indicated at the nodes.

- Fische** (blue oval):
 - Tiger grouper Nervous Necrosis Virus
 - Barfin flounder Nervous Necrosis Virus
- Bienen** (yellow oval):
 - Lake Sinai Virus 1
 - Chronic Bee paralyzes Virus
- Oomyceten** (pink oval):
 - Plasmopara halstedii Virus
 - Sclerophthora macrospora Virus A
- Unbekannt** (grey oval):
 - Tombunodavirus
- Pflanzen** (green oval):
 - Cucumber Bulgarian Virus
 - Tomato bushy stunt Virus
 - Pothos latent Virus
 - Hibiscus chlorotic ringspot Virus
- Insekten** (orange oval):
 - Mosinivirus
 - Alphanodavirus HB
 - Nodamura Virus
 - Flockhouse Virus

18

1.4 Diskussion

Die Oomyceten Viren PhV und SMV-A sind in kürzlich erschienenen Virusphylogenien immer wieder vertreten. So wurden beispielsweise in einer jüngst veröffentlichten Studie diese beiden Viren basal zu den Nodaviren eingeordnet und es wurde vorgeschlagen, sie aufgrund der Ähnlichkeiten der RdRps in eine eigene Supergruppe einzuteilen (Ahola und Karlin, 2015). Die Hüllproteine der Oomyceten Viren wurden dagegen in Publikationen, die sich mit horizontalem Gentransfer bei Viren sowie dem Übergang von RNA-Viren zu den DNA-Viren befassen, herangezogen. So zeigten verschiedene Arbeiten Übereinstimmungen der CPs mit dem Boiling Spring Lake Hybrid Virus (Diemer und Stedman, 2013) und verschiedenen potentiellen chimerischen Viren (Roux *et al.*, 2013; Krupovic *et al.*, 2015). Bei allen diesen zur Verfügung stehenden Arbeiten wurden PhV und SMV-A jedoch immer, je nach Kontext in die Familie der Nodaviren bzw. Tombusviren eingruppiert, obwohl jeweils das andere Gen nicht betrachtet wurde (vergleiche Abb. 1.3.1 und Abb. 1.3.3). Allen diesen Arbeiten ist jedoch, analog zu den Ergebnissen hier, gemein, dass PhV und SMV-A eine mehr oder weniger geschlossene Gruppe bilden.

Im direkten Vergleich der Studie von Ahola und Karlin (2015) mit dieser Arbeit zeigen sich auf den ersten Blick weite Übereinstimmungen. So zeigt sich, bei ausschließlicher Betrachtung der Polymerasen, eine Stellung von SMV-A und PhV zwischen den Betanodaviren und der Gruppe aus dem Lake Sinai Virus 1 (LSV1) und Chronic Bee paralysis Virus (CBpV) (Abb. 1.3.2). Diese Ergebnisse sind jedoch der Nichtberücksichtigung des Hüllproteins geschuldet, welches so gut wie keine Übereinstimmungen zwischen den Oomyceten Viren und den Nodaviren aufzeigt. Wie in dieser Arbeit, zeigen sich auch bei Ahola und Karlin (2015) verschiedene bisher nicht klassifizierte Viren in der näheren Verwandtschaft. So zeigt das Betegovirus qp1 von allen auf NCBI verfügbaren Sequenzen die höchste Ähnlichkeit zu PhV. Diese ist mit 33% Übereinstimmung zwar die höchste, unterscheidet sich aber hiermit immer noch deutlich von PhV. Da es sich hierbei jedoch um eine Sequenz handelt, die einem Pool von RNA Proben aus den Abwässern von San Francisco handelt (Greninger und deRisi, 2015) von dem weder der Phänotyp, noch der Wirt noch das vollständige Genom vorhanden ist, ist die Bedeutung dieser Sequenz nicht zu beurteilen. Diese Informationen sind für eine bioinformatische Berechnung aufgrund eines Proteins zwar nicht entscheidend, sollten aber bei einer phylogenetischen Einordnung nicht

vernachlässigt werden. Aufgrund der Wichtigkeit dieser Informationen wurden für die weiterreichenden Phylogenien (Abb. 1.3.2 und Abb. 1.3.4) fast ausschließlich Viren verwendet, für die diese Faktoren bekannt sind.

Bei der Betrachtung der Faktoren Wirt, Genomorganisation und Genomgröße zeigte sich eine teilweise Übereinstimmung mit beiden großen Virenfamilien. So sind die Noda-, die Tombus- und die Oomyceten Viren, sowie LSV1 und CBpV alle einzelsträngige RNA Viren mit einer ikosaedrischen Hülle, die sich aus einem 180mer von Hüllproteinen zusammensetzt. Wenn man die Organisation und Größe der Genome betrachtet zeigt sich eine große Ähnlichkeit zwischen den Oomyceten Viren und den Nodaviren (Abb. 1.4.1). So sind PhV und die Nodaviren in zwei Segmente unterteilt die für die RdRp und das Hüllprotein kodieren. Auch die Größe mit 3,1 kb (RdRp) und 1,4 kb (CP) des Nodaviren Genoms ist der des PhV ähnlich. Im Gegensatz zu PhV, aber in Übereinstimmung mit SMV-A existiert bei den Nodaviren jedoch noch ein drittes, im Leserahmen verschobenes Protein. Die Gesamtgröße der Tombusviren ist mit etwa 4,5 kb ähnlich groß wie bei PhV und SMV-A, jedoch erfolgt hier im Genom keine Segmentierung. Auch besitzen die Tombusviren mit 5 Genen deutlich mehr als PhV, SMV-A und die Nodaviren.

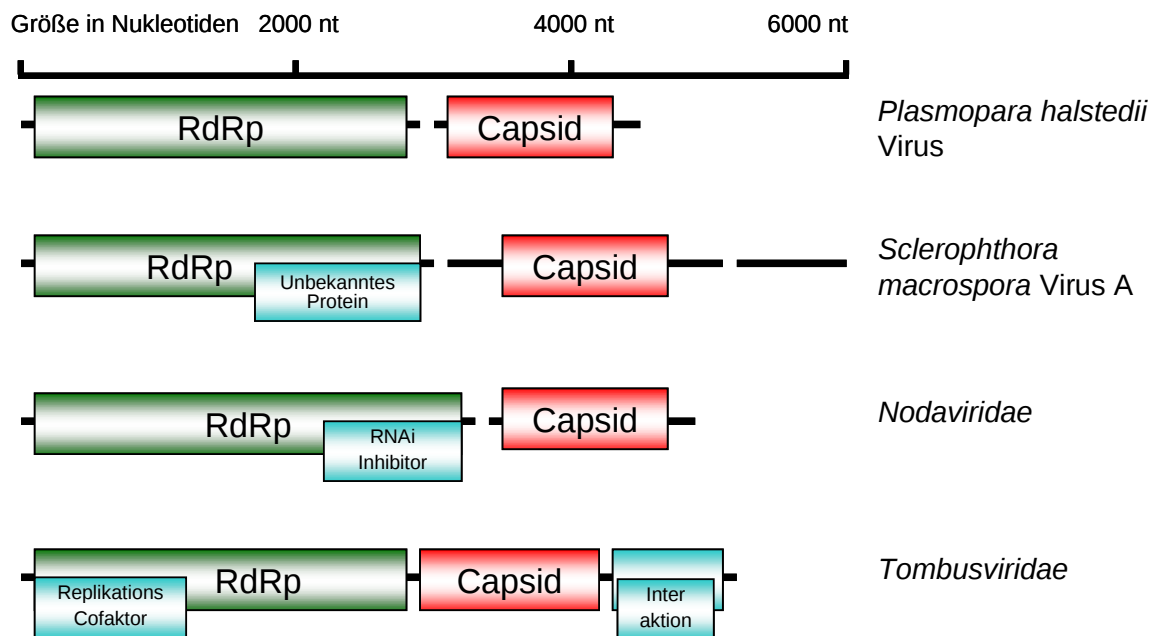


Abbildung 1.4.1: Organisation der verschiedenen ssRNA Viren. Schwarze Balken indizieren untranslatierte RNA Regionen der Viren und Virusfamilien, angelehnt an Runckel *et al.* (2012): Unterbrechungen zeigen die verschiedene Segmentierung der Viren in mehrere RNA Abschnitte. Überlagerte Abschnitte markieren die Bereiche für Frameshift Proteine.

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Genomorganisation sowie der RdRp wäre eine Einordnung am Rand der Nodaviren für PhV und SMV-A denkbar. Im Gegensatz dazu bestehen aber keine Übereinstimmungen zwischen den Sequenzen der Hüllproteine von PhV und SMV-A mit denen der Nodaviren. Auch die CPs von LSV1 und CBpV zeigen keine Ähnlichkeiten. Hier zeigt sich dafür eine sehr heterologe Gruppe aus chimerischen (Roux *et al.*, 2013; Krupovic *et al.*, 2015) und Hybridviren (Diemer und Stedman, 2013), sowie die Familie der Tombusviren in der Verwandtschaft (Abb. 1.3.3). In der Arbeit von Roux *et al.*, (2013) werden berechnete Proteinstrukturen der Hüllproteine von Tombusviren mit PhV verglichen und zeigen starke Analogien. Die ähnlichste bei NCBI gefundene Sequenz zu PhV ist das Tombunodavirus UC1, welches wie das Betegovirus qp1 aus Abwasserproben von San Francisco stammt (Greninger *et al.*, 2015). Von diesem Tombunodavirus ist ein Genom mit einer Struktur und Organisation ähnlich den Tombusviren bekannt. Allerdings ist diese Virus ebenfalls nicht klassifiziert und der Wirt sowie der Phänotyp nicht bekannt.

Da sich keine Einordnung aufgrund der einzelnen Proteine für die Oomyceten Viren vornehmen lässt, wurden die Proteine in dieser Arbeit gemeinsam betrachtet. Diese Phylogenetische Betrachtung der künstlichen kombinierten Sequenzen von RdRp und CP für Noda- und Tombusviren, sowie PhV, SMV-A, LSV1 und CBpV (Abb. 1.3.4) zeigen die Oomyceten Viren in der Mitte zwischen den großen Virusfamilien. Dies stellt einen Tausch der Plätze von PhV und SMV-A sowie LSV1 und CBpV dar. Das PhV und SMV-A hierbei keinen gemeinsamen Zweig belegen kann der immer noch großen Unterschiedlichkeit beider Viren geschuldet sein. Dennoch zeigen beide Viren, dass sie phylogenetisch eine Einheit bilden. Dies zeigt sich auch bei der Betrachtung der Wirte, die in dieser kombinierten Berechnung viel eindeutiger dargestellt ist als für die einzelnen Proteine (Abb. 1.3.1 und Abb. 1.3.3).

Unter Berücksichtigung aller in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen sich PhV und SMV-A keiner der beiden benachbarten Virusfamilien zuordnen. So sind die Ähnlichkeiten der einzelnen Proteine zu den entsprechenden Gruppen, wie in früheren Arbeiten dargestellt (Heller-Dohmen *et al.*, 2011) deutlich, jedoch weist das jeweils andere Protein immer starke Unterschiede zu diesen Gruppen auf. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei den Viren PhV und SMV-A um eine eigenständige Virusfamilie handelt.

II

Die Verbreitung und genetische Diversität des *Plasmopara halstedii* Virus in weltweiten Populationen des falschen Mehltaus der Sonnenblume

Der Großteil der hier vorgestellten Versuche und Ergebnisse wurde unter dem Titel „Occurrence and genetic diversity of the *Plasmopara halstedii* virus in sunflower downy mildew populations of the world“ (Grasse und Spring, 2015) im Journal *Fungal Biology* veröffentlicht.

2.1 Einleitung

Das *Plasmopara halstedii* Virus zeigt eine strikte Wirtsspezifität und wurde bisher ausschließlich in *Plasmopara halstedii*, dem Erreger der falschen Mehltaus der Sonnenblume gefunden (Gulya *et al.*, 1990; Heller-Dohmen *et al.*, 2009). Die globale Verbreitung von *P. halstedii* über alle Kontinente außer Australien ist bekannt (Gulya *et al.*, 1997; Gulya 2007; Viranyi & Spring 2011). Im Gegensatz dazu gibt es über die Verteilung von PhV von verschiedenen geographischen Ursprüngen nur eine elektronenmikroskopische Studie mit geringer Probenanzahl, die sowohl lokal wie zeitlich sehr begrenzt ist (Heller-Dohmen *et al.*, 2008, 2011). In diesen Arbeiten wurde außerdem die genetische Variabilität von PhV nicht weitergehend untersucht, da lediglich wenige Isolate komplett sequenziert wurden. Ähnlich verhält sich dies auch bei der Betrachtung anderer Mykoviren und liegt meistens am Fehlen des passenden Probenmaterials. Die einzige Arbeit, die sich mit dem Sachverhalt näher gehend beschäftigt, vergleicht das Vorkommen von verschiedenen Partitiviren in sieben verschiedenen *Heterobasidion* Arten. Hierbei wurden in 5% der untersuchten Pilze die Viren nachgewiesen. Es wurden drei verschiedene Stämme des HetRV Virus in zehn verschiedenen Proben entdeckt, jedoch wurden keine Details zu Sequenzvariationen oder genetischer Diversität dargestellt (Vainio *et al.*, 2011).

Durch intensive Sammlungen von *P. halstedii* in Mitteleuropa und Südamerika sowie dem Zugang zu Probenmaterial aus Osteuropa (F. Viranyi), Afrika, Asien und Nordamerika (T.J.

Gulya) waren wir in der Lage, das Vorkommen von PhV in Proben der letzten 40 Jahre zu untersuchen.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 *Plasmopara halstedii* Isolate

Für diese Arbeit wurden 128 *Plasmopara halstedii* Isolate, die in den vergangenen 40 Jahren in 17 Ländern auf fünf Kontinenten gesammelt wurden, auf die Anwesenheit von PhV getestet. Das Probenmaterial bestand aus frisch gesammelten oder zum Teil bis zu 40 Jahren eingefrorenen Sporangien, sowie infizierten, herbarisierten Sonnenblumenblättern. Das Ursprungsland, das Datum der Probennahme und die Beschaffenheit der Probe sind in Tabelle 2.3.1 dargestellt.

2.2.2 Nukleinsäure Extraktion und cDNA Synthese

Die Extraktion der gesamten RNA der Proben wurde nach dem Protokoll des Aurum RNA Extraction Kit (Bio-Rad, USA) durchgeführt. Im Fall der herbarisierten Proben wurde zusätzlich PolyclearAT mit 1 mg pro 10 mg Probe hinzugegeben um phenolische Komponenten zu binden. Die RNA wurde nach dem Herstellerprotokoll mit der RevertAid reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, USA) und Random-Hexamer Primern in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 2.2.1: Standart cDNA Synthese Protokoll.

RNA Template		11,5 µl
R6 Primer	[100 µM]	1 µl
60 °C	5 min	
4 °C	10 min	
Reaktionspuffer	5x	4 µl
dNTP	[10 mM]	2 µl
RevertAid™	[200 U]	1 µl
RiboLock™	[20 U]	0,5 µl
42 °C	60 min	
72 °C	10 min	

2.2.3 PCR basiertes Virus Screening

Die Untersuchungen zur Verbreitung von PhV wurden mittels PCR und vier unabhängigen Primerpaaren für kurze Abschnitte auf beiden Strängen des Virusgenoms (Tabelle 2.2.4) durchgeführt. Die Primer PHV_polF1/R1 und PHV_pol_F2/R2 wurden benutzt, um Fragmente von 294 nt und 390 nt Länge der RdRp zu amplifizieren. Die Primer 2f3/PHV_WG_R1 und PHV_WG_F1/R2 amplifizierten Fragmente des Hüllproteingenes mit den Längen 225 nt und 324 nt. Die Versuche wurden auf einem Thermocycler (PeqLab, Erlangen) mit dem in Tabelle 2.2.2 dargestellten Protokoll durchgeführt. Abschließend wurden die PCR Produkte auf einem zwei prozentigen Agarosegel (einfach TBE Puffer, Ethidiumbromid Färbung) aufgetrennt und analysiert. Die Proben wurden als virusfrei bewertet, wenn in zwei unabhängigen Experimenten kein Nachweis erfolgte.

Tabelle 2.2.2: Standart PCR Protokoll für das PhV Screening.

cDNA Template	0,5 µl
Forward Primer [25 µM]	0,5 µl
Reverse Primer [25 µM]	0,5 µl
RedTaq Mix	5 µl
H ₂ O	3,5 µl

94 °C	3 min	40 x
94 °C	20 s	
60 °C	20 s	
72 °C	20 s	
72 °C	5 min	

2.2.4 Vervielfältigung und Sequenzierung der cDNA

Zur Sequenzierung der PhV Stränge wurden lange Fragmente (> ca. 700 bp) amplifiziert. Hierzu wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, USA) mit *Proofreading* Aktivität und das in Tabelle 2.2.3 dargestellte Protokoll verwendet. Die

benutzten Primer sind mit den entsprechenden Positionsangaben und ihren Sequenzen in Tabelle 2.2.4 aufgelistet. Je 10 µl der Amplifikate von 700 bp bis 1700 bp wurden auf 1,5 prozentigen Agarosegelen überprüft. Vom verbleibenden Volumen der Reaktion wurde je 1 µl mit dem entsprechenden *Forward* bzw. *Reverse* Primer der Firma Macrogen (Amsterdam, NL) sequenziert.

Tabelle 2.2.3: PCR Protokoll mit Proofreading Polymerase für Amplifikate die später sequenziert werden sollen.

cDNA Template		0,5 µl
PCR Puffer	5x	2,5 µl
Forward Primer	[25 µM]	0,25 µl
Reverse Primer	[25 µM]	0,25 µl
Phusion Polymerase	[2 U]	0,125 µl
H ₂ O		7,625 µl

98 °C	5 min	
98 °C	20 s	40 x
X ^a °C	20 s	
72 °C	120 s	
72 °C	10 min	

^a abhängig von der Annealing-Temperatur der Primer (55 – 60 °C)

Tabelle 2.2.4: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer und deren Position im Genom von PhV.

Primer	Sequenz 5' - 3'	Ziel	5'	3'	Größe ^c
2f3 ^{a,b}	CTGGGTAGTGGAGACTACACA	Coat	222	242	225
PHV_WG_R1 ^a	TCCCTGCGATTCCACTGAGC	Coat	428	447	
PHV_WG_F1 ^a	TCAAGGGATCGATCGTATTCACA	Coat	355	377	
PHV_WG_R2 ^a	GGGTTCTCTTTGGGATCACATTC	Coat	657	679	324
PhV_Coat_UTR5_F1	TAAACAGCCCCGACGCAG	Coat	1	18	
PhV_Coat_UTR3_R4	TCGCCTATGCGGGTCTCC	Coat	1510	1528	
PHV_pol_F1 ^a	CATATGGCCTCCGGAAGACAATC	RdRp	1674	1697	294
PHV_pol_R1 ^a	TAACACTGATTTTTCCCGCTTTGA	RdRp	1946	1968	
PHV_pol_F2 ^a	TCCGACCTGAATACACGAATGA	RdRp	1754	1775	
PHV_pol_R2 ^a	GGTCCATAAAGCCGGTTCAAA	RdRp	2124	2144	390
PHV_pol_F5	TTCCCGGTTTAAAATCGTGAG	RdRp	822	842	
PHV_pol_R5	TCAGGTCGAAAGCCAATAA	RdRp	1744	1763	
PHV_pol_R7	GGGCTTCCTGCGGTTTG	RdRp	2738	2754	
PhV_RdRp_UTR5_F2	ATCACGCAGAGTACACTATG	RdRp	1	20	
PhV_RdRp_UTR3_R2	TGGATACTTAGGACATTGGC	RdRp	2773	2793	

^a Primer für das PhV Screening

^b Heller-Dohmen *et al.* 2011

^c Größe der PCR Fragmente in den Screening Versuchen

2.2.5 Sequenzvergleiche und phylogenetische Analysen

Die erhaltenen Sequenzen der einzelnen PhV Isolate wurden mit dem Programm SeqMan (Lasergene Suite; DNASTAR, USA) auf ihre Qualität überprüft und von den Primerstellen und unsauberen Abschnitten bereinigt. Anschließend wurden die einzelnen Sequenzen der entsprechenden Isolate zu kompletten Strängen kombiniert. Die so erhaltenen viralen Sequenzen wurden mit den Programmen BioEdit (Hall, 1999) und MEGA5 (Tamura *et al.*,

2011) aligned, verglichen und auf Unterschiede untersucht. Dabei wurden die Algorithmen clustalW (BioEdit) und muscle (MEGA5) verwendet. Als Referenzsequenzen wurden in allen Fällen die bereits publizierten Sequenzen HM453718 (CP) und HM453713 (RdRp) genutzt (Heller-Dohmen *et al.* 2011). Diese Alignments bildeten die Grundlage für die Berechnung der durchschnittlichen genetischen Distanz zwischen den Isolaten (MEGA5) und der einfachen Darstellung eines Stammbaums mit dem *maximum likelihood* Algorithmus des Webservers von *phylogeny.fr*. Die Darstellung des Stammbaums erfolgte mit der Software FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk>).

2.2.6 Modellierung der Sekundär Strukturen

Die Darstellung der RNA Sekundärstrukturen beruht auf thermodynamischen Berechnungen und wurde mit dem *minimal free energy* (mfe) Algorithmus des Webservers rna.tbi.univie.ac.at der Universität Wien durchgeführt (Zucker & Stiegler 1981; Hofacker *et al.* 1994). Die Visualisierung der RNA Sekundärstrukturen erfolgte mit dem Programm PseudoViewer 2.5 (Han & Byun 2003).

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Vorkommen und Verteilung von PhV

Die virale RNA konnte erfolgreich aus den *Plasmopara halstedii* Proben der letzten 40 Jahre extrahiert und in cDNA umgeschrieben werden. Das Screening wurde mit vier spezifischen Primerpaaren für kurze Sequenzen der beiden RNA Stränge durchgeführt und zeigte die Präsenz von *Plasmopara halstedii* Virus in nahezu allen Proben. Hierbei spielte es keine Rolle, ob die Proben aus eingefrorenen Sporangien, frisch geernteten Sporangien oder älteren herbarisierten, sichtbar infizierten Sonnenblumenblättern stammten. Von den 128 getesteten Proben mit unterschiedlichem Alter und Ursprung wurde in 117 PhV nachgewiesen (Abb. 2.3.1; Tab. 2.3.1). Dies bedeutet, dass über 90% des untersuchten *P. halstedii* Materials das virale Genom enthielt. In allen positiv getesteten Proben wurden PCR Produkte beider RNA Stränge nachgewiesen. Mit diesem System konnten die bisher mittels Elektronenmikroskopie erhobenen, positiven und negativen Ergebnisse in den Proben von Heller-Dohmen *et al.* (2008) bestätigt werden. PhV freie Isolate wurden in Nordamerika (2 von 21), Südamerika (1 von 5) und Europa (8 von 91) gefunden, wogegen Isolate aus Afrika (9) und Asien (3) durchweg PhV Sequenzen aufzeigten. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem geographischen Ursprung, dem Alter der Probe sowie der An- bzw. Abwesenheit des Virus. Die älteste Probe in der das Virus nachgewiesen werden konnte stammte aus dem Jahr 1972 und aus Ungarn. Die älteste virusfreie Probe stammte aus dem Jahr 1988 aus Frankreich.

Für die leicht erhöhte Rate an virusfreien Proben aus Deutschland (6 von 45) und der Schweiz (1 von 1) ist erwähnenswert, dass der Großteil dieser Isolate aus kleinen Schnittblumenfeldern stammt. In diesen Fällen werden Sonnenblumen unbekannter Züchtung und meistens ohne chemischen Schutzmittel gegen Falschen Mehltau über viele Jahre immer wieder auf derselben Feldfläche angebaut. Diese *P. halstedii* Populationen sind daher für einen längeren Zeitraum lokal isoliert geblieben und haben sich vermutlich daher nicht mit virushaltigen Stämmen vermischt.

Tabelle 2.3.1: Übersicht der im Screening getesteten *P. halstedii* Isolate und die Anwesenheit von PhV.

#	Sammler	Ursprung	Datum	Material	PhV	#	Sammler	Ursprung	Datum	Material	PhV
1	TG	Arg	1999	fs	+	65	OS	Deu	2011b	s	-
2	TG	Arg	2000a	fs	+	66	OS	Deu	2011c	s	-
3	TG	Arg	2000b	fs	+	67	OS	Deu	2012a	s	+
4	OS	Arg	2003a	hl	+	68	OS	Deu	2012b	s	+
5	OS	Arg	2003b	hl	-	69	OS	Deu	2012c	s	+
6	OS	Aus	1999a	hl	+	70	OS	Deu	2012d	s	+
7	OS	Aus	1999b	hl	+	71	OS	Deu	2012e	s	-
8	TG	Bul	1990	fs	+	72	OS	Deu	2012f	s	+
9	TG	Bul	1999	fs	+	73	OS	Deu	2012g	s	+
10	TG	Kan	1991	fs	+	74	OS	Deu	2012h	s	+
11	TG	Kan	1992	fs	+	75	OS	Deu	2012i	s	+
12	TG	Kan	1995	fs	+	76	OS	Deu	2012j	s	+
13	TG	Kan	1996a	fs	+	77	FV	Hun	1972	hl	+
14	TG	Kan	1996b	fs	+	78	FV	Hun	1974	hl	+
15	TG	Kan	1998	fs	+	79	FV	Hun	1976	hl	+
16	OS	Kan	2001	hl	+	80	FV	Hun	1984a	hl	+
17	OS	Kan	2002	hl	-	81	FV	Hun	1984b	hl	+
18	FV	Chi	1987	hl	+	82	TG	Hun	1988	fs	+
19	TG	Chi	1992	fs	+	83	FV	Hun	1989	hl	+
20	TG	Fra	1988	fs	-	84	TG	Hun	1990a	fs	+
21	TG	Fra	1989	fs	+	85	TG	Hun	1990b	fs	+
22	TG	Fra	1991	fs	+	86	TG	Hun	1991	fs	+
23	TG	Fra	1998	fs	+	87	TG	Hun	1992	fs	+
24	OS	Fra	1999	hl	+	88	TG	Hun	1993	fs	+
25	TG	Fra	2000a	fs	+	89	TG	Hun	1995a	fs	+
26	OS	Fra	2000b	hl	+	90	FV	Hun	1995b	hl	+
27	OS	Fra	2000c	hl	+	91	OS	Hun	2001a	hl	+
28	OS	Fra	2000d	hl	+	92	OS	Hun	2001b	hl	+
29	OS	Fra	2000e	hl	+	93	TG	Ind	1995	fs	+
30	TG	Deu	1992	fs	+	94	TG	Ita	1998	fs	+
31	OS	Deu	1993	hl	+	95	TG	Mar	1997a	fs	+
32	OS	Deu	1996	hl	+	96	TG	Mar	1997b	fs	+
33	OS	Deu	1997a	hl	+	97	TG	Mar	1997c	fs	+
34	OS	Deu	1997b	hl	+	98	TG	Mar	1998	fs	+
35	OS	Deu	1998a	hl	+	99	OS	Slo	1999	hl	+
36	OS	Deu	1998b	hl	+	100	TG	S.Af	1996a	fs	+
37	OS	Deu	2000	hl	+	101	TG	S.Af	1996b	fs	+
38	OS	Deu	2001a	hl	+	102	TG	S.Af	1996c	fs	+
39	OS	Deu	2001b	hl	+	103	TG	S.Af	1997a	fs	+
40	OS	Deu	2001c	hl	-	104	TG	S.Af	1997b	fs	+

41	OS	Deu	2003a	hl	+
42	OS	Deu	2003b	hl	+
43	OS	Deu	2003c	hl	+
44	OS	Deu	2003d	hl	+
45	OS	Deu	2003e	hl	+
46	OS	Deu	2004a	hl	+
47	OS	Deu	2004b	hl	+
48	OS	Deu	2004c	hl	+
49	OS	Deu	2004d	hl	+
50	OS	Deu	2004e	hl	+
51	OS	Deu	2005a	hl	+
52	OS	Deu	2005b	hl	+
53	OS	Deu	2005c	hl	+
54	OS	Deu	2005d	hl	+
55	OS	Deu	2005e	hl	+
56	OS	Deu	2008a	hl	+
57	OS	Deu	2008b	hl	+
58	OS	Deu	2008c	hl	+
59	OS	Deu	2010a	s	-
60	OS	Deu	2010b	s	+
61	OS	Deu	2010c	s	-
62	OS	Deu	2010d	s	+
63	OS	Deu	2010e	s	-
64	OS	Deu	2011a	s	+
105	TG	Spa	1986	fs	+
106	TG	Spa	1994	fs	+
107	TG	Spa	1997	fs	+
108	TG	Spa	1998	fs	+
109	TG	Spa	1999	fs	+
110	OS	CH	2011	hl	-
111	TG	Tür	1996a	fs	+
112	TG	Tür	1996b	fs	+
113	TG	Tür	1997a	fs	+
114	TG	Tür	1997b	fs	+
115	TG	Tür	1997c	fs	+
116	TG	USA	1985a	fs	+
117	TG	USA	1985b	fs	+
118	TG	USA	1988	fs	+
119	TG	USA	1989	fs	+
120	TG	USA	1991a	fs	+
121	TG	USA	1991b	fs	+
122	TG	USA	1992	fs	+
123	OS	USA	1993	hl	+
124	TG	USA	1994	fs	+
125	OS	USA	1997	hl	+
126	TG	USA	1998	fs	+
127	TG	USA	1999	fs	+
128	OS	USA	2007	hl	-

^aTG: T. Gulya; OS: O. Spring; FV: F. Viranyi

^bArg: Argentinien; Aus: Österreich; Bul: Bulgarien; Kan: Kanada; Chi: China; Fra: Frankreich; Deu: Deutschland; Hun: Ungarn; Ind: Indien; Ita: Italien; Mar: Marokko; Slo: Slowakei; S.Af: Südafrika; Spa: Spanien; CH: Schweiz; Tür: Türkei

^cfs: gefrorene Sporangien; hl: herbarisierte Blätter; s: frische Sporangien

^d(+)Anwesenheit von PhV, (-) Abwesenheit von PhV

hellgrau zeigt Proben die zusätzlich mikroskopisch mittels TEM von Heller-Dohmen *et al.* (2008) getestet wurden

dunkelgrau zeigt Proben die vollständig Sequenziert wurden

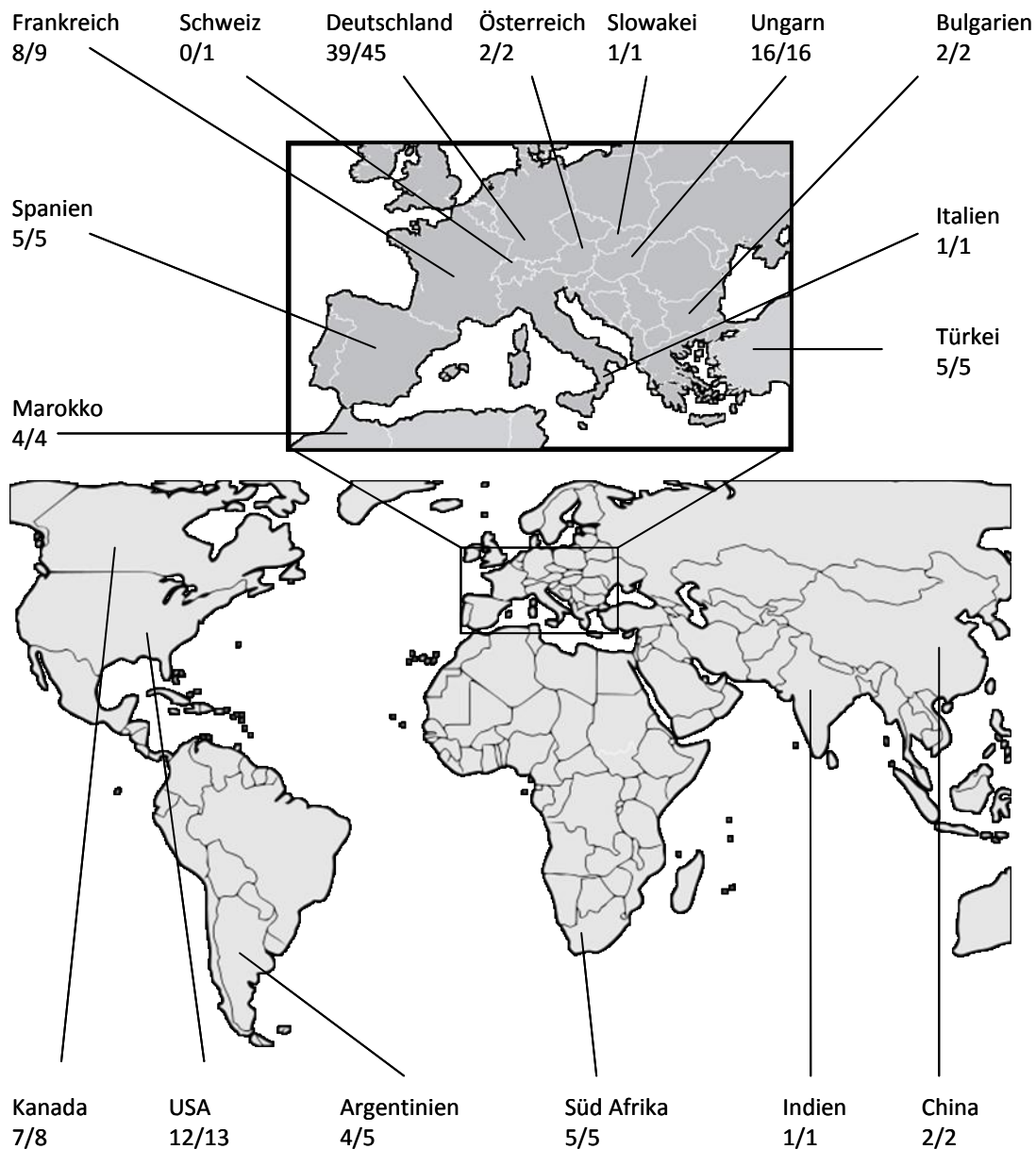


Abbildung 2.3.1: Die globale Verbreitung von PhV. Die Anzahl der PhV beinhaltenden gegenüber der Gesamtanzahl an *P. halstedii* Proben sind unter den Namen der Ursprungsländer dargestellt. Die Karte wird von <http://www.freeworldmaps.net/pdf/maps.html> zu Verfügung gestellt.

2.3.2 Sequenzvariationen in den ORFs

Die kurzen Sequenzabschnitte von RdRp und CP für das PhV Screening konnten ohne weiteres bei allen virushaltigen Isolaten amplifiziert werden. Im Gegensatz dazu war es wesentlich schwerer, längere Amplifikate zu erhalten. Möglicherweise spielte hierbei eine teilweise Degradation der RNA während der Lagerungszeit eine Rolle. Die Sequenzierung des gesamten offenen Leserahmens (ORF) von 2745 Nukleotiden (nt.) im Falle der RdRp und 1128 Nukleotiden im Falle des CP gelang für 22 Proben aus 13 verschiedenen Ländern. Die Alignments der 3873 Nukleotide zeigten fünf Positionen an denen Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) regelmäßig vorkamen. Zusätzlich wurden 13 Positionen entdeckt, an denen ein SNP bei nur einer oder zwei Sequenzen vorlag. Im Vergleich mit dem Referenzgenom für PhV (Genbank PhV CP HM453718 und RdRp HM453713), welches hier als Probe #24 geführt wird, waren die fünf regelmäßigen SNPs an den Positionen nt. 1242 (A/G Substitution) und nt. 2443 (A/G) im Falle der RdRp (RNA1) und an den Positionen nt. 372 (C/T), nt. 700 (T/G) und nt. 888 (C/T) für das Hüllprotein (RNA2) lokalisiert. Diese fünf Substitutionen zeigten nur in drei Fällen eine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz der entsprechenden Proteine, da SNP RNA1 1242 und SNP RNA2 700 stille Mutationen sind. Der Austausch SNP RNA1 2443, der eine Änderung von Alanin zu Threonin zur Folge hat, zeigte sich in 18 der 22 Proben. Die SNPs RNA2 372 und 888 führen zu einem Alanin/Valin und einem Threonin/Isoleucin Austausch im Hüllprotein. Von diesen Austauschen wurde der erste in 15, der zweite in 5 von 22 Proben entdeckt. Die 13 zusätzlichen SNPs führten zu 11 weiteren Austauschen in den Aminosäuresequenzen der RdRp (nt. 1972 Alanin/Threonin, nt. 1973 Alanin/Valin, nt. 2173 Methionin/Valin, nt. 2467 Phenylalanin/Valin, nt. 2583 Aspartat/Glutamat und nt. 2598 Histidin/Glutamin) und des Hüllproteins (nt. 400 Isoleucin/Methionin, nt. 542 Valin/Isoleucin, nt. 674 Glutamat/Glutamin, nt. 679 Asparagin/Lysin und nt. 728 Serin/Threonin). Die höchste Anzahl an SNPs (8) im Vergleich zur Referenz fand sich in einer argentinischen Probe aus dem Jahr 1999 (#1). Keines der sequenzierten Isolate war mit der Referenz komplett identisch. Die geringsten Abweichungen in den offenen Leserahmen zeigten zwei Proben aus Kanada (#13, 1996a) und Deutschland (#51, 2005a) mit nur 1 Basenaustausch. In keiner der Proben konnte eine Korrelation zwischen SNPs in den Sequenzen der Polymerase und denen im Hüllprotein festgestellt werden. Auch ein Zusammenhang zwischen den Sequenzen und dem geographischem oder zeitlichen Ursprung der Probe konnte nicht festgestellt werden. So wurden zwar sieben Isolate

mit komplett identischen ORFs gefunden werden (Tab. 2.3.2, Markierung durch Seitenbalken), allerdings waren diese Proben von drei verschiedenen Kontinenten und über einen Zeitraum von 12 Jahren gesammelt worden. In vier der Proben (Bulgarien 1999, USA 1999, Argentinien 2000b und Deutschland 2003) wurden Mischpopulationen zweier verschiedener PhV Genotypen gefunden. Die Berechnung der genetischen Diversität der 22 Isolate zeigte sehr geringe Werte mit durchschnittlichen Distanzen von 0,001 (entspricht 1 Basenaustausch auf 1000 bp) für die RdRp und 0,002 für das Hüllprotein.

Tabelle 2.3.2: Übersicht über SNPs in verschiedenen PhV ORFs und deren Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz der entsprechenden Proteine.

Probe	Land	Datum	RdRp ^a			CP ^b			
			1242 A/G	2443 G/A	Zusätzliche SNPs	372 T/C	700 T/G	888 C/T	Zusätzliche SNPs
24	Frankreich^c	1999	A	G	-	T	T	C	-
43	Deutschland	2003c	A/G	G	-	C	T	C	-
51	Deutschland	2005a	A	G	-	C	T	C	-
9	Bulgarien	1999	A	G	2598 (T/A)	C	G	C/T	637 (A/G)
58	Deutschland	2008c	A	A	-	C	T	C	-
89	Ungarn	1995a	A	A	-	C	G	C	-
13	Kanada	1996a	A	A	-	T	T	C	-
2	Argentinien	2000a	A	A	1972 (G/A); 1973 (C/T)	T	T	T	542 (G/A); 728 (T/A)
3	Argentinien	2000b	A/G	A	2467 (T/G)	T	T	T	-
11	Kanada	1992	G	A	888 (C/A); 2173 (A/G)	C	G	C	-
93	Indien	1995	G	A	-	C	G	C	-
127	USA	1999	G	A	-	C	T/G	C	637 (A/ A/G)
21	Frankreich	1989	G	A	-	C	T	C	-
94	Italien	1998	G	A	-	C	T	C	-
95	Marokko	1997a	G	A	-	C	T	C	-
100	S. Afrika	1996	G	A	-	C	T	C	-
105	Spanien	1986	G	A	-	C	T	C	-
122	USA	1992	G	A	-	C	T	C	-
124	USA	1994	G	A	-	C	T	C	-
113	Türkei	1997a	G	A	-	T	T	C	-
1	Argentinien	1999	G	A	1973 (C/T); 2583 (C/A)	T	T	T	400 (T/G); 674 (G/C); 679 (C/A)
8	Bulgarien	1990	G	A	-	T	T	T	-

^aRdRp: Position 888 führt zu (thr/thr); 1242 (ala/ala); 1972 & 1973 (ala/thr); 1973 (ala/val); 2443 (thr/ala); 2173 (met/val); 2467 (phe/val); 2583 (asp/glu); 2598 (his/gln)

^bCP: Position 372 führt zu (val/ala); 400 (ile/met); 542 (val/ile); 637 (ser/ser); 674 (glu/gln); 679 (asn/lys); 700 (val/val); 728 (ser/thr); 888 (iso/thr)

^cGenebank Referenz HM453713 und HM453718

Längsleisten markieren identische Genotypen

2.3.3 Sequenzvariationen in den UTRs

Die untranslatierten Bereiche (UTR) des ersten RNA Strangs (RdRp) waren zu kurz (18 nt. und 30 nt.), um mit herkömmlichen PCR Methoden Fragmente für Sequenzvergleiche zu erhalten. Daher wurden diese Bereiche nicht in die nachfolgende Analyse mit einbezogen. Der Fokus wurde folglich auf die UTRs der RNA2 (CP) gelegt, welche mit 164-166 Nukleotiden im 5' und 234 Nukleotiden im 3' Bereich wesentlich größer sind. Die kompletten Sequenzen für die beiden UTRs wurden für 12 Isolate aus 9 Ländern erhalten. Hierbei zeigte die 5'UTR lediglich eine Deletion zweier Adenine an den Positionen 30 und 31 in drei Fällen (#21, 24, 94). Hierbei ist zu erwähnen, dass die Referenzsequenz (#24) diese Deletion aufwies. Dies führte dazu, dass die Positionsangaben der SNPs sich auf Sequenzen ohne die Deletion beziehen, da sich sonst eine Verschiebung von 2 Stellen ergeben würde. In der 3'UTR wurden fünf verschiedene SNPs gefunden die in mehr als einem Isolat und an den Positionen 1322 (A/G), 1394 (A/C), 1449 (C/U), 1464 (G/A) und 1504 (A/G) auftraten. Drei weitere SNPs (1461 (G/A), 1475 (U/G) und 1482 (A/C)) wurden nur in einzelnen Proben gefunden. Die höchste Ansammlung an SNPs gegenüber der Referenzsequenz, dem französischen Isolat #24, zeigte sich in Proben aus Argentinien (#1) und Bulgarien (#8). Jeweils zwei Proben, aus Marokko und der Türkei (#95, #113) sowie aus Kanada und Indien (#13, #99), wiesen komplett identische UTRs auf. Die Berechnung der genetischen Diversität der 12 Isolate zeigte für die CP UTR Bereiche eine durchschnittliche Distanz von 0,025.

Tabelle 2.3.3: Übersicht über SNPs in verschiedenen PhV UTRs. Abweichungen gegenüber der Referenzsequenz sind grau unterlegt.

Probe	Land	Datum	cP UTR								
			30 - -/AA	1322 G/A	1394 A/C	1449 T/C	1461 G/A	1464 G/A	1475 T/G	1482 A/C	1504 G/A
24	Frankreich^a	1999	- -	G	A	T	G	G	T	A	G
94	Italien	1998	- -	G	A	C	G	G	T	A	G
21	Frankreich	1989	- -	G	C	C	G	G	T	A	A
95	Marokko	1997a	AA	G	C	C	G	G	T	A	A
113	Türkei	1997a	AA	G	C	C	G	G	T	A	A
13	Kanada	1996a	AA	G	A	C	G	G	T	A	G
93	Indien	1995	AA	G	A	C	G	G	T	A	G
82	Ungarn	1988	AA	G	A	T	G	G	T	A	A
1	Argentinien	1999	AA	A	A	C	A	A	G	A	G
3	Argentinien	2000b	AA	A	A	C	G	G	T	A	G
8	Bulgarien	1990	AA	A	A	C	G	A	T	C	G
2	Argentinien	2000a	AA	A	A	T	G	G	T	A	G

^aGenebank Referenz HM453718

Um den Einfluss der Änderungen in der Nukleotidsequenz zu bestimmen wurde die mögliche Sekundärstruktur der RNA nach dem *minimum free energy* Modell (Zucker und Stiegler, 1981) berechnet. Hierbei zeigte sich, dass die nachgewiesenen SNPs keinen Einfluss auf die Struktur der viralen RNA ausüben (Abb. 2.3.2 und 2.3.3).

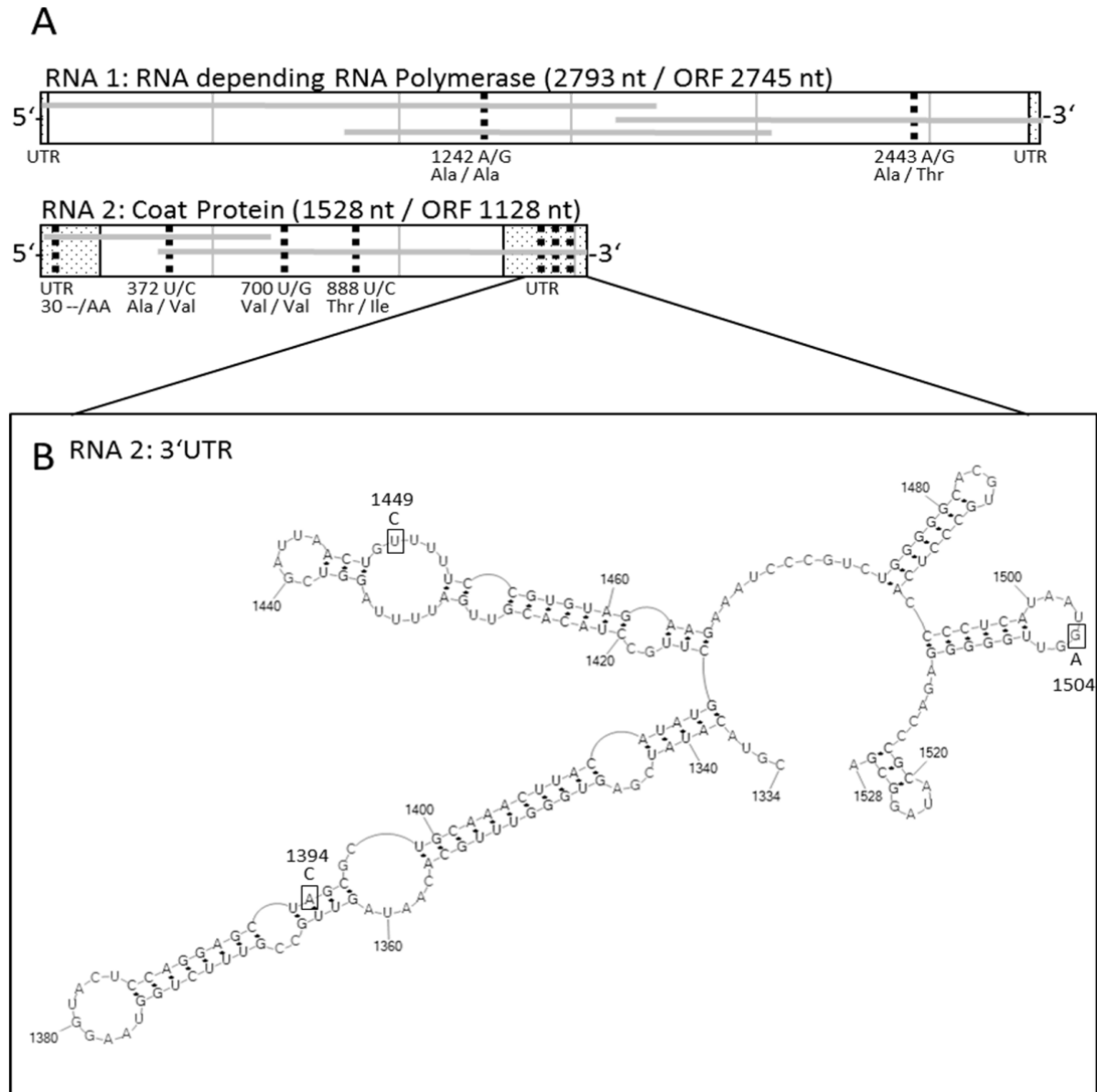


Abbildung 2.3.2: Schematische Darstellung der zwei RNA Stränge von PhV und die Positionen der konstanten SNPs (A). RNA 1 und 2 mit markierten SNPs. Die Zahlen verweisen auf die Position der SNPs, die Art des Nukleotid Austausches sowie die Auswirkung auf die Aminosäuresequenz. Die sequenzierten Abschnitte sind durch graue Linien markiert. (B) Theoretische Sekundärstruktur der 3'UTR von RNA 2 nach dem minimum free energy Model. Die Zahlen weisen auf die Position der SNPs -: Gap Position; A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanidin; U: Uracil; Ala: Alanin; Iso: Isoleucin; Thr: Threonin; Val: Valin.

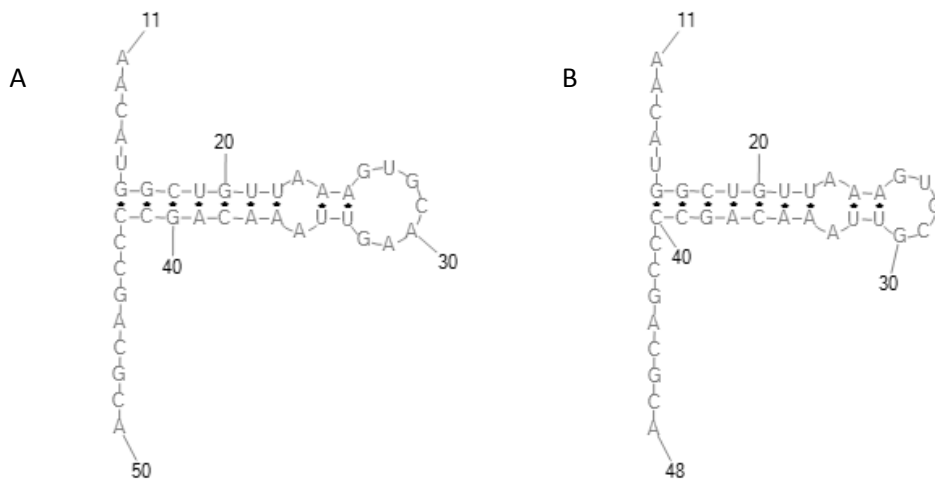


Abbildung 2.3.3: Theoretische Sekundärstruktur der 5'UTR von RNA 2 nach dem minimum free energy Model. Hierbei zeigt (A) an den Positionen 30 und 31 jeweils ein Adenin auf. Bei (B) sind die Adenine nicht vorhanden.

2.3.4 Phylogenetische Analyse der gesamten Sequenzen

Für die phylogenetische Analyse der gesamten PhV Sequenzen wurden die beiden RNA Stränge mit ihren UTRs zu einer Sequenz verbunden. Die so kombinierten Sequenzen wurden mit dem MUSCLE Algorithmus miteinander abgeglichen und mit der Maximum Likelihood Methode ein Phylogramm erstellt (Abb. 2.3.5). Als Outgroup wurde die Referenz #24 aus Frankreich verwendet. Hierbei zeigte sich, dass die Isolate aus Argentinien (1999 und 2000a) sowie aus Kanada (1992) die größten Unterschiede gegenüber der Referenz aufzeigen. Insgesamt wurden drei Gruppen von nahezu identischen PhV Isolaten gefunden. Zwei dieser Gruppen zeigten sich als inhomogen was Alter und Ursprung angeht. Die erste dieser Gruppen setzte sich aus Isolaten der USA (1992 und 1994), Spanien (1986), Italien (1998) und Südafrika (1996), und die zweite aus den Isolaten aus Marokko (1997) und Frankreich (1989) zusammen. Die dritte Gruppe beinhaltete zwei Proben aus Leinfelden, Deutschland, aus den Jahren 2003 und 2005.

Zusätzlich wurde die genetische Diversität der kombinierten Sequenzen betrachtet. Die hierbei ermittelte Durchschnittsdistanz über alle ORFs zusammen ergab einen Wert von 0,0013. Die hierbei größte Diversität zeigte sich zwischen den Isolaten aus Argentinien (1999) und Bulgarien (1999) mit einem Wert von 0,0042 sowie Argentinien (2000a) und Kanada (1992) mit dem Wert 0,0039 (Abb. 2.3.4). Bei der Betrachtung der Diversität konnten

die ersten beiden Gruppen des Phylogramms bestätigt werden. Lediglich die Gruppe der Proben aus Deutschland zeigte eine Varianz von 0,0003 auf. Der ermittelte Stammbaum über diese Sequenzen ist in der Abbildung 2.3.5 dargestellt.

Fra_05	2,9	1,9	1,6	1,3	0,3	1,3	1,3	1,0	1,3	0,6	1,0	1,6	1,9	1,0	1,0	0,3	0,6	1,6	1,0	1,0	1,0
Arg_99		2,9	2,3	1,6	2,6	2,9	2,9	2,6	2,9	2,9	2,6	4,2	3,6	2,6	2,6	3,2	3,2	3,2	2,6	2,6	3,2
Arg_00a			2,3	1,9	2,3	3,2	3,2	2,9	3,2	2,6	2,9	3,2	3,9	2,9	2,3	2,3	2,6	3,6	2,9	2,9	2,9
Arg_00b				0,6	1,3	1,9	1,9	1,6	1,9	1,6	1,6	2,9	2,6	1,6	1,3	1,9	1,6	2,3	1,6	1,6	1,9
Bul_90					1,0	1,3	1,3	1,0	1,3	1,3	1,0	2,6	1,9	1,0	1,0	1,6	1,6	1,6	1,0	1,0	1,6
Can_96						1,0	1,0	0,6	1,0	0,3	0,6	1,9	1,6	0,6	0,6	0,6	1,0	1,3	0,6	0,6	0,6
Fra_89							0,6	0,3	0,0	0,6	0,3	2,3	1,3	0,3	1,0	1,0	1,0	1,0	0,3	0,3	1,0
Ind_95								0,3	0,6	1,3	0,3	1,6	0,6	0,3	1,0	1,0	1,0	0,6	0,3	0,3	0,3
Ita_98									0,3	1,0	0,0	1,9	1,0	0,0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,0	0,0	0,6
Mar_97										0,6	0,3	2,3	1,3	0,3	1,0	1,0	1,0	1,0	0,3	0,3	1,0
Tur_97											1,0	2,3	1,9	1,0	1,0	1,0	1,3	1,6	1,0	1,0	1,0
Saf_96												1,9	1,0	0,0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,0	0,0	0,6
Bul_99													2,3	1,9	1,9	1,3	1,6	1,9	1,9	1,9	1,3
Can_92														1,0	1,6	1,6	1,6	1,3	1,0	1,0	1,0
Spa_86															0,6	0,6	0,6	0,6	0,0	0,0	0,6
Ger_08																0,6	1,0	1,3	0,6	0,6	0,6
Ger_05																	0,3	1,3	0,6	0,6	0,6
Ger_03																		1,3	0,6	0,6	1,0
US_99																			0,6	0,6	1,0
US_94																				0,0	0,6
US_92																					0,6
Hun_95																					

Abbildung 2.3.4: Berechnete Distanzmatrix aller erhaltenen PhV Sequenzen. Die genetischen Distanzen sind mit den Promille Werten angegeben (10^{-3}) und beziehen sich auf die Unterschiede pro 1000 Nukleotiden. Je höher der berechnete Wert ist, desto unterschiedlicher sind die beiden Isolate zueinander. Ein Resultat von 0,0 bedeutet, dass die Sequenzen identisch sind.

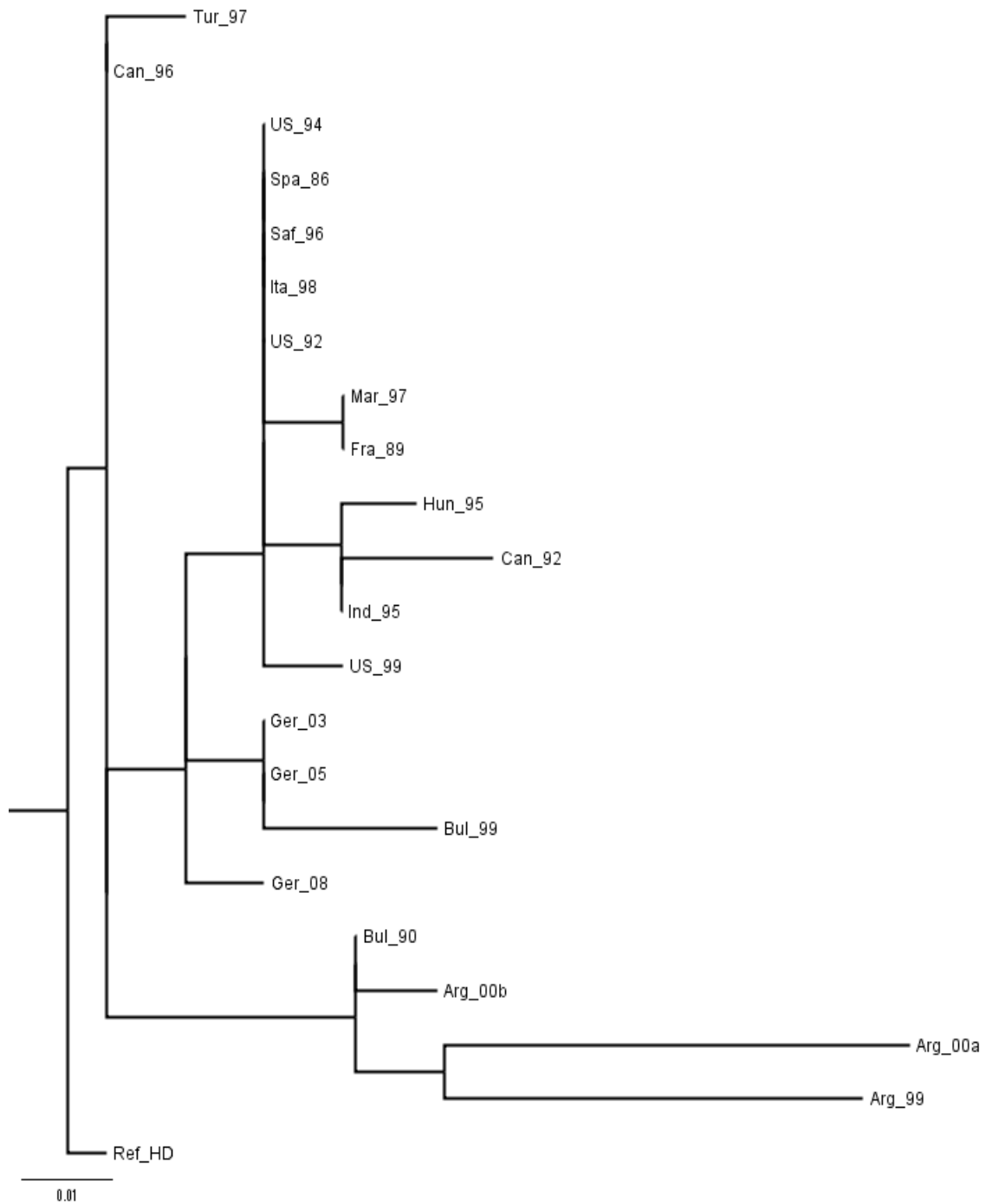


Abbildung 2.3.5: Phylogenetische Darstellung (Maximum likelihood, Poisson Model) der verschiedenen PhV Isolate. Der Maßstab stellt 1% Abweichung in der Nukleotidsequenz der Isolate dar. Abschnitte die auf der gleichen vertikalen Linie liegen sind identisch.

2.4 Diskussion

Seit der ersten Beobachtung des *Plasmopara halstedii* Virus in einem Isolat des Erregers des Falschen Mehltaus der Sonnenblume aus Nordamerika (Gulya *et al.* 1990) wurde das Virus durch elektronenmikroskopische Analysen in verschiedenen *P. halstedii* Proben von unterschiedlicher Herkunft und Pathotyp nachgewiesen (Heller-Dohmen *et al.*, 2008). Abgesehen davon wurde jedoch noch keine erweiterte Untersuchung über die geographische und zeitliche Verteilung des Virus durchgeführt. Durch den Zugang zu *P. halstedii* Isolate aus drei Sammlungen aus Nordamerika, Ungarn und Deutschland ergab sich die Möglichkeit nach PhV Sequenzen in Proben von allen fünf Kontinenten, auf denen der Falsche Mehltau der Sonnenblume beobachtet wurde, zu suchen. Zusätzlich ergab sich dadurch die Chance zu ergründen ob sich das Virus mit seinem Wirt gleichzeitig verbreitet, oder ob es sich kurzfristig unterschiedlich in verschiedenen Wirtspopulationen entwickelt. Im Gegensatz zu den vorherigen Studien von Heller-Dohmen *et al.* (2008), in denen das Virus durch Transelektronenmikroskopie nachgewiesen wurde, wurde in dieser Arbeit ein PCR basiertes Testsystem eingeführt. Dieses System diene der Amplifikation von kurzen Sequenzabschnitten beider RNA Segmente von PhV. Um Falsch-Negative Ergebnisse durch RNA Degradierung zu vermeiden wurde mit verschiedenen Primern auf beiden Strängen gearbeitet. Die Primer wurden auf der Basis von veröffentlichten Genomen von fünf PhV Isolaten (Heller-Dohmen *et al.*, 2011) und waren speziell für kurze Fragmente erstellt, welche vor allem in älteren *P. halstedii* Proben erwartet wurden. Erstaunlicherweise wurden in allen Proben vor 1988 Sequenzen von PhV nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob die Proben für Jahrzehnte bei Raumtemperatur auf infizierten Sonnenblumenblättern oder tiefgefroren als abgesammelte Sporangien gelagert worden waren. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die sehr große Anzahl an Virionen im Zellplasma des Oomyceten, wie es auch schon von Heller-Dohmen *et al.* (2008) gezeigt wurde. Eine andere Erklärung wäre eine sehr hohe Stabilität der RNA von PhV und, dass diese vor Degradierung durch verschiedene Mechanismen wie RdRp-Proofreading oder Endcapping geschützt werden, wie kürzlich in verschiedenen Publikationen veröffentlicht wurde (Dickson und Wilusz, 2011 und Barr und Fearn, 2010). Die gelungene Extraktion viraler RNA aus herbarisierten Sonnenblumenblättern zeigt Ähnlichkeiten zu Arbeiten an Pflanzenviren, deren Erbgut aus 100-150 Jahre alten Herbarproben gewonnen werden konnte (Fraile *et al.*, 1997; Malmstrom

et al., 2007). Vor kurzem konnte sogar die RNA eines *Barley Stripe mosaic* Virus aus einer 750 Jahre alten archäologischen Probe sequenziert werden (Smith *et al.*, 2014).

Im Vergleich zu den bisherigen TEM Studien erwies sich das PCR basierte System als viel schneller, ökonomischer und wesentlich sensitiver. Allerdings muss die Amplifikation viraler RNA nicht zwingend die Anwesenheit eines Virus bedeuten, da in anderen Oomyceten virale RNA ohne entsprechende Virionen gefunden wurde (Tooley *et al.*, 1998). Bisher wurde jedoch dieser Fall bei *P. halstedii* nicht entdeckt. Daher wurden in dieser Arbeit 14 Proben verwendet, welche vormals bereits von Heller-Dohmen *et al.* (2008) mittels TEM untersucht wurden. Hierbei zeigte sich, dass die 12 als positiv betrachteten auch im PCR System gut detektiert werden konnten. Ebenfalls wurde in zwei Proben, in denen keine Virionen beobachtet wurden, mit keinem Primerpaar eine PhV Sequenz nachgewiesen.

Die Anwesenheit von PhV in über 90% der untersuchten Proben bestätigt vorherige Ergebnisse (Heller-Dohmen *et al.*, 2008), in denen von einer hohen Rate an mit PhV infizierten *P. halstedii* Isolaten berichtet wurde. Ein Vergleich mit anderen Oomyceten-Viren wie SMV-A, SMV-B (Yokoi *et al.*, 1999, 2003) oder *Phytophthora infestans* RNA Virus (Cai *et al.*, 2009, 2012, 2013) ist auf Grund zu wenig veröffentlichter Daten nicht möglich. Eine Studie über verschiedene Partitiviren Stämme in *Heterobasidion* Spezies zeigte eine wesentlich geringere Rate an Virusinfektionen, die hierbei nur etwa 5% erreichte (Vainio *et al.*, 2011). Kürzlich wurde noch eine Arbeit zur Verbreitung von Partitiviren im Reispathogen *Ustilaginoidea virens* veröffentlicht (Jiang *et al.*, 2015) in der von 188 aus 198 Isolaten berichtet wird, die virale RNA enthielten.

Virus freie *P. halstedii* Isolate wurden in den USA, Argentinien und den europäischen Ländern Frankreich, Deutschland und der Schweiz gefunden. Diese Proben wurden in den Jahren zwischen 1988 bis 2011 gesammelt und geben daher wenig Aufschluss über die Korrelation von temporalen und geographischen Zusammenhängen des Vorkommens von PhV. Obwohl die hier bearbeiteten Proben nicht bis 1940 zurückreichen, die Zeit des ersten Auftretens von *P. halstedii* in Europa (Sackston 1981), ist anzunehmen, dass PhV bereits in den frühen Falschen Mehltau Infektionen der Sonnenblume am Anfang des letzten Jahrhunderts (Viranyi und Spring, 2011) existierte. Ebenfalls wäre es von Interesse Isolate von *Eupatorium purpureum*, auf denen *P. halstedii* zuerst beschrieben wurde (Farlow, 1883) auf die Anwesenheit von PhV zu testen. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob PhV in

den Wirtssprung des Oomyceten von Wildarten auf die Kultursonnenblume beigetragen hat. Bisher konnte das Virus jedoch in keinen *P. halstedii* Isolaten von wilden Sonnenblumen nachgewiesen werden.

Die Sequenzanalyse, welche hier mit 22 PhV Sequenzen aus *P. halstedii* Isolaten aus 13 verschiedenen Ländern durchgeführt wurde, ist die erste Untersuchung der globalen Genomvariation eines Mykovirus. Aus diesem Grund sind Vergleiche mit anderen Mykoviren nicht möglich. Die hohe Konservierung des viralen Genoms, die bereits von Heller-Dohmen *et al.* (2011) beschrieben wurde, konnte durch eigene Ergebnisse bestätigt und ausgebaut werden. Verschiedene SNP Positionen (z.B. RdRp 1242 und 1972; CP 372) in den Sequenzen aus GenBank stimmten mit den hier gefundenen SNPs überein. Darüber hinaus wurden nun mehr Informationen über die gesamten kodierenden Bereiche und für Proben mit einer größeren Spanne an Herkünften sowie Alter erreicht. Unabhängig hiervon zeigte sich jedoch die genetische Diversität der beiden ORFs weiterhin sehr gering. So zeigten lediglich 0,003% der Nukleotide der RdRp und 0,008% des CPs einen Austausch bei der Betrachtung der gesamten Probenanzahl. Offensichtlich sind beide RNA Stränge hoch konserviert, was impliziert, dass andere Mutationen, neben den hier beschriebenen, negative Effekte auf die Funktionalität der RdRp und des CP bewirken können. Studien zur Variabilität von Pflanzenviren zeigten ebenfalls eine sehr geringe genetischen Diversität (0,01 – 0,14) bei verschiedenen Stämmen desselben Virus aus verschiedenen Regionen (García-Arenal *et al.*, 2001). Allerdings war selbst die geringe Nukleotid Diversität von 0,014 – 0,058, die für das Cucumber mosaic Virus beschrieben wurde (Nouri *et al.*, 2014), um eine Zehnerpotenz höher als jene von PhV. Die geringe Diversität von Pflanzenviren wird mit dem fehlenden Immunsystem der Wirte und dem daraus resultierenden Mangel an Selektionsdruck erklärt (García-Arenal *et al.*, 2001). Diese Erklärung kann durchaus auch für Mykoviren herangezogen werden. Zusätzlich hierzu scheint es möglich, dass die RdRp von PhV eine Proofreading Funktion besitzt, welche eine Konservierung der Sequenz fördert. Von viralen Proofreading RdRps wurde eine Fehlerrate von etwa 10^{-3} bis 10^{-4} berichtet (Barr und Fearn 2010). Dies könnte die Spanne der genetischen Diversität die für PhV beobachtet wurde erklären.

Die unerwartet geringe Variabilität von PhV zeigte sich ebenfalls in den UTRs, obwohl diese Bereiche nicht in Aminosäuren translatiert und somit Änderungen nicht im Phänotyp exprimiert werden und eine Fehlfunktion verursachen können. Insgesamt 10 von 298

Nukleotiden (0,025%) der RNA 2 war von Deletionen oder Basenaustauschen betroffen. Dies ist etwa dreimal höher als die Diversität des ORFs dieses RNA Strangs. Die Vermutung das Veränderungen dieser nichtkodierenden Bereiche negative Auswirkungen auf regulatorische Prozesse der viralen Reproduktion haben, konnte durch unsere Modellierungsexperimente nicht bestätigt werden, da diese keine signifikanten Unterschiede durch die SNPs in den Sekundärstrukturen aufzeigten.

III

Die Auswirkungen des Virus auf seinen Wirt *Plasmopara halstedii*, den Erreger des falschen Mehltaus der Sonnenblume.

Der Großteil der hier vorgestellten Versuche und Ergebnisse wurde unter dem Titel „*Plasmopara halstedii* virus causes hypovirulence in *Plasmopara halstedii*, the downy mildew pathogen of the sunflower“ (Grasse, Zipper, Totska und Spring, 2013) im Journal *Fungal Genetics and Biology* veröffentlicht.

Die Arbeiten zum Klon #1190 sind Teil der von mir mitbetreuten und experimentell angeleiteten Bachelor Arbeit „Auswirkungen des Ph-Virus auf die Infektion der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) durch den Oomyceten *Plasmopara halstedii*“ von Maria Totska (2012).

3.1 Einleitung

Während der letzten 50 Jahre wurden mehr als 80 verschiedene Mykoviren aus allen größeren taxonomischen Gruppen von Pilzen beschrieben (Pearson *et al.*, 2009). Die meisten Viren von filamentösen Pilzen scheinen keinen Einfluss auf den Phänotyp ihrer Wirte zu haben (Buck, 1986). Allerdings scheint dies eher die Konsequenz der geringen Forschung in diesem Bereich zu sein, als dem tatsächlich nachgewiesenen Fehlen von Effekten geschuldet zu sein. In den wenigen Fällen, in denen die Interaktion von Mykoviren und ihren Wirten bisher untersucht wurde, stand vor allem der Einfluss auf die Virulenz der Pilze im Fokus. Dies geschah in der Hoffnung, neue Hilfsmittel gegen Pilzbefall im kommerziellen Anbau von Pflanzen zu erhalten (Nuss, 2005). Bisher konnten hypovirulente Effekte bei einigen pflanzenpathogenen Pilzen der Ascomyceten und Basidiomyceten gezeigt werden, die Viren verschiedener Klassen beherbergen (Nuss, 2005; Yu *et al.*, 2010).

Für die Gruppe der Oomyceten sind bisher nur wenige Viren vollständig charakterisiert (Kapitel I, II; Yokoi *et al.*, 1999, 2003; Heller-Dohmen *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2009, 2012, 2013). Als Folge hiervon sind Studien zum Einfluss der Viren auf ihre Wirte selten. In

neueren Studien (Cai *et al.*, 2012) konnte kein Unterschied in der Wachstumsrate und der Sporangienproduktion zwischen einem virusfreien und einem genetisch identischen, mit dem dsRNA Virus PiRV-3 infizierten Schwesterstamm von *Phytophthora infestans* gefunden werden. Diese Experimente wurden auf künstlichen Medien durchgeführt, im Gegensatz dazu wurden bisher keine Studien zum viralen Einfluss auf die direkte Oomycet-Pflanze-Interaktion veröffentlicht. Die obligat biotrophe Natur der Wirte der Viren SmV-A und B (Yokoi *et al.*, 1999, 2003) sowie PhV (Heller-Dohmen *et al.*, 2011) stellt für Untersuchungen dieser Art eine weitere Hürde dar. Dies führt unter anderem dazu, dass im Gegensatz zu *P. infestans*, virusfreie Isolate nicht durch den Einsatz von Medikamenten im Kulturmedium generiert werden können. Folglich müssen virusfreie Isolate von *P. halstedii* gezielt auf infizierten Pflanzen gesucht werden.

Für die Untersuchungen des viralen Einflusses auf die Aggressivität und die Pathogenität des Oomyceten sind drei Voraussetzungen nötig. Wie aus Kapitel II dieser Arbeit und vorhergehenden Studien (Heller-Dohmen *et al.*, 2008) bekannt ist, enthalten die meisten Isolate von *P. halstedii* bereits PhV. Daher war eine gezielte Suche nach virusfreien Isolaten dieses Oomyceten eine wichtige Voraussetzung, um den Einfluss von PhV auf seinen Wirt zu untersuchen. Die zweite notwendige Bedingung für diese Experimente war die Erstellung von genetisch homogenen Stämmen dieser virusfreien *P. halstedii* Isolate durch Einzelzoosporeninfektionen (Spring *et al.*, 1998), damit mögliche Unterschiede ausschließlich der Präsenz bzw. dem Fehlen von PhV zugeordnet werden können. Die dritte Voraussetzung war die extrazelluläre Übertragung von PhV in bisher virusfreie Isolate, um so isogene Schwesterstämme zu erzeugen, welche sich lediglich in der An- bzw. Abwesenheit des Virus unterscheiden.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Verwendete *Plasmopara halstedii* Isolate

Die in diesen Versuchen verwendeten virusfreien *P. halstedii* Stämme wurden aus Isolaten von Sonnenblumenfeldern in den USA, Deutschland, der Schweiz und Tschechien generiert. Auf der Suche nach diesen Stämmen wurden über 50 Feldisolate unterschiedlichster Herkunft auf die Anwesenheit von PhV mit verschiedenen PhV spezifischen Primern untersucht (vergleiche Kapitel II 2.2.3). Die folgenden vier Isolate wurden für weitere Experimente in dieser Arbeit genutzt: #899 (USA, 2007), #1155 (D, 2011), #1190 (CH, 2011) und #1211 (CZ, 2011).

Tabelle 3.2.1: Der Ursprung und Pathotyp der isogenen *Plasmopara halstedii* Stämme ohne und mit (*) PhV.

Isolat	Ursprung	Datum	Pathotyp
#889K1	US, Michigan	2007	710
#889K1*			710
#1155K1	Deutschland, Gültstein	2011	750
#1155K1*			750
#1190K4	Schweiz, Amrisil	2011	730
#1190K4*			730
#1211K3	Tschechien, Podivin	2011	750
#1211K3*			750

3.2.2 Kultivierung von *Plasmopara halstedii*

Die obligat biotrophe Natur von *P. halstedii* führt zu einer aufwändigeren Kultivierung als bei vielen anderen Pathogenen. Da der Oomycet auf lebendes Wirtsgewebe angewiesen ist,

wurden während der gesamten Versuche Sonnenblumen unter kontrollierten Bedingungen herangezogen. Von diesen wurden teilweise nur die Blätter verwendet. In den meisten Fällen wurden jedoch bereits die Keimlinge der Pflanzen infiziert. Die hierfür benötigte Vorgehensweise wird in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.2.3 Induktion der Sporulation

Die Ausbildung von Sporangienträgern (Sporulation) konnte bei infiziertem Pflanzengewebe gezielt induziert werden. Hierzu wurden die Sonnenblumen oder einzelne Blätter 100% Luftfeuchtigkeit, 18 °C und Dunkelheit für 24 Stunden ausgesetzt. Um Kontaminationen mit anderen *P. halstedii* Kulturen zu vermeiden, wurden die befallenen Pflanzen in abgeschlossenen Kammern, bzw. die Blattstücke in Petrischalen mit feuchtem Filterpapier induziert.

3.2.4 Whole Seedling inoculation

Da es sich bei *P. halstedii* um einen obligat biotrophen Organismus handelt, ist die Kultur nur in Verbindung mit der lebenden Wirtspflanze möglich. Daraus resultierend wurde *P. halstedii* für die Zeit der Versuche in Dauerkultur gehalten. Da die Sporulation des Oomyceten durch Luftfeuchtigkeit, Temperatur, und Lichtverhältnisse gut gesteuert werden konnte, war eine Vermischung verschiedener Stämme in einer Klimakammer leicht zu verhindern. Zur Überimpfung der Dauerkulturen wurden Sonnenblumenkeimlinge des suszeptiblen Kultivars Giganteus auf feuchtem Filterpapier bei 30 °C für 2 Tage angekeimt. Nach dieser Zeit wurde die Schale der Keimlinge entfernt und diese in 10-30 ml Wasser überführt. Zusätzlich wurde ein Blattstück mit deutlicher Sporulation der Vorgängerkultur hinzu gegeben. Anstelle von frisch sporulierendem Material konnten Vermehrungen auch mit bei -70 °C gelagerten Sporangien erzielt werden. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden (18 °C, dunkel) wurden die Keimlinge in Erde ausgepflanzt. Die so infizierten Sonnenblumen waren im Durchschnitt nach 11–16 Tagen bereit für eine weitere Induktion und für die weitere Vermehrung.

3.2.5 Vermehrung auf Blattscheiben

Da die Kultur von *P. halstedii* mit ganzen Pflanzen viel Platz beanspruchte, war eine alternative Methode die Kultur des Pathogens auf Blattscheiben. Hierzu wurden etwa 1 cm² große Stücke der Keimblätter von *H. annuus* verwendet. Diese wurden nach dem Schneiden für etwa 1 Stunde in destilliertem Wasser gebadet. Anschließend wurden sie mit der Blattunterseite nach oben in mit 800 µl destilliertem Wasser gefüllte Kammern von Replikaschalen überführt. Anschließend wurden die Blattstücke mit 10–50 µl einer Sporangien Suspension benetzt und die ganzen Schalen für 12–16 Stunden im Dunkeln gehalten. Für die weitere Kultur wurden die Blattscheiben bei 23°C, 70% Luftfeuchtigkeit (Umgebung) und 16:8 Stunden Hell/Dunkel im Klimaschrank gehalten. Die Blattscheibenkulturen zeigten nach 8–14 Tagen Sporulation in Abhängigkeit der Heftigkeit der Infektion. Im Durchschnitt konnten *P. halstedii* Kulturen für 21 Tage auf Blattscheiben gehalten werden, bis eine erneute Überimpfung notwendig wurde.

3.2.6 Isolierung von Sporangien

Um möglichst reines Pathogen zu erhalten, wurde von einem Mitarbeiter des Instituts eine Oomyceten-Saugvorrichtung konstruiert (unveröffentlicht, Spring und Zipper). Diese basiert auf einer Schlauch-Filter Kombination die sich zum einen an einer Wasserstrahlpumpe anschließen lässt und auf 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße gesetzt werden kann. Durch diese Vorrichtung konnten die Sporangien in großer Zahl von sporulierenden Blättern abgesaugt werden. Dies war notwendig, um *P. halstedii* bei möglichst geringer Feuchtigkeit bei -70 °C einzufrieren um verschiedene Kulturen für spätere Verwendungen wieder anzuziehen.

3.2.7 Herstellung von *P. halstedii* Zoosporen Klonen

In den biologischen Testverfahren dieser Arbeit sollten potentielle Einflüsse von PhV auf seinen Wirt *P. halstedii* untersucht werden. Da aus vorhergehenden Arbeiten bekannt war, dass *P. halstedii* in der Natur immer eine Mischung verschiedener Genotypen ist, musste ausgeschlossen werden, dass Ergebnisse auf eine Heterogenität von *P. halstedii* zurückzuführen sind. Da selbst in einem einzelnen Sporangium verschiedene Genotypen des

Oomyceten vorhanden sein können, wurden Klone aus einzelnen Zoosporen, welche nur einen einzelnen Zellkern enthalten, hergestellt. Hierbei wurde nach der etablierten Methode von Spring *et al.* (1998) gearbeitet.

Hierzu wurden infizierte Sonnenblumenblätter zur Sporulation induziert (24h, dunkel, 100% Luftfeuchtigkeit, 18 °C) und einzelne Sporangienträger über einprozentigen Wasseragarplatten ausgeklopft. Die so vereinzelter Sporangien wurden zur Keimungsvorbereitung im Dunkeln für drei Stunden bei 18 °C inkubiert. Sobald die Freisetzung der Zoosporen einsetzte, wurde diese einzeln mittels einer Mikrokapillare auf etwa 1 cm² große, mit destilliertem Wasser gewaschene Scheiben von Sonnenblumenkeimblättern übertragen. Die Kultivierung erfolgte anschließend wie in Kapitel 2.3.3. Im Falle einer daraus resultierenden Infektion kann davon ausgegangen werden, dass dieser *P. halstedii* Stamm genetisch homogen ist.

3.2.8 Virus Extraktion aus *Plasmopara halstedii*

Für Infektionsversuche mit PhV war es notwendig, das Virus ohne seinen Wirt vorliegen zu haben. Hierzu wurde abgesaugte, mit PhV infizierte Sporangien von *P. halstedii* in 500 µl Wasser bei -20 °C eingefroren. Anschließend wurde diese Suspension angetaut und mit zwei Stahlkugeln in einer Schüttelmühle bei 70Hz für 5 Minuten geschüttelt. Danach wurde die Suspension wieder bei -20 °C eingefroren und der Vorgang wiederholt. Nachdem der größte Teil zellulären Materials auf diese Weise zerstört war, wurde die Suspension durch zwei aufeinander folgende Filtersysteme mit 30 µm und 7 µm Maschenbreite gereinigt. Dieser Schritt diente vor allem dazu, eventuell nicht zerstörte Sporangien abzutrennen. Das so erhaltene Filtrat wurde anschließend durch ein PCR-Testsystem überprüft (siehe 2.2.2 – 2.2.3). Zusätzlich wurde eine elektronenmikroskopische Kontrolle mit der *negative staining* Technik wie von Heller-Dohmen *et al.* (2008) durchgeführt um zu zeigen, dass unversehrte Viruspartikel jedoch keine *P. halstedii* Zellen vorhanden sind. Eine Konzentration von Viruspartikeln pro µl Suspension konnte jedoch nicht ermittelt werden.

Als weitere Kontrolle, um sicher zu gehen, dass wirklich Virus und nicht Sporangien zu Übertragungen führen, wurden Blattscheiben von *H. annuus* mit der Virus Lösung inokuliert und nach 14 Tagen auf Sporulation untersucht.

3.2.9 Infektion von *Plasmopara halstedii* mit PhV

Zur Infektion von nachweislich virusfreien *P. halstedii* Isolaten mit PhV wurden diese zunächst wie bei der *whole seedling* Methode (siehe 3.2.4) behandelt. Der einzige Unterschied hierbei war die zusätzliche Zugabe von 150 µl der Virus-Lösung zur Inokulation.

3.2.10 Kontrollen zur Virusübertragung

Die Kontrolle der Virusinfektion von *P. halstedii* durch dieses Verfahren erfolgte durch ein PCR-Testsystem. Hierbei wurde die RNA des uninfizierten sowie des neu infizierten Isolates extrahiert und entsprechend der beschriebenen Vorgehensweise (siehe 2.2.2 – 2.2.3) bearbeitet. Die PCR Ergebnisse wurden durch Mikrochip Kapillarelektrophorese (MultiNA, Shimadzu, Duisburg, Deutschland) analysiert. Dieser Test wurde bei der nächsten Generation nach einer weiteren Vermehrung des Oomyceten wiederholt. Zeigte sich hierbei jedes Mal ein positives Ergebnis für das neu infizierte Isolat, wurde davon ausgegangen, dass die Übertragung gelungen war.

3.2.11 Pathogenitätstest

Da keine bekannten molekularen Marker bekannt sind, erfolgte die Ermittlung des Pathotypen von *P. halstedii* durch einen Biotest mit verschiedenen resistenten Sonnenblumenlinien (Tourvieille *et al.*, 2000). Die Bestimmung des Pathotyps wurde analog zu früheren Arbeiten durchgeführt (Rozynek und Spring, 2000). Hierzu wurden je 10 Sonnenblumenkeimlinge mit 10000 Sporangien per Keimling für 3 Stunden im Dunkeln bei 18 °C inokuliert und anschließend in Erde ausgepflanzt. Die Anzucht Bedingungen waren 23 °C, 16:8 h Licht zu Dunkelheit und 70% relative Luftfeuchtigkeit. Die hierbei verwendeten Sonnenblumen Differentiallinien waren: HA304, RHA265, RHA274, PM13, PM17, 803-1, HAR4, QHP1 und HA335. Nach 14 Tagen wurde *P. halstedii* durch 100% Luftfeuchtigkeit und 24 Stunden Dunkelheit zu Sporulation induziert. Infizierte Pflanzen zeigten Sporulationen auf den Keim- und Primärblättern. Die infizierten Blätter wurden gezählt und der Pathotyp gemäß dem Vorschlag von Tourvieille *et al.* (2000) bestimmt.

3.2.12 Resistenztests gegenüber Metalaxyl

Um das Verhalten von *P. halstedii* gegenüber dem Fungizid Metalaxyl zu bestimmen, wurden zwei Parameter erfasst. Zum einen wurde die Sporulationsrate (Anzahl der erfolgreichen Sporulation auf 25 Keimblättern) von *P. halstedii* auf Blattscheiben von *H. annuus* Giganteus mit und ohne Metalaxyl (1 mg/ml) nach 14 Tagen bestimmt. Hierbei wurden die Blattscheiben jeweils mit 1000 Sporangien des entsprechenden isogenen Stamms mit und ohne PhV infiziert. Zusätzlich wurde die Keimungsrate in An- und Abwesenheit von Metalaxyl bestimmt. Hierzu wurde der Anteil gekeimter Sporangien nach 3h Inkubation mit dem Fungizid bestimmt.

3.2.13 Aggressivitätstests

Das Testsystem zur Bestimmung der Aggressivität einzelner *P. halstedii* Zoosporenklone basiert auf einem modifizierten Protokoll von Sakr *et al.* (2009). Hierbei wurden verschiedene Parameter bestimmt: die Dauer der Latenzperiode (die Zeit zwischen der Inokulation und einem Auftreten von Sporulation bei mindestens 70% der infizierten Pflanzen), die Intensität der Sporulation (die Anzahl der Sporangien pro cm² Blattoberfläche) und das Verhältnis von systemischen Infektionen zu Kotyledonen-limitierten Infektionen nach 14 Tagen.

Für die Inokulation mit den verschiedenen *P. halstedii* Klonen wurden jeweils 60 Sonnenblumenkeimlinge des Kultivars Giganteus auf feuchtem Filterpapier angekeimt. Nach 24 Stunden wurde die Samenhülle entfernt und die Keimlinge in destilliertem Wasser gewaschen. Die so vorbereiteten Keimlinge wurden in 60 ml Sporangiensuspension mit einer Konzentration von 10000 Sporangien pro Milliliter für 3 Stunden bei 18 °C im Dunkeln inokuliert. Nach der Inokulation wurden die Keimlinge in Zehnerreihen in Erde ausgepflanzt und für 14 Tage bei 23 °C, 16:8 Hell/Dunkel und 70% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Ab dem 7. Tag nach der Inokulation wurde bei den 10 Pflanzen aus der ersten Reihe je ein Keimblatt entfernt, mit der Blattunterseite nach oben in Petrischalen mit feuchtem Filterpapier gelegt und für 24 Stunden bei 18 °C im Dunkeln induziert. Die Anzahl der Keimblätter mit Sporulationen wurde ausgezählt, in jeweils ein Plastikgefäß mit 10 ml destilliertem Wasser überführt und für 5 Minuten bei 700 Bewegungen/Minute geschüttelt. Anschließend wurde die gesamte Anzahl an Sporangien für dieses Keimblatt mit einer Fuchs-Rosenthal

Zählkammer bestimmt. Durch die Messung der Blattgröße mit dem Programm Axiovision 4.8 konnte die Sporangiedichte pro Quadratcentimeter berechnet werden. An allen folgenden Tagen bis einschließlich dem 12. nach der Inokulation wurden weitere 10 Kotyledonen der nächsten Pflanzenreihe ebenso behandelt.

Am 14. Tag nach der Inokulation wurde die gesamte Pflanzschale zur Sporulation induziert und systemische und Kotyledon limitierte Infektionen ausgezählt.

Insgesamt wurde jeder Test dreimal mit den identischen Zoosporenklonen wiederholt.

3.2.14 Statistische Auswertung

Um den Einfluss von PhV auf *P. halstedii* zu definieren war eine statistische Auswertung der Daten notwendig. Hierzu wurden die Daten der einzelnen Versuche gemittelt und mittels Welch Test miteinander verglichen. Um diese Analysen durchzuführen wurde das Statistikprogramm R (www.R-project.org) benutzt.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Identifizierung von virusfreien Isolaten und Generierung isogener Stämme mit Virus

Wie aus dem Abschnitt „Die Verbreitung und genetische Diversität des *Plasmopara halstedii* Virus in weltweiten Populationen des falschen Mehltaus der Sonnenblume“ dieser Arbeit bekannt, wurden viele *Plasmopara halstedii* Isolate aus Europa und den USA gesammelt und auf die Anwesenheit von PhV untersucht. Hierbei wurden über 90% positiv auf Viren getestet (Vergleiche Kapitel II). Das erste virusfreie Isolat (#889) wurde 2007 auf einem Feld in Michigan, USA, gefunden und erfolgreich im Labor auf Sonnenblumenkeimlingen kultiviert. Bis 2011 wurden drei weitere Isolate aus Deutschland (#1155), der Schweiz (#1190) und der Tschechischen Republik (#1211) identifiziert und im Labor vermehrt.

Die genetisch homogenen Stämme wurden erfolgreich aus einzelnen Zoosporen herangezogen. Hierbei wurde nach den beschriebenen Protokollen zur Infektion von Sonnenblumen Blattscheiben durch Einzelzoosporen (Spring *et al.*, 1998) gearbeitet. Die Rate zur Erzeugung dieser homogenen Stämme liegt mit 0,5% sehr niedrig, ist jedoch die einzige Möglichkeit genetisch homogene Oomyceten zu generieren.

Die Übertragung von isolierten *Plasmopara halstedii* Viren wurde erfolgreich für Sporangien aus den Einzelzoosporeninfektionen durchgeführt. Hierdurch wurden zwei genetisch identische, nur durch PhV Ab- bzw. Anwesenheit unterschiedene *P. halstedii* Stämme erzeugt und auf Sonnenblumenkeimlingen vermehrt. Mehrfache PCR-basierte Tests zeigten, dass nach der Infektion mit PhV (Abb. 3.3.1) das Virus nicht mehr verloren ging, sondern eine dauerhafte virale Infektion vorlag.

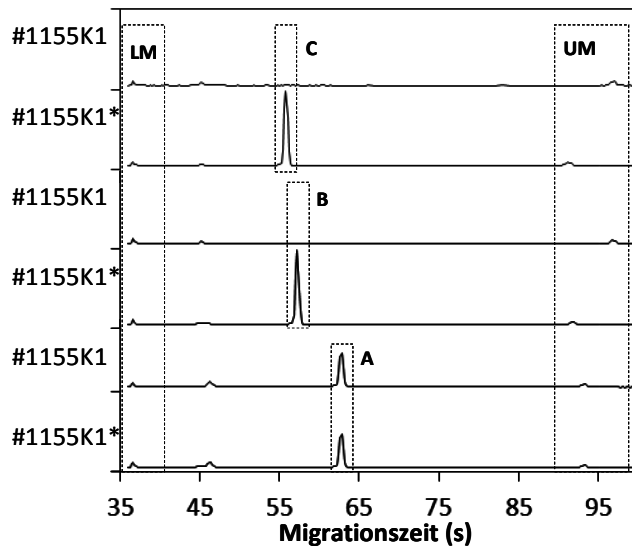


Abbildung 3.3.1: Elektrophorogramm von PCR Experimenten mit cDNA Proben von virusfreien und virushaltigen (*) isogenen Stämmen von *P. halstedii* (am Beispiel von #1155K1). Die Amplifizierung eines Ubiquitinfragments (A, 420bp) diente als Kontrolle für die RNA Extraktion und cDNA Synthese. Die Peaks B und C zeigen die Amplifikation von Fragmenten des Hüllprotein Genes (324bp) und des RdRp Genes (294bp). LM, lower marker; UM, upper marker.

3.3.2 Pathogenität und Aggressivität von virusfreien und virushaltigen Stämmen

Die Pathogenität der isogenen *P. halstedii* Stämme wurde durch Sonnenblumen Differentiallinien mit verschiedenen Resistenzgenen ermittelt (Tourvieille *et al.*, 2000). Für den Stamm #889K1 wurde der Pathotyp 710, für die #1190K4 der Pathotyp 730 und für #1155K1 sowie #1211K3 der Pathotyp 750 ermittelt. Für alle vier isogenen virushaltigen Schwesterstämme wurde der identische Pathotyp wie für die virusfreien Stämme bestimmt. Beachtenswert war jedoch eine geringere Infektionsrate von 70–80% im ersten Set des Systems (HA304, RHA265, RHA274) im Falle der virushaltigen, im direkten Vergleich mit den virusfreien Stämmen, welche in diesem Set regelmäßig 90-100% der Pflanzen infizierten.

Vergleichbare Effekte einer verringerten Infektiosität der virushaltigen Stämme konnten auch bei den Aggressivitätstests beobachtet werden. Hierbei wurde das Auftreten der ersten Sporulation nach der Inokulation (Latenzperiode; nach Sakr *et al.* (2009) als definierte Zeit nach der Inokulation (p.i.) wenn 70% Sporulation erreicht werden) auf dem suszeptiblen Kultivar Giganteus untersucht (Abb. 3.3.2). Es zeigte sich, dass bei virusfreien Stämmen die Latenzzeit meist zwischen den Tagen 8 und 9 (bei #889K1 Tag 10 p.i.) auftrat, wogegen die

virushaltigen Stämme durchschnittlich einen Tag länger benötigten (Tab. 3.3.1). Gleichzeitig wurde beobachtet, dass die Gesamtzahl an Infektionen leicht reduziert war (Abb. 3.3.3) und die Rate an systemischen Infektionen von 51,5% in Abwesenheit des Virus auf 36,5% bei PhV Anwesenheit fiel (Tab. 3.3.1). Die Intensität der Sporulation (Anzahl an Sporangien pro cm² Kotyledon Oberfläche) zeigte bei allen Stämmen einen Anstieg zwischen den Tagen 8 und 11 p.i. und einen leichten Abfall an den beiden letzten Tagen des Experiments, was vermutlich durch den Alterungsprozess der Keimblätter herbeigeführt wurde (Abb. 3.3.2). Die Dichte an Sporangien pro Quadratzentimeter Keimblattoberfläche war für alle viral infizierten isogenen Stämme leicht reduziert (Abb. 3.3.4). Diese Reduktion variierte zwischen 5% bei #1155K1 und 50% bei #899K1. Im errechneten Durchschnitt zeigte sich eine Reduktion der Sporangien-dichte von etwa 30% in Anwesenheit von PhV.

Tabelle 3.3.1: Der Einfluss von PhV auf die Aggressivität isogener Schwesterstämmen mit (*) und ohne das Virus. Datenpaare, die mit verschiedenen Buchstaben markiert sind, zeigen signifikante Unterschiede mit der Wahrscheinlichkeit $P < 0.05$. Die Prozentangabe in der letzten Spalte zeigt den Anteil im Vergleich zum virusfreien Stamm.

Stamm	Aggressivitätskriterien			
	Latenzzeit in Tagen	Prozentueller Anteil systemischer Infektionen nach 14 Tagen	Durchschnittliche Sporangien-dichte (Sporangien pro cm ² Kotyledon)	
#889K1	9.8 ± 0.5^A	48.7^A	11.2 ± 3.25	
#889K1*	10.8 ± 0.3^B	27.8^B	5.5 ± 4.66	50 %
#1190K4	9	65.0^A	3.5	
#1190K4*	8.7	51.0^B	2.0	57 %
#1155K1	8.6 ± 0.1^A	50.7^A	4.2 ± 1.05	
#1155K1*	10 ± 0.7^B	32.7^B	4.0 ± 0.49	95 %
#1211K3	8.7 ± 0.3^A	42.6^A	4.4 ± 1.54	
#1211K3*	9.7 ± 0.7^B	34.4^B	3.4 ± 0.96	77 %

Die Untersuchungen zum Einfluss von PhV auf die Toleranz gegenüber dem Fungizid

Metalaxyl bestätigten die Ergebnisse aus den Aggressivitätstests, was die verminderte Sporulationsrate der virushaltigen Stämme angeht. Allerdings konnten nur sehr geringe Unterschiede bei den Keimungsraten der Sporangien bei den isogenen Stämmen beobachtet werden. Ein Einfluss auf die Reaktion gegenüber Metalaxyl wurde nicht nachgewiesen. So haben die Stämme #899K1, #1155K1 und #1211K3 keine Möglichkeit bei Metalaxyl Anwesenheit zu wachsen. Der Stamm #1190K4 weist dagegen eine Toleranz gegenüber dem Fungizid auf. Bei allen diesen Experimenten zeigte die An- oder Abwesenheit von PhV keinen Einfluss auf das Ergebnis (Tab. 3.3.2).

Tabelle 3.3.2: Der Einfluss von PhV auf die Keimungsraten und Sporulationsraten isogener Schwesterstämme mit (*) und ohne das Virus. Die Raten wurden jeweils mit und ohne die Metalaxyl (1 mg/ml) bestimmt.

Stamm	Keimungsrate		Sporulationsrate	
	Kontrolle	Metalaxyl	Kontrolle	Metalaxyl
#889K1	96%	96%	88%	0%
#899K1*	88%	91%	68%	0%
#1155K1	90%	95%	48%	4%
#1155K1*	90%	91%	44%	0%
#1190K4	98%	98%	84%	40%
#1190K4*	98%	91%	60%	44%
#1211K3	94%	91%	28%	0%
#1211K3*	88%	69%	20%	0%

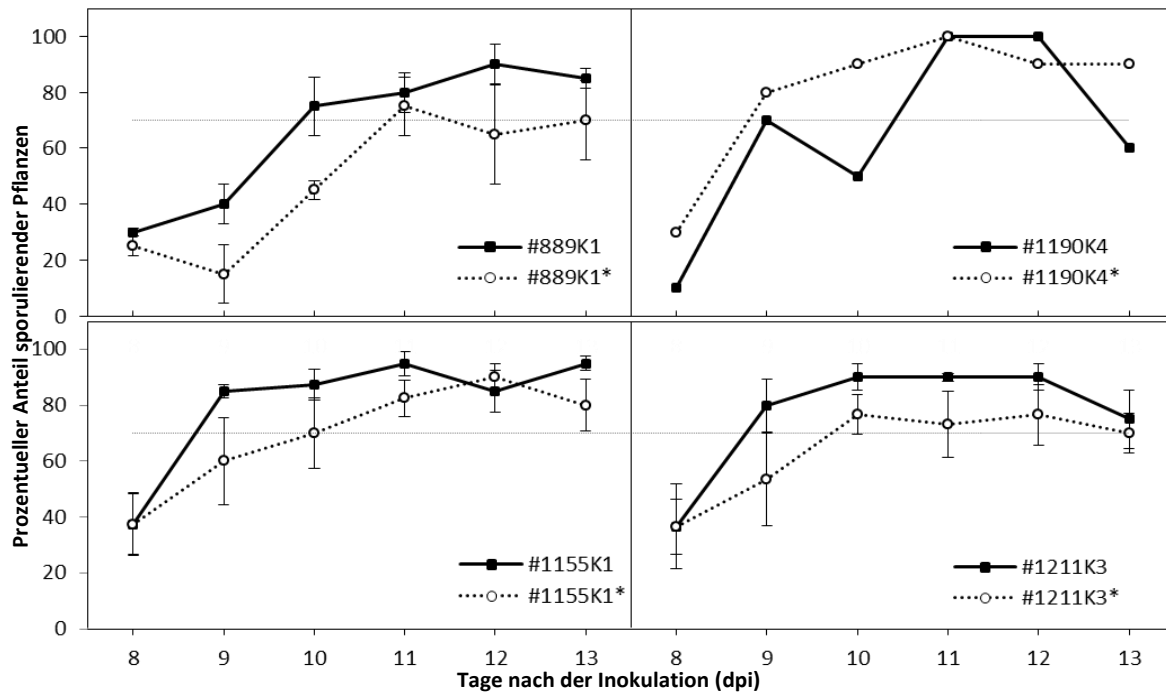


Abbildung 3.3.2: Die Latenzzeit der Infektion der Sonnenblumenkeimlinge die mit mit isogenen Stämmen von *Plasmopara halstedii* mit (*; gestrichelte Linie) und ohne (durchgezogene Linie) PhV inokuliert wurden. Die Daten zeigen den Durchschnitt (n = 3) in Prozent an infizierten Kotyledonen (n = 10 pro Durchlauf und Tag des Experiments) die am entsprechenden Tag p.i. von der Pflanze entfernt und für 24h in einer Feuchtkammer zur Sporulation induziert wurden. Die horizontale Linie markiert die 70% Grenze für die Infektionen.

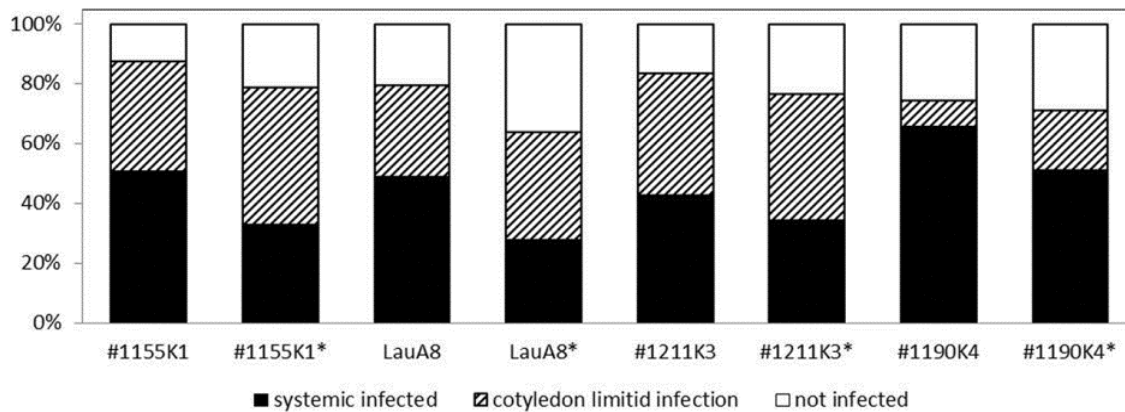


Abbildung 3.3.3: Der prozentuale Anteil an infizierten (systemische Infektionen = schwarz; Kotyledonen limitierte Infektionen = gestreift) und gesunden (weiß) Sonnenblumenkeimlingen nach 14 Tagen p.i. mit virusfreien und virushaltigen (*) isogenen Stämmen von *Plasmopara halstedii*. Die Daten für #889K1, #1155K1 und #1211K3 zeigen den Durchschnitt von je drei Experimenten mit je 60 Pflanzen pro Stamm und Experiment. Der Stamm #1190K4 wurde einmal getestet.

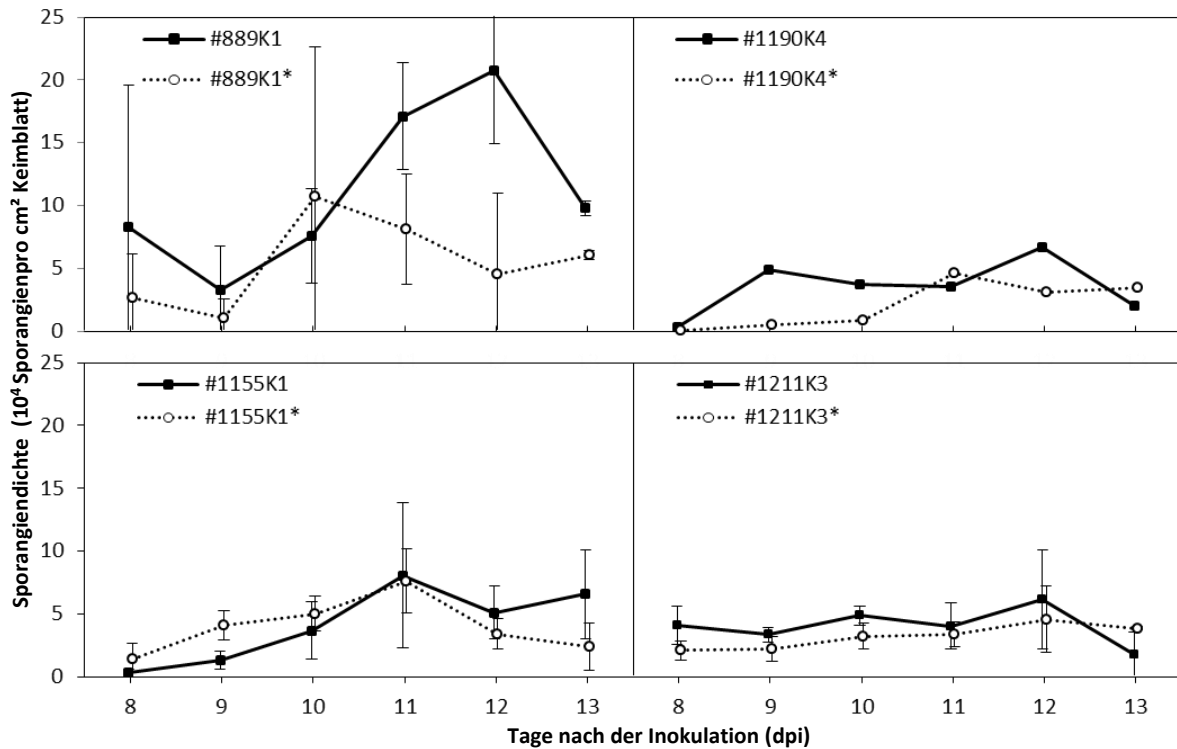


Abbildung 3.3.4: Die Sporangiedichte (Sporangien pro cm^2 Oberfläche) auf mit *Plasmopara halstedii* infizierten Keimblättern von Sonnenblumenkeimlingen an verschiedenen Tagen nach der Inokulation (p.i.). Die Daten für #889K1, #1155K1 und #1211K3 zeigen den Durchschnitt von je drei Experimenten mit je 10 Pflanzen pro Tag und Stamm für jeden Test. Der Stamm #1190K4 wurde einmal getestet. Die durchgezogenen Linien markieren die virusfreien, die gestrichelten (*) die virushaltigen Stämme.

3.4 Diskussion

Der Einfluss von Mykoviren auf ihre Wirte und deren phänotypisches Verhalten rückt immer mehr in den Fokus der Forschung. Dies betrifft vor allem die Interaktion von Mykoviren, die Pflanzenpathogene befallen, da dies in einer Abschwächung der Infektiösität und somit zu einer praktischen Anwendung führen kann (Nuss, 2005). Während es einige Hinweise für hypovirulente Reaktionen in der Anwesenheit von Viren in echten Pilzen gibt (Referenzen in Nuss, 2005), sind bisher keine experimentell überprüften Daten für Oomyceten verfügbar. Bei dieser Organsimengruppe sind lediglich drei Taxa bekannt, in denen die vorkommenden Viren vollständig charakterisiert sind. Die dsRNA Narnaviridae Viren aus *P. infestans* wurde erst vor kurzem beschrieben (Cai *et al.*, 2013) und zeigten, dass es möglich ist, *in vitro* Kulturen dieser Oomyceten durch Ribavirin Behandlungen von diesen Viren zu befreien. Diese virusfreien Stämme von *P. infestans* zeigten keine Veränderung in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit oder ihrer Sporangienproduktion auf Agarplatten. Allerdings zeigten sich kleine morphologische Unterschiede in den Kolonien der Oomyceten. Ein Einfluss auf die Pathogenität von *P. infestans* wurde bisher nicht überprüft. Tooley *et al.* (1998) zeigten jedoch ein im Durchschnitt virulenteres Verhalten mexikanischer Isolate von *P. infestans*, welche dsRNA enthielten gegenüber Isolaten, die keine dsRNA aufwiesen. Dies kann als ein frühes Beispiel für hypervirulente Effekte dienen, jedoch wurde nicht geklärt von welchem Virus diese dsRNA stammt. Ebenfalls wurden die Experimente zur Pathogenität auf Kartoffel Differentiallinien nicht mit isogenen Stämmen durchgeführt, weshalb Unterschiede nicht unbedingt dem Einfluss der dsRNA geschuldet sind, sondern auch auf genotypischer Variationen der verwendeten Pathogene beruhen könnten.

PhV, welches erst neulich molekulargenetisch charakterisiert wurde (Heller-Dohmen *et al.*, 2011), ist ein ssRNA Virus, das den Erreger des Falschen Mehltaus der Sonnenblume, *Plasmopara halstedii*, infiziert. Dieses Virus besteht aus einer RdRp mit Ähnlichkeiten zu Nodaviren und einem Hüllprotein mit Übereinstimmungen zu Tombusviren (Heller-Dohmen *et al.*, 2011; Kapitel I). Da vorhergehende Studien eine nahezu globale Verbreitung von PhV zeigten (Heller-Dohmen *et al.*, 2008; Grasse und Spring, 2015; Kapitel II) und der Wirt des

Virus nicht auf künstlichem Medium kultiviert werden kann, war die erste Herausforderung für die Erforschung der viralen Effekte das Auffinden virusfreier *P. halstedii* Isolate. Vier Isolate, die als virusfrei identifiziert wurden, gehörten Pathotypen an, welche ebenfalls unter den virushaltigen Oomyceten gefunden wurden. Dies deutete bereits an, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen den verschiedenen Pathotypen und einem Einfluss von PhV gibt.

Das Herstellen von isogenen Schwesterstämmen von *P. halstedii* mit und ohne das Virus erfolgte durch die einfache Zugabe von PhV zur Sporangien Suspension während der Keimlingsinokulation. Offensichtlich reichte der physische Kontakt bereits, um eine erfolgreiche Virusaufnahme zu gewährleisten. Das Virus konnte bereits in der nächsten Sporangien generation nachgewiesen werden und ging auch in keiner der folgenden Generationen während einer dauerhaften Kultivierung verloren. Es wird vermutet, dass die Aufnahme von PhV im Stadium der Zoosporen, welche aus den Sporangien freigesetzt werden, geschieht. Während dieses, einige Stunden andauernden, Stadiums gibt es bis zur Enzystierung und Keimschlauchbildung (Nishimura, 1922) keine Zellwände und die Aufnahme des Virus muss lediglich die Membranen des Oomyceten passieren. Nachträgliche Schritte zur Verbreitung von PhV in den Wirtszellen des Mycels sind bisher nicht weiter untersucht worden. Diese Aspekte benötigen weitere Forschung und sollten andere Falsche Mehltau Pathogene einbeziehen, um unter anderem auch das Wirtsspektrum von PhV zu identifizieren.

Die Experimente mit Differentiallinien der Sonnenblume zeigten, dass die An- und Abwesenheit von PhV keinen unmittelbaren Einfluss auf den Pathotyp der vier isogenen Schwesterstämme hat. Jedoch zeigte sich, dass die Rate an systemischen Infektionen bei einigen Differentiallinien reduziert war, wenn das Pathogen PhV enthielt, und sich so ein hypovirulenter Effekt andeutete. Daher erscheint es möglich, dass die Anwesenheit des Virus die Infektion mit *P. halstedii*, bei sehr kleinen Inokulationsdichten, von teilweise resistenten Sonnenblumen verhindern kann. Die Experimente mit dem generell anfälligen Sonnenblumenkultivar Giganteus bestätigten die beobachtete reduzierte Aggressivität, selbst bei sehr hohem Infektionsdruck. Zum einen war nicht nur die allgemeine Infektionsrate um etwa 10% verringert, sondern es gingen auch die systemischen Infektionen um etwa 25% zurück. Dies zeigte, dass mehr Pflanzen das Pathogen im Hypokotyl erfolgreich kontrollieren und somit am Übergang in das Epikotyl hindern konnten (Heller *et al.*, 1997), wenn

PhV den Oomyceten befallen hatte. Die verlängerte Latenzzeit für die virushaltigen Stämme von *P. halstedii* bis zum Auftreten der ersten Sporulationen unterstützte den Eindruck, dass die Entwicklung des Mycels gebremst wird und somit der Pflanze mehr Zeit für Abwehrmaßnahmen zur Verfügung steht. Die isogenen Stämme von *P. halstedii*, die für diese Arbeit generiert wurden, stellen passende Werkzeuge für die Untersuchung molekularbiologischen Mechanismen der PhV induzierten Hypovirulenz dar.

IV

Versuche zur Transformation von *Plasmopara halstedii*

Einige Arbeiten zu den nachfolgenden Transformationsversuchen mit dem modifizierten pGFPV Vektor wurden unter meiner Anleitung im Rahmen der Bachelor Arbeit „Konstruktion von Expressionsplasmiden für das *Plasmopara halstedii* Virus und Transformationsversuche“ von Stefanie König (2013) durchgeführt.

4.1 Einleitung

Bei obligat biotrophen Organismen stellt sich bisher die Transformation auf klassischem Weg als extrem schwierig dar. So konnten bisher nur zweimal erfolgreiche Transformationen bei echten Pilzen gezeigt werden (Chaure *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 2010). Beide Ansätze beruhen jedoch auf Einzigartigkeiten in der Wirt-Parasit Beziehung und sind nicht ohne weiteres auf andere Arbeiten zu transferieren. Bei biotrophen Oomyceten ist eine stabile Transformation bislang noch nicht gelungen.

Der Erreger des Falschen Mehltaus der Sonnenblume, *Plasmopara halstedii*, gehört zu den wirtschaftlich wichtigsten Pathogenen der Sonnenblume. Dieser Oomycet konnte bisher transient transformiert werden (Hammer *et al.*, 2007). Auch vom Wein Pathogen *Plasmopara viticola* sind transiente Transformationen bekannt (Dubresson *et al.*, 2008). Allerdings enthält *P. halstedii* auch das *Plasmopara halstedii* Virus (PhV). Da die künstliche Übertragung von PhV auf virusfreie Wirtsstämme bereits im Labor erfolgreich durchgeführt wurde (Grasse *et al.*, 2013), bot sich die Möglichkeit, diesen Weg für Transformationsexperimente zu nutzen. Der Vorteil an einer Transformation mit viralen RNA Sequenzen ergibt sich aus der theoretischen Unabhängigkeit von den Vektoren. So sollen sich, nach der ersten Transkription von den Plasmiden, die RNA Stränge über die viruseigene Polymerase weitervermehren.

Ziel des geplanten Projektes war die Vektor vermittelte Expression von PhV in *P. halstedii*. Die Voraussetzungen hierfür waren mit der Verfügbarkeit der kompletten cDNA des Virus sowie der Existenz virusfreier Wirtsstämme bereits etabliert. Für die Transformation von

P. halstedii sollten zunächst die gesamten viralen Sequenzen in Vektoren kloniert werden. Hierfür boten sich zum einen bekannte Plasmide zur transienten Expression in Oomyceten sowie Standard pUC Vektoren mit einem T7 Promotor an (Ah-Fong und Judelson, 2011; Viry *et al.*, 1993).

Die stabile Expression von Viren wurde in Pflanzen schon mehrfach erfolgreich durchgeführt. Ein Beispiel hierfür sind Arbeiten an Wein mit der Expression des *grapevine fanleaf nepovirus* (Viry *et al.*, 1993). Hierbei wurden cDNA Kopien der Viren in Expressionsvektoren kloniert und durch Elektroporation in Pflanzenprotoplasten eingebracht. Bei der hier angeführten Arbeit handelte es sich ebenfalls um ein ssRNA Virus wie PhV. Analog zu den Experimenten am Wein sollen in dieser Arbeit nun die beiden Gene von PhV, mit ihren UTRs, in die entsprechenden Plasmide eingebaut werden.

In der zweiten Etappe sollten die konstruierten Vektoren in *P. halstedii* eingebracht werden. Hierbei wurden die bekannten Techniken der Elektroporation, Inokulation sowie die Mechanoperforationstechnik „Löchern“ eingesetzt. Die transformierten Oomyceten sollten anschließend auf DNA und RNA Ebene auf die Vektoraufnahme und die Transkription überprüft werden. Zusätzlich wurde über mehrere Generationen von *P. halstedii* getestet, ob die virale RNA mit den Markergenen stabil exprimiert wird.

Das Projekt sollte erste Ergebnisse zur Transformation von *P. halstedii* mit Virus Kopien erzielen. Dabei war zu prüfen, wie lange die Vektoren in *P. halstedii* erhalten bleiben und ob sie zur Generierung kompletter Viren führen.

4.2 Material und Methoden

Die folgenden Versuche wurden mit dem virusfreien *P. halstedii* Klon #1211K6 durchgeführt. Die Anzucht und Vermehrung dieses Oomyceten erfolgte nach den bereits beschriebenen Standardbedingungen (2.2.3 ff). In den Versuchen verwendete Viruspartikel wurden gemäß 2.2.2 extrahiert. Bei allen Versuchen wurde das Sonnenblumen Kultivar *H. annuus* cv Giganteus verwendet.

4.2.1 Übersicht der Vektorherstellung

Für die Transformationsversuche mit PhV und *P. halstedii* wurden die Vektoren pUC18 (ThermoFisher Scientific, USA) sowie pGFPH (Ah-Fong und Judelson, 2011) verwendet. Beide verwendeten Vektoren beinhalten eine OriV Region zur Replikation in *Escherichia coli* sowie eine β -Lactamase, um transformierte Zellen durch Ampicillin selektionieren zu können. Um diese Plasmide für die folgenden Experimente verwenden zu können, wurden sie nach dem in Abbildung 4.2.1 dargestellten Schema modifiziert. Hierbei wurden pro Vektor jeweils zwei verschiedene Plasmide hergestellt, von denen eines die RNA abhängige RNA Polymerase (RdRp) und das andere das Hüllprotein (CP) enthält. Bei den Arbeiten mit dem pGFPH Vektor sollten diese Gene eine vorhandene GFP Sequenz ersetzen, welche dafür aus dem Plasmid entfernt wurde. Beim Einbau in die Vektoren wurde darauf geachtet, dass jeweils das gesamte RNA Segment inklusive der untranslatierten Bereiche eingebaut wurde, da sich im Folgenden daraus wieder vollständige Viren entwickeln sollten. Im ersten Schritt wurde aus extrahierter RNA von PhV mittels genspezifischen Adapterprimern spezifische cDNA synthetisiert. Diese cDNA wurde mit einem weiteren Adapterprimern in einer PCR vervielfältigt. Die erhaltenen PCR-Produkte verfügten nun am 3' und am 5' Ende über passende Restriktionsschnittstellen, die durch die entsprechenden Enzyme geschnitten wurden. Nach der Aufreinigung der Restriktionsansätze wurden die viralen Elemente in die entsprechenden Plasmide durch Ligation eingebaut. Die einzelnen Methoden sind in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben.

Die aus dem pGFPH Vektor hervorgegangenen Plasmide waren pRdRpH (Abb. 4.2.2) mit der Sequenz der Polymerase und pCPH mit der Sequenz des Hüllproteins. Die auf dem

pUC18 basierenden Plasmide waren pT7RDRPpA (Abb. 4.2.3) und pT7CPpA. Die abschließende Überprüfung des Einbaus in die Vektoren erfolgte durch Sequenzierungen der Plasmide. Die Sequenzen der pUC18 basierten Plasmide befinden sich im Anhang der Arbeit.

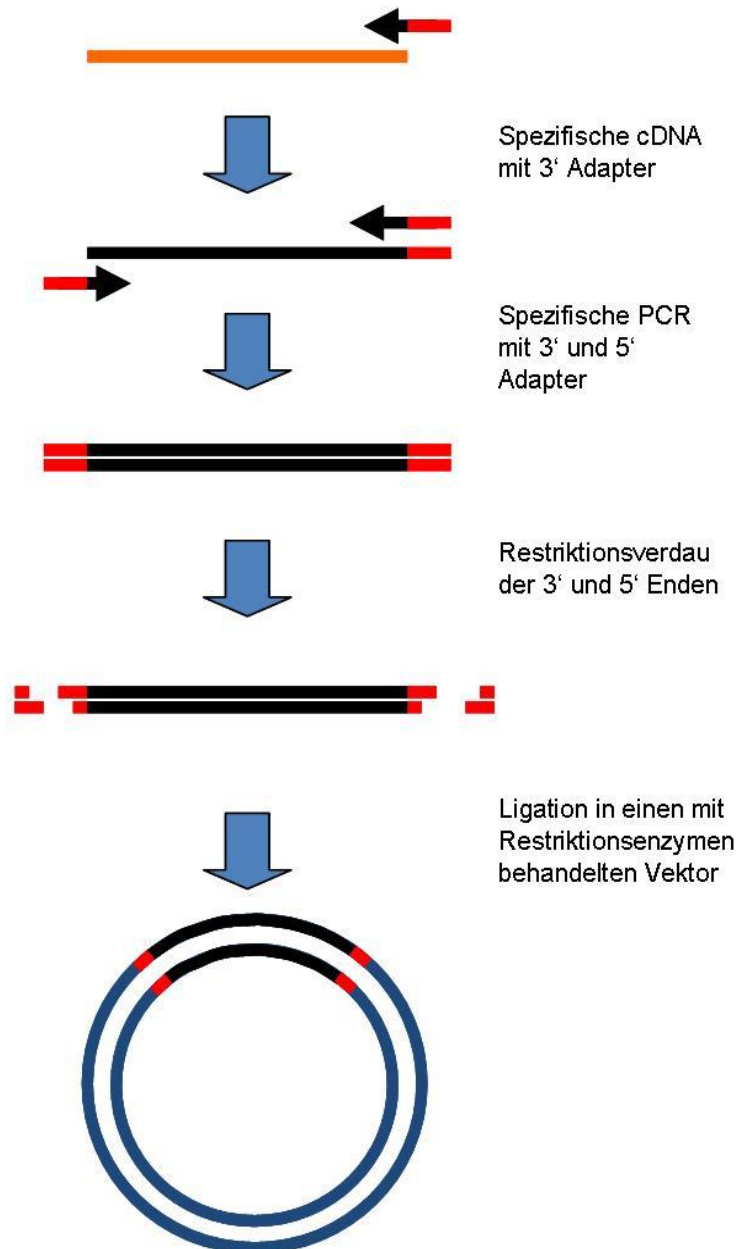


Abbildung 4.2.1: Schematische Übersicht der Herstellung der Transformationsplasmide. Hierbei wird RNA (orange) mit spezifischen Adapterprimern (rot-schwarzer Pfeil) in spezifische cDNA (schwarz) umgeschrieben. Die PCR mit spezifischen Primern führt zu doppelsträngiger DNA (schwarz) mit flankierenden Adaptersequenzen, in die Schnittstellen integriert sind (rot). Nach dem Verdau kann das Fragment in den Vektor (blau) ligiert werden.

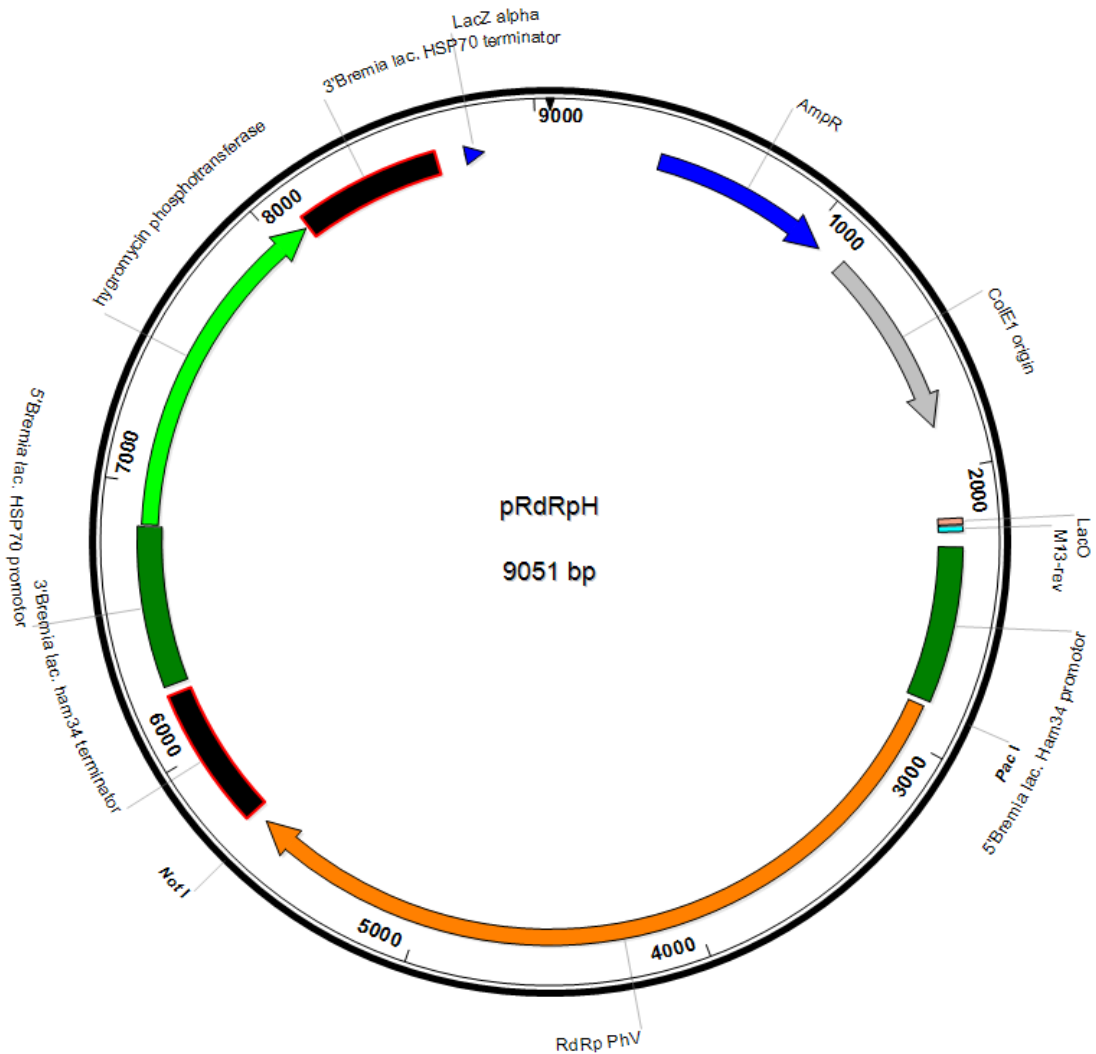


Abbildung 4.2.2: Vektorkarte von pRdRpH. Das Grundgerüst bildet das pGFPH Plasmid (Ah-Fong und Judelson, 2011). Dieses Plasmid beinhaltet die Sequenz der RdRp von PhV inklusive deren UTRs. Flankiert wird die RdRp von Ham34 Promotor und einem Ham34 Terminator die aus *Bremia lactutae* stammen. Zusätzlich sind ein Ampicillin- und ein Hygromycinresistenzgen vorhanden.

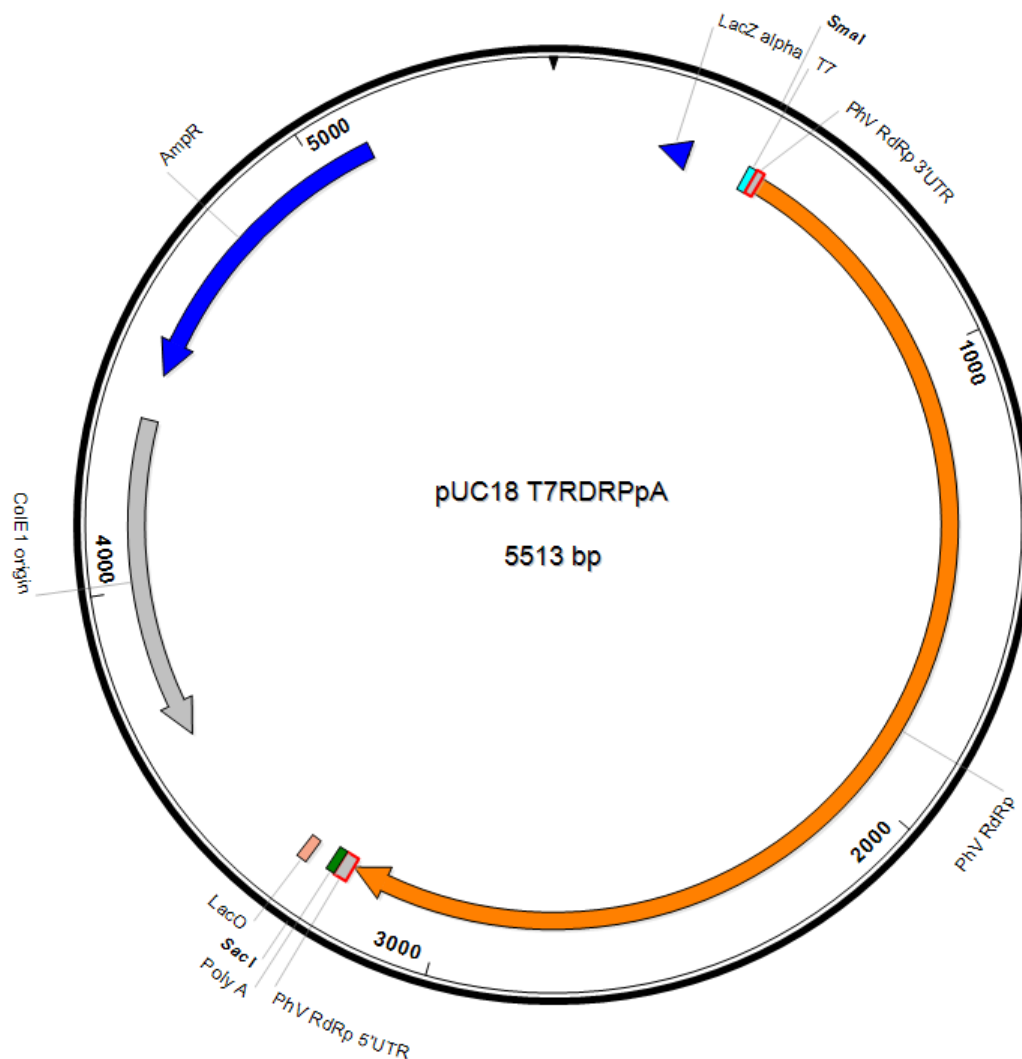


Abbildung 4.2.3: Vektorkarte von pT7RDRPpA. Das Grundgerüst bildet das kommerzielle pUC18 Plasmid. Dieses Plasmid beinhaltet die Sequenz der RdRp von PhV inklusive deren UTRs. Flankiert wird die RdRp von einem T7 Promotor und eine 20 Adenin Sequenz die als Terminator dient. Zusätzlich ist ein Ampicillinresistenzgen vorhanden.

4.2.2 RNA Extraktion und spezifische cDNA Synthese

Die RNA Extraktion für die weiteren Versuche erfolgt gemäß der Beschreibung in Kapitel 2.2.2 aus virushaltigen *P. halstedii* Isolaten. Die anschließende cDNA Synthese wurde für RdRp und CP gesondert mit jeweils spezifischen Primern durchgeführt (Tab. 4.3.1). Diese Primer (Tab. 4.2.3) sind bereits mit den Adaptern für die weiteren PCRs. Durch diese Adapter wird damit sichergestellt, dass nur die RNA der RdRp bzw. des CP von PhV in cDNA umgeschrieben wird und somit die Adapterstellen keine anderen Fragmente der Sonnenblume

oder des Oomyceten belegen können.

Tabelle 4.2.1: Protokoll der Synthese spezifischer cDNA

RNA Template		11,5 µl
Genspezifischer Rückwärtsprimer ₁	[100 µM]	1 µl
60 °C	5 min	
4 °C	10 min	
Reaktionspuffer	5x	4 µl
dNTP	[10 mM]	2 µl
RevertAid™	[200 U]	1 µl
RiboLock™	[20 U]	0,5 µl
42 °C	60 min	
72 °C	10 min	

1: Entsprechende Rückwärtsprimer sind in Tab. 4.2.3 aufgeführt.

4.2.3 Adapter PCR

Für den Einbau der viralen Sequenzen in entsprechende Vektoren wurde doppelsträngige DNA mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen benötigt. Aus diesem Grund wurden spezifische PCRs mit den entsprechenden Adapterprimern durchgeführt. Dies diente zusätzlich der Vervielfältigung der DNA, um genügend Material für die Ligation zur Verfügung zu haben. Auch war dieser Schritt notwendig, um später den Restriktionsverdau durchzuführen, da nur doppelsträngige DNA von diesen Enzymen geschnitten werden kann.

Für den Einbau der RdRp in den pGFPH Vektor wurden die Primer PHV_pol_Pac_F1 und PHV_pol_NotI_R2 verwendet. Für den Einbau des CP in pGFPH wurden das Primerpaar PHV_cP_PacI_F1 und PHV_cP_NotI_R1 verwendet. Durch diese Primer wurden die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme PacI und NotI an die RdRp bzw. das CP angehängt. Beim Einbau der viralen Sequenzen in den pUC18 Vektor wurden die Adapterprimer

zusätzlich erweitert. So wurde die T7 Promotorsequenz den Vorwärtsprimern und eine oligo-T20 Sequenz den Rückwärtsprimern hinzugefügt. Dies war notwendig, da dieser verwendete Vektore keine Promotor- und Terminatorsequenzen beinhaltet. Für die PCR der RdRp wurden daher die Primer PhV_RdRp_SmaI_T7_F2 und PhV_RdRp_SacI_R2_T20 verwendet. Hierdurch wurden der Sequenz die Schnittstellen für die Enzyme SmaI und SacI hinzugefügt. Für den Einbau des CP in pUC18 wurde die PCR mit den Primern PhV_cp_Hind3_T7_F1 und PhV_cp_KpnI_R1_T20 genutzt. Dies führte zu dem Einbau der Schnittstellen für die Enzyme Hind3 und KpnI. Das Protokoll der PCR ist in Tabelle 4.2.2 dargestellt, alle Primer sind in der Tabelle 4.2.3 aufgeführt.

Tabelle 4.2.2: Protokoll der Adapter PCR für die Vektorkonstruktion.

cDNA Template		0,5 µl
PCR Puffer	5x	2 µl
Forward Primer	[25 µM]	0,2 µl
Reverse Primer	[25 µM]	0,2 µl
Phusion	[2 U]	0,1 µl
H ₂ O		7,5 µl
cDNA Template		0,5 µl

98 °C	3 min	
98 °C	30 s	5 x
39 °C	30 s	
72 °C	150 s	
98 °C	30 s	30 x
50 - 60 °C	30 s	
72 °C	150 s	
72 °C	5 min	

Tabelle 4.2.3: Eingesetzte Adapterprimer mit Restriktionsschnittstellen und PolyT sowie T7 Anhängen.

PHV_pol_NotI_R2 ^{A C}	AGGAGCGGCCGCTTGGATACTTAGGACATTGGCT
PHV_pol_PacI_F1 ^A	ACGTTTAATTAAATATCACGCAGAGTACACTATGTCATT
PHV_cP_PacI_F1 ^A	ACGTTTAATTAAAGGTTTAAACCAACATGGCTGTT
PHV_cP_NotI_R1 ^{A C}	ACGTGCGGCCGCTCGCCTATGCGGGTCTC
PhV_RdRp_SmaI_T7_F2 ^B	AGTCCCCGGGTAATACGACTCACTATAGTATCACGCAGAGTACACTATGTCATTGG
PhV_RdRp_SacI_R2_T20 ^{B C}	AGTCGAGCTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGATACTTAGGACATTGGCTA
PhV_cp_T7_Hind3_F1 ^B	AGCTAAGCTTAAATACGACTCACTATAGGGTTTAAACCAACATGGCTGT
PhV_cP_KpnI_R1_T20 ^{B C}	AGTCGGTACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGCCTATGCGGGTCTCCCC

Für Klonierungen in pGFPH(A) und pUC18 (B).

C: Primer wurden für spezifische cDNA verwendet.

Schwarz: PhV Sequenz; Rot: Restriktionsschnittstelle; Braun: Überhang; Grün: T7 Promotor; Blau: PolyT-Anhang

4.2.4 Restriktionsverdau und Ligation

Für den Einbau der viralen Sequenzen in die Vektoren sind die Restriktionsschnittstellen entscheidend. Hierzu werden sowohl die Vektoren als auch die PCR Fragmente mit jeweils zwei Restriktionsenzymen geschnitten. Der Einsatz zweier verschiedener Enzyme garantiert die richtige Orientierung des Fragments im Vektor und verhindert gleichzeitig das entstehen von Vektoren ohne Insert. Die verwendeten Enzyme wurden bei den Verdauungsreaktionen so gewählt, dass beide in einem Reaktionsansatz mit dem FastDigest™ Puffer (Life technologies) verwendet werden können. Bei der Auswahl der Restriktionsschnittstellen wurde darauf geachtet, dass diese weder in den viralen Sequenzen noch außerhalb der MCS in den Vektoren auftraten. Der Ansatz für die Verdauungsreaktionen ist in Tabelle 4.2.4 dargestellt. Der Verdau wurde bei 37 °C für 30 min durchgeführt. Zur Inaktivierung der Enzyme wurde der Reaktionsansatz im Anschluss für 10 min auf 70 °C erhitzt. Die verwendeten Enzyme waren je nach Vektor und Virusfragment NotI, PacI, SmaI, SacI,

HindIII und KpnI (ThermoFisher Scientific, USA).

Tabelle 4.2.4: Protokoll des Restriktionsverdaus der PCR Produkte.

	PCR Produkt	Vektor
DNA	20 µl	3 µl
FD Puffer (10x)	3 µl	2 µl
Enzym I	1 µl	1 µl
Enzym II	1 µl	1 µl
H ₂ O	5 µl	13 µl
Verdau	30 min	37 °C
Reaktionsabbruch	10 min	70 °C

Im Anschluss an den Restriktionsverdaus der PCR-Produkte und der Vektoren wurden diese über ein 1,5-prozentiges Agarosegel (einfach TBE Puffer, Ethidiumbromid Färbung) aufgetrennt und überprüft. Nach der Auftrennung für 30 min bei 160 V wurden die verdauten PCR-Produkte und Vektoren aus dem Gel herausgeschnitten. Die Extraktion der Banden aus dem Gel erfolgte mit dem Genejet Plasmid Minirep Kit (Fermentas, st. Leon-Roth) gemäß den Herstellerangaben. Die so aufgereinigten und geschnittenen viralen DNA Fragmente sowie die Vektoren wurden in einem Ligationsansatz gemischt. Hierbei wurde die T4-Ligase (Fermentas) eingesetzt.

Tabelle 4.2.5: Protokoll des Ligationsansatzes für Vektoren und PCR Produkte.

Vektor verdaut	2 µl	
PCR Produkt verdaut	10 µl	
T4 Puffer (10x)	2 µl	
T4 Ligase	1 µl	
H ₂ O	5 µl	
Ligation	ü.N.	4 °C

4.2.5 Vermehrung und Überprüfung der Vektoren

Die Vermehrung der Vektoren erfolgte in kompetenten *Escherichia coli* Zellen, die als Kit vertrieben werden (StratClone competent cells; Stratagene Inc., USA). Im ersten Schritt wurden hierbei 5 µl der konstruierten Vektoren mit 40 µl der Bakterienzellen gemischt. Dieses Gemisch wurde anschließend für 30 min auf Eis gekühlt. Im Anschluss daran erfolgte der Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C. Nach einer erneuten Kühlung auf Eis für 5 min wurden 250 µl LB-Medium, welches auf 37 °C vorgewärmt worden war, hinzu gegeben und die Bakterienlösung für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Nach dieser Inkubationszeit wurden 150 µl der Zellen auf LB-Amp [10µg/ml] Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank gelagert.

Im Anschluss an die Wachstumsphase auf den LB-Amp Platten wurden einzelne Bakterienkolonien zur Überprüfung mit einer Pipettenspitze gepickt und in einer Kolonie-PCR überprüft. Hierzu wurden die gleichen Bedingungen wie beim PCR basierten PhV Screening verwendet (2.2.3). Positive Kolonien wurden anschließend in flüssiges LB-Amp [10µg/ml] Medium überführt und bei 37 °C für 24 Stunden schütteln inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Plasmide mit einem MiniPrep Plasmid Extraktionskit (Genaxxon) aus den Bakterien isoliert und gereinigt. Die Konzentration der so erhaltenen Plasmide wurde photometrisch bestimmt (Biophotometer, Fa. Eppendorf, Hamburg) und daraus die Kopienzahl berechnet. Hierbei wurden die berechneten Größen der Vektoren mit der gemessenen DNA Konzentration ins Verhältnis gesetzt und die Kopienanzahl pro Mikroliter berechnet:

$$\frac{\text{Konzentration [g/}\mu\text{l]}}{\left(\text{Vektorgröße [bp]} \cdot 650 \frac{[\text{Da/g}]}{N_a} \right)} = \text{Kopienanzahl } [\mu\text{l}^{-1}]$$

Konzentration: photometrisch bestimmte DNA Konzentration

Vektorgröße: berechnet aus Insert und Vektor in Basenpaaren

Kopienanzahl: Anzahl an Vektoren pro Mikroliter

Für die Überprüfung der Vektoren wurden diese sequenziert. Hierfür wurden zum einen das M13 Primerpaar (Promega, USA) und zum anderen PhV spezifische Primer (Tab. 2.2.4) verwendet. Im Fall der PhV spezifischen Primer wurde aus dem viralen Abschnitt in Richtung des Vektors sequenziert, um die Verbindungsstelle überprüfen zu können.

4.2.6 Inokulation

Die Inokulation von *H. annuus* Keimlingen mit Sporangien von *P. halstedii* sowie PhV wurde bereits mehrfach erfolgreich durchgeführt (Kapitel 3) und kann als etabliert bezeichnet werden. Für diese Versuche wurde das Gemisch von 10 Keimlingen und 1000 Sporangien / Keimling in 10 ml Wasser mit extrahierten Viren versetzt und für 3 Stunden im Dunkeln bei 18 °C inokuliert. Anschließend wurden die Keimlinge in Erde ausgepflanzt. Da hierbei die Viren ohne zusätzliche Hilfsmittel von dem Oomyceten aufgenommen werden, wurde dies ebenfalls mit den konstruierten Plasmiden sowie nackter viraler RNA getestet (Abb. 4.2.4). Im Fall der Plasmide wurden je 10^8 Kopien des Vektors mit der RdRp bzw. mit CP verwendet. Die Konzentration an Plasmiden betrug daher 10^5 Kopien pro μ l und 10^4 Kopien pro Sporangium. Die Inokulation wurde ausschließlich mit pGFPH basierten Vektoren getestet.

Zwölf Tage nach der Inokulation wurde die Sporulation induziert (3.2.3). Von den potentiell transformierten Oomyceten wurde eine Hälfte unter Standardbedingungen weiter vermehrt, und die andere Hälfte für den Nachweis verwendet. Hierbei wurden für jeden Ansatz die Sporangien von den Blättern abgesaugt und gesammelt in die RNA Extraktion eingesetzt. Die so vereinigten Proben wurden, nach der cDNA Synthese, in einer PCR auf PhV getestet.

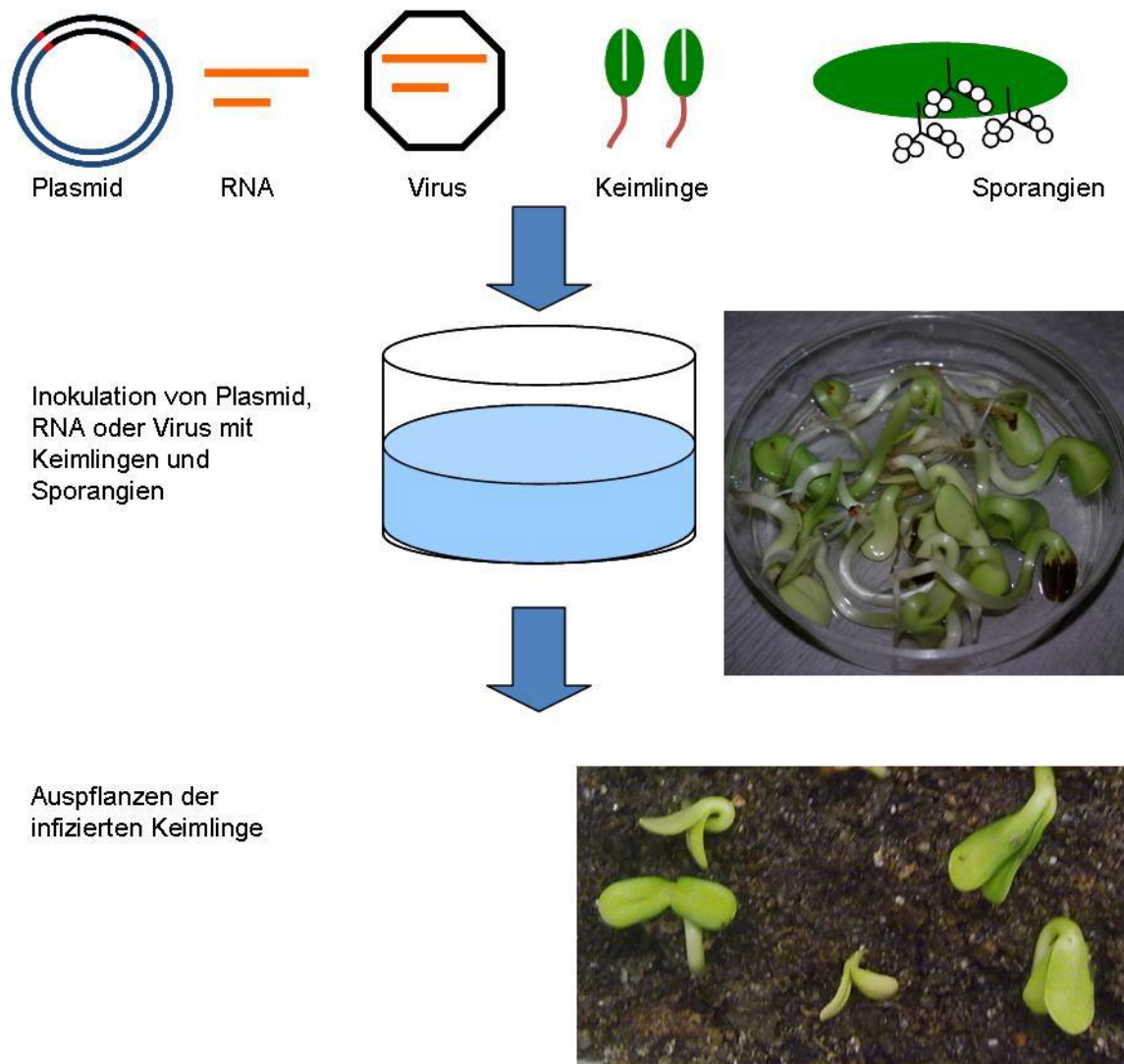


Abbildung 4.2.4: Schematische Übersicht der Inokulation. Hierbei wurden wahlweise Plasmide, RNA oder Vektoren gemeinsam mit *H. annuus* Keimlingen und Sporangien von *P. halstedii* für 3 h inokuliert. Nach dieser Zeitspanne wurden die frisch infizierten Keimlinge ausgepflanzt.

4.2.7 Mechanische Perforation

Die Versuche zur mechanischen Perforation wurden an Sonnenblumen durchgeführt, welche 12 Tage zuvor mit *P. halstedii* infiziert worden waren. Hierbei wurden Blattabschnitte von Kotyledonen, denen die Infektion deutlich anzusehen war (Abb. 4.2.5) mit einem 20 µl großen Tropfen eines Transformationsansatzes versehen. Diese Ansätze beinhalteten entweder das ganze PhV, nur dessen RNA oder eine Mischung von Plasmiden, welche die RdRp und das CP kodieren. Im Fall der Plasmide wurden je 10^8 Kopien des Vektors mit der

RdRp bzw. mit dem CP verwendet. Die Viruspartikel und die RNA wurden nicht quantifiziert. Die auf die Blattoberflächen aufgetragenen Tropfen und das darunter liegende Gewebe wurden mit einer sehr feinen Nadel 10-15 Mal durchstoßen. Hierbei wird davon ausgegangen, dass das Hyphengewebe von *P. halstedii* verletzt und so der Transformationsansatz aufgenommen wird. Diese als „Löchern“ bezeichnete Methode wurde auch von Hammer *et al.* (2007) für eine transiente Transformation von *P. halstedii* genutzt.

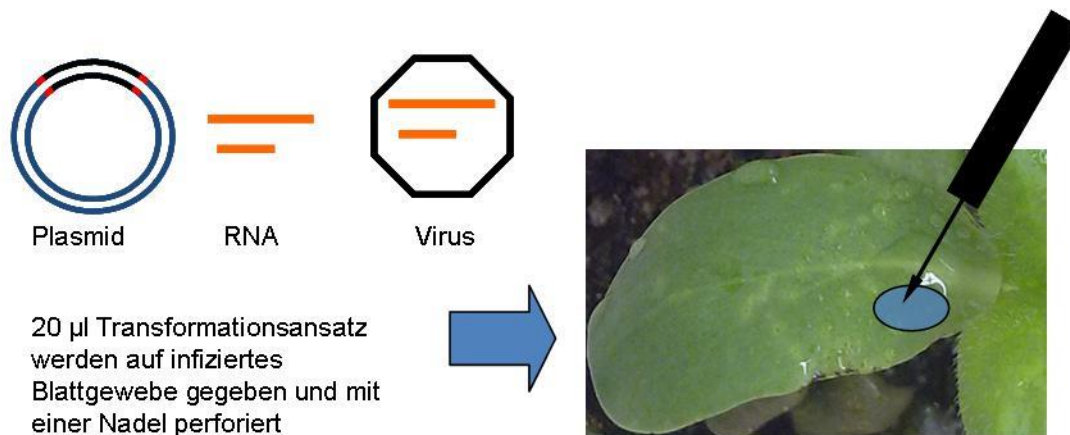


Abbildung 4.2.5: Schematische Darstellung der mechanischen Perforation. Hierbei wurden jeweils 20 µl einer Lösung mit wahlweise Plasmiden, RNA oder PhV auf eine deutlich mit *P. halstedii* infizierte Stelle eines Blattes von *H. annuus* gegeben. Im Anschluss wurden der Tropfen und das darunter liegende Gewebe 10 – 15 Mal mit einer feinen Nadel durchstoßen.

Zwei Tage nach der Perforation wurde die Sporulation induziert (3.2.3). Von den Sporangien der perforierten Bereiche der Keimblätter wurde eine Hälfte unter Standardbedingungen weiter vermehrt, und die andere Hälfte für den Nachweis verwendet. Hierbei wurden jeweils von bis zu drei Ansätzen die Sporangien von den Blättern abgesaugt und gesammelt in die RNA Extraktion eingesetzt. Die so vereinigten Proben wurden, nach der cDNA Synthese, in einer PCR auf PhV getestet.

4.2.8 Elektroporation

Die Elektroporation ist eine weitere Methode um Fremd-DNA in Organismen einzubringen. Hierbei werden Zellen ohne feste Zellwand einem elektrischen Feld ausgesetzt, welches kurzzeitig die Membran durchlässig werden lässt. Aus diesem Grund wurde bei diesen

Versuchen mit dem Zoosporen-Stadium von *P. halstedii* gearbeitet. Hierzu wurden zuerst Sporangien von frisch sporulierenden Sonnenblumenblättern über einer einprozentigen Wasseragarplatte abgeklopft (Abb. 4.2.6). Die so vereinzelter Sporangien wurden für etwa drei Stunden im Dunkeln bei 18 °C gelagert und so zur Freisetzung ihrer Zoosporen angeregt. Nach einer lichtmikroskopischen Überprüfung der Freisetzung wurden die Agarplatten mit einem Milliliter Wasser vorsichtig abgespült. Hierbei blieb der größte Teil der nicht geöffneten Sporangien aufgrund ihres höheren Gewichts auf der Agarplatte, wohingegen die Zoosporen mit dem Wasser wieder aufgesaugt werden konnten. Die so gewonnenen Zoosporen wurden nun in eine, auf Eis gekühlte, Elektroporationsküvette überführt und erhielten einen 4 kV Stromstoß für 2 ms. Hierzu wurde ein Elektroporator (Micro Pulser TM, Bio-Rad, USA) verwendet. Nach dem Elektroschock wurde CaCl_2 in einer Endkonzentration von 20 mM hinzugegeben. Die Zugabe dieses Salzes induziert eine rasche Enzystierung der Zoosporen (Bendel 2013), wodurch ein Auswerfen der Plasmide verhindert werden sollte. Direkt im Anschluss an die CaCl_2 Zugabe wurde die Suspension in 20 µl Portionen auf vorbereitete etwa 1 cm² große Keimblattstücke von *H. annuus* pipettiert. Als Kontaminationskontrollen wurden Blattscheiben mit *P. halstedii* des gleichen Isolates ohne Elektroporation, sowie mit Elektroporation ohne Zugabe von Plasmid verwendet.

Die Auswertung der Transformation erfolgte nach 9 – 12 Tagen, wenn erste Sporulationen sichtbar wurden. Hierzu wurde etwa ein Drittel des sporulierenden Blattes für die RNA Extraktion eingesetzt. Im Falle positiver Ergebnisse wurden einige Sporangienträger auf frische Blattstücke überführt um auch die Nachfolgeneration auf PhV testen zu können. Zusätzlich wurde die RNA Extraktion mit einem weiteren Drittel der Blattscheibe wiederholt, um das Ergebnis zu bestätigen.

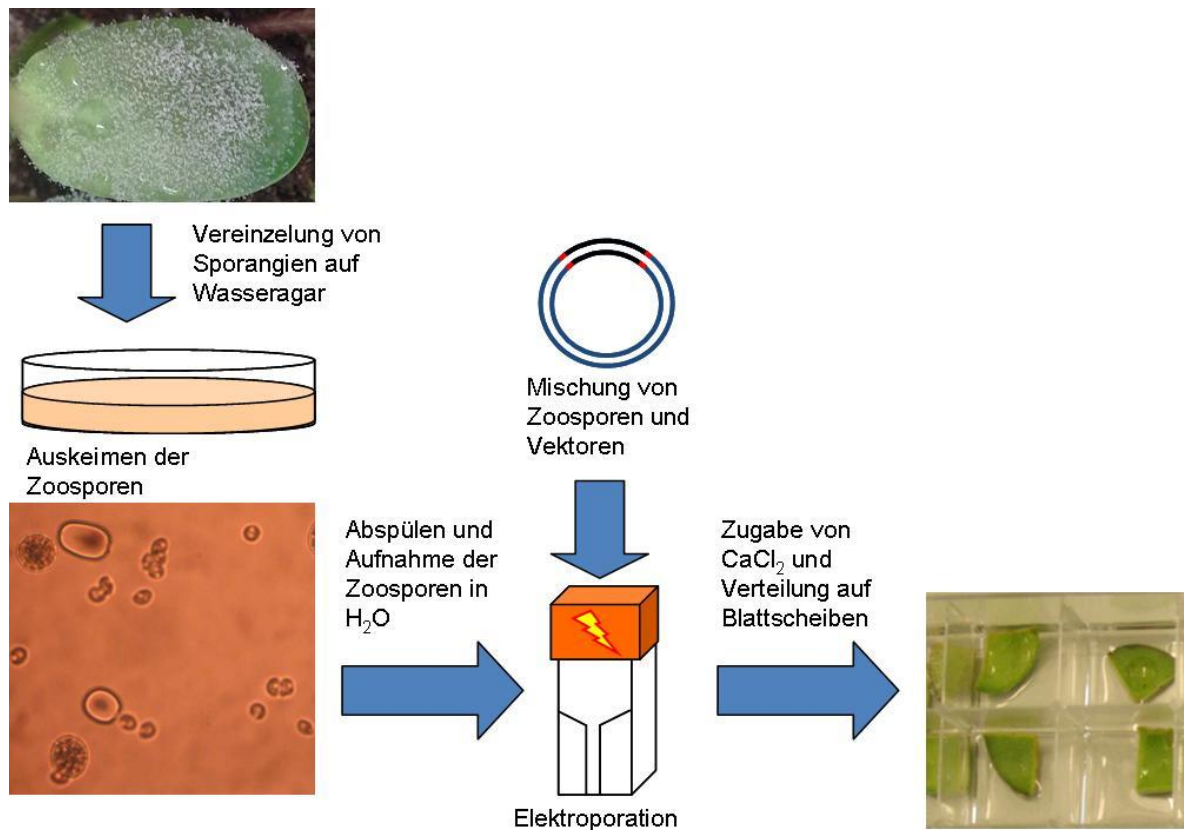


Abbildung 4.2.6: Schematische Übersicht der Elektroporation von Zoosporen von *P. halstedii*. Im ersten Schritt wurden Sporangien auf Wasseragar vereinzelt. Nach einer Inkubation von 3 Stunden setzten diese Zoosporen frei, welche in 1 mL Wasser aufgenommen wurden. Diese Zoosporen wurden mit Plasmiden in einer Küvette gemischt und erhielten einen Elektroschock. Anschließend wurde CaCl₂ zugegeben, welches die Enzystierung der Zoosporen beschleunigt. Von dieser Lösung wurden je 25 µl auf Keimblättern von *H. annuus* verteilt.

4.2.9 Kontrolle der Transformation

Die Überprüfung der Transformationen wurde mittels PCR durchgeführt. Hierzu wurde analog zu vorherigen Experimenten RNA aus *P. halstedii* extrahiert (2.2.2). Zusätzlich wurde jedoch noch ein DNase Verdau vor der cDNA Synthese durchgeführt, um falsch positive Ergebnisse durch die Plasmide auszuschließen. Hierbei wurde die PerfeCta® DNase I (Quanta BioSciences, USA) gemäß der Anleitung verwendet. Die cDNAs der einzelnen Transformationsansätze wurden mit dem bereits beschriebenen PhV Screening (2.2.3) untersucht. Diese cDNAs wurden sowohl mit dem oligodT18 Primer als auch mit dem R6 Primer synthetisiert. Dieser Schritt diente der Untersuchung, ob RNA gebildet wurde und ob diese über eine Polyadenilierungssequenz verfügt. Zusätzlich wurden auch die DNase behandelten RNAs im Screening getestet, um den kompletten DNA Verdau zu bestätigen. Als

weitere Kontrollen wurden der nicht transformierte Stamm #1211K6 sowie ein virushaltiges Isolat (#631) verwendet.

Als Kontrolle der Vektoraufnahme wurden, soweit möglich, einzelne Sporenträger von potentiell infizierten *P. halstedii* Isolaten mit einer Pinzette gepflückt. Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen war jedoch wichtig, dass die Sporangienträger an einer Stelle aus dem Blatt von *H. annuus* hervortraten, an der sich vorher keine Transformationslösung befunden hat. Die so gesammelten Sporangienträger wurden direkt in die Nachweis PCR (2.2.3) eingesetzt.

Um die RNA Extraktion und cDNA Synthese zu überprüfen wurden Primer auf das Hexa-Ubiquitin der Sonnenblume verwendet (Tab. 4.2.6). Diese Primer flankieren einen Intronbereich und können somit genomische DNA von cDNA unterscheiden, da im ersten Fall ein Fragment von etwa 1200 bp im zweiten Fall lediglich 240 bp amplifiziert werden.

Tabelle 4.2.6: Eingesetzte Primer auf das Hexa-Ubiquitin der Sonnenblume zur Überprüfung der RNA Extraktion und cDNA Synthese.

HexaUbiQ_F2	54,0°C	CTGTTTCGCTTCGTCTCTTTCA
HexaUbiQ_R2	55,4°C	CTGAGCCTGAGCACGAGATGA

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Konstruktion und Überprüfung der Vektoren

Die Vektoren pUC18 sowie pGFPH konnten durch den Einsatz der Adapterprimer und Restriktionsenzyme erfolgreich modifiziert werden. Der Einbau der Fragmente, sowie die Vermehrung der Vektoren in *E. coli*, konnten hierbei erfolgreich in Kolonie-PCRs nachgewiesen werden. Die Orientierung der viralen Sequenzen in den Vektoren konnte durch die Wahl der unterschiedlichen Restriktionsenzyme gewährleistet werden.

Die nach der Plasmidextraktion gemessenen photometrischen Daten zeigten für die Vermessung der Plasmide auf pGFPH Basis etwa $2 \cdot 10^9$ Kopien pro μl für pCPH und $1 \cdot 10^9$ Kopien pro μl für pRdRpH. Die Vermessung der Vektoren auf pUC18 Basis ergab etwa $12 \cdot 10^9$ Kopien pro μl für pT7CPpA und $15 \cdot 10^9$ Kopien pro μl für pT7RDRPpA.

Sequenzierungen der Plasmide bestätigten den Einbau wie er in den Vektorkarten (Abb. 4.2.2; Abb. 4.2.3) am Beispiel der RdRp von PhV dargestellt ist. Hierbei zeigten sich sowohl die M13 Primer, als auch die PhV spezifischen Primer als geeignet.

4.3.2 Inokulationsversuche

Analog zur Inokulation mit ganzen Viren (Kap. 3) wurden Sonnenblumenkeimlinge mit Sporangien von *P. halstedii* unter gleichzeitiger Zugabe der Plasmide pRdRpH und pCPH inokuliert. Ebenfalls wurde die Inokulation mit reiner viraler RNA getestet. Nachdem 12 Tage nach der Inokulation die Pflanzen zur Sporulation induziert wurden, zeigten von 115 Pflanzen 92 Sporulationen. In den hierbei gesammelten Sporangien der insgesamt 13 Transformationsansätze konnte jedoch keine der beiden viralen Sequenzen nachgewiesen werden (Tab. 4.3.1). Auch die Experimente, welche die Aufnahme der Plasmid DNA bestätigen sollten, zeigten keine Amplifikation in der PCR. Lediglich die Ansätze, die mit PhV Partikeln inokuliert wurden zeigten einen positiven Nachweis.

Da in der ersten Generation für die Transformationsansätze kein positives Ergebnis gezeigt werden konnte, wurde die folgende Generation nicht weiter überprüft.

Tabelle 4.3.1: Ergebnisse der PCR Versuche zum Nachweis von PhV Genen in Sporangien der F1 Generation von *P. halstedii* nach der Inokulation von Transformationsansätzen mit Sporangien und Sonnenblumenkeimlingen.

	Anzahl Ansätze	Anzahl Pflanzen pro Ansatz	Durchschnittliche Anzahl an Sporulationen	Positiver RNA Nachweis		Positiver Plasmid DNA Nachweis	
				RdRp	CP	RdRp	CP
RNA	3	10	7	0	0	0	0
pRdRpH	2	10	8,5	0	-	0	-
pCPH	2	10	8	-	0	-	0
pRdRpH + pCPH	5	10	8,2	0	0	0	0
PhV	1	5	4	1 ^A	1 ^A	-	-

-: nicht untersucht

A: nur einmal RNA extrahiert und getestet

4.3.3 Mechanische Perforation

Die Versuche zur mechanischen Perforation wurden mit PhV, RNA und dem Vektorpaar pRdRpH und pCPH durchgeführt. Bei 60 durchgeführten Perforationen kam es in 33 Fällen zu einer Sporulation auf den Keimblättern. Bei der anschließenden Kontrolle durch RNA Extraktion, DNase Verdau, cDNA Synthese und PCR konnte jedoch kein Fragment von PhV amplifiziert werden (Tab. 4.3.2). Die Überprüfung der Vektoraufnahme führte zu keinem Ergebnis, da ein zu großer Überschuss an Plasmid DNA auf den perforierten Blattstücken vorhanden war.

Hierbei zeigte sich, dass keiner der Ansätze zu Erfolg führte. So konnte nicht einmal das vollständige Virus durch Perforation der Hyphen in den Oomyceten aufgenommen werden.

Tabelle 4.3.2: Ergebnisse der PCR Versuche zum Nachweis von PhV Genen in Sporangien der F1 Generation von *Plasmopara halstedii* nach der mechanischen Perforation von deutlich infizierten Keimblättern der Sonnenblume.

	Anzahl Versuche	Anzahl Sporulationen	Positiver PCR Nachweis	
			RdRp	CP
RNA	10	6	0	0
pRdRpH	10	4	0	-
pCPH	10	7	-	0
pRdRpH + pCPH	20	12	0	0
PhV	10	4	0	0

-: nicht untersucht

4.3.4 Elektroporation

Die Versuche zur Elektroporation wurden ausschließlich mit dem Vektorpaar pT7RdRpA und pT7CPA und frisch gebildeten, zellwandlosen Zoosporen durchgeführt. Die Versuche wurden mehrfach durchgeführt und sind hier beispielhaft an einer Experimentreihe beschrieben.

Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass auf etwa 24% der insgesamt 75 verwendeten Blattscheiben nach 10 – 12 Tagen eine Sporulation von *P. halstedii* sichtbar wurde. Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei Kontrollen, bei denen der Oomycet ohne Vektorzugabe den Elektroschocks ausgesetzt war (T-Ko). Dies zeigte, dass Zoosporen den elektrischen Schock von vier Kilovolt überlebten und trotz induzierterENZYSTIERUNG durch CaCl₂ Zugabe in den Wirt eindringen konnten.

Von allen 18 infizierten Blattscheiben (A – R) wurde RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Dies wurde ebenfalls für die Kontrollen, Ko-1 – Ko-4, T-Ko elektroporiert ohne Plasmide, *H. annuus* und #631 durchgeführt. Alle cDNA Proben zeigten in der PCR mit dem Primerpaar HexaUbiQ_F2/R2 eine klare Bande für einen transkribierten Abschnitt des Hexa-Ubiquitins der Sonnenblumen und somit eine erfolgreiche Umschreibung der

RNA in cDNA (nicht dargestellt). Die Überprüfung der DNase behandelten RNAs mit den Primerpaaren PhV_pol_F1/R1 und PhV_WG_F1/R1 diente als Kontrolle zum Nachweis der Plasmid DNA. Hier zeigte sich für eine Probe (O) eine leichte Bande, alle anderen waren jedoch eindeutig negativ. Hiermit konnten falsch positive Ergebnisse durch Plasmidrückstände ausgeschlossen werden (nicht dargestellt).

Die aus den 18 sporulierenden Blattscheiben (A – R) gewonnenen Nukleinsäuren wurden mit den Primerpaaren Pol_F1/R1 und WG_PhV_F1/R2 (2.2.2) getestet. Zusätzlich wurden von den Proben D, E, G, P, Q und R weitere RNA extrahiert (gekennzeichnet durch angehängte Zahlen: D2, E2 etc.), um diese erneut zu überprüfen. Von diesen 24 Proben zeigten 5 (D2, G, P, Q und R) deutlich positive Signale für RdRp und CP bei beiden PCR Reaktionen (Abb. 4.3.1 und Abb. 4.3.2). Die Menge der Amplifikate ließ auf eine sehr hohe Kopienzahl der gewonnenen viralen cDNA Fragmente schließen. Die Stärke der Amplifikate ist für diese fünf Proben ähnlich der von #631, welches ein unbehandeltes virushaltiges Isolat darstellt. Die Probe E zeigte ebenfalls PCR Produkte für beide Fragmente, jedoch deutlich schwächer als die anderen 5. Zwei weitere Proben (B und M) zeigten schwache Amplifikationen für die RdRp. Eine Amplifikation für die Sequenz des Hüllproteins wurde nicht einzeln nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden mit weiteren Primerpaaren (PhV_pol_F5/R5 und 2f3/WG-PhV_R1; Tab. 2.2.4) bestätigt (nicht dargestellt).

Von drei getesteten Proben (D, E und G) wurden Sporangien auf neue Blattscheiben überführt um eine weitere Generation heranzuziehen. Die getesteten Folgegenerationen von drei Proben, D(F2), E(F2), G(F2) und G(F2)2, zeigten jedoch keine positiven Nachweise für die viralen RNA Fragmente. Versuche zu Folgegenerationen mit den Proben P, Q und R führten zu keiner Sporulation und wurden daher nicht in der PCR eingesetzt.

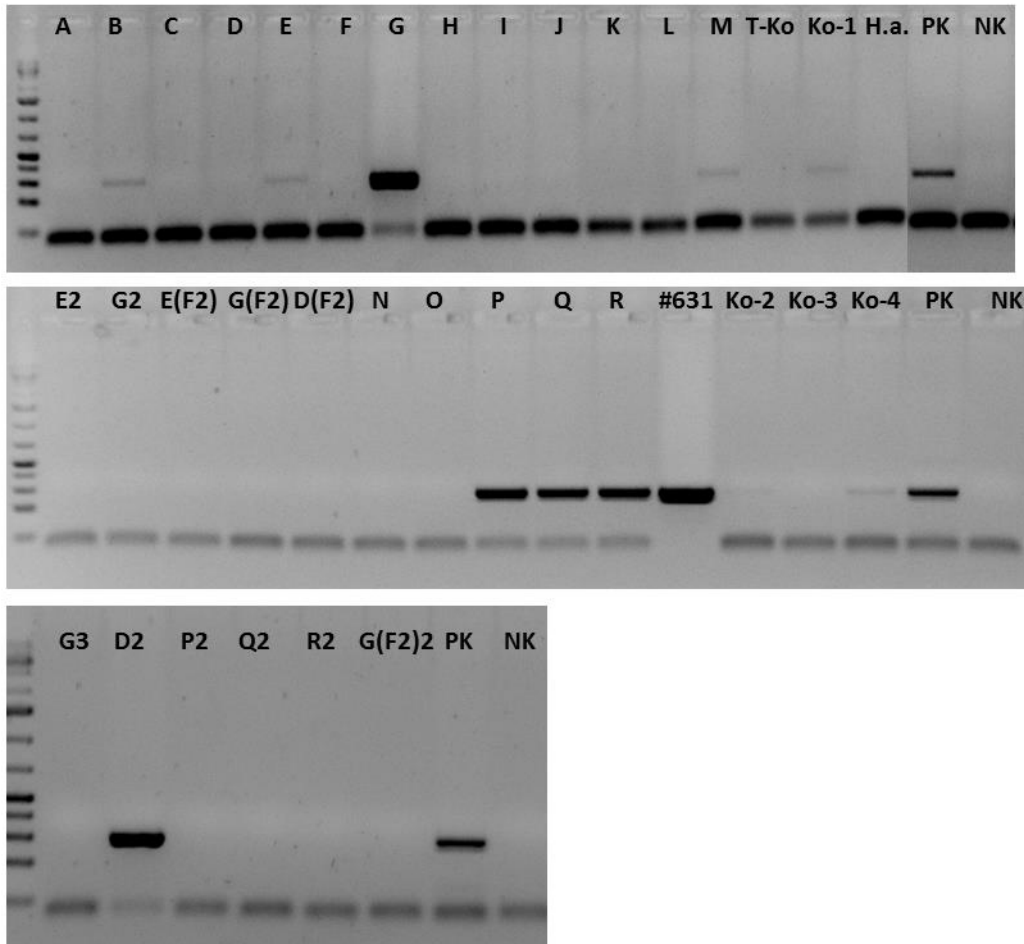


Abbildung 4.3.1: Ergebnis der Nachweis PCR für ein 294 bp großes Fragment der RdRp von PhV mit den Primern PhV_Pol_F1/R1. Die Buchstaben A – R stehen für die verschiedenen Proben. Die Nummern 2 bzw. 3 sind neue RNA Extraktionen von derselben Blattscheibe. F2 ist eine Folgegeneration, welche aus der entsprechenden Probe hervorging. T-Ko bezeichnet eine Probe die alle Schritte der Transformation ohne Zugabe von Plasmiden durchlaufen hat. Ko-1 bis Ko-4 sind Kontrollen aus dem nicht behandelten *P. halstedii* Isolat. Bei #631 handelt es sich um einen virushaltigen *P. halstedii* Stamm. Die Positivkontrolle der PCR ist mit PK, die Negativkontrolle mit NK gekennzeichnet. H.a. ist eine Kontrolle die nur *H. annuus* RNA enthält.

Die Kontrollen der PCR zeigten in allen Fällen eine leere Negativkontrolle (NK) sowie ein deutliches Amplifikat in der Positivkontrolle (PK). Die ohne Transformationsansatz mit

Elektroporation und CaCl_2 behandelte Kontrolle (T-Ko) zeigte, genau wie die Kontrolle mit Sonnenblumen RNA (H.a.), keine Amplifikate. Bei den vier weiteren Kontrollen des eingesetzten *P. halstedii* Stammes (Ko-1 – Ko-4) zeigten sich einige leichte Banden. So zeigt Ko-1 Amplifikate für beide Fragmente, Ko-2 eine leichte Bande für das CP und Ko-4 eine leichte Bande für die RdRp.

Die Ergebnisse der PCRs sind in der Tabelle 4.3.3 zusammengefasst.

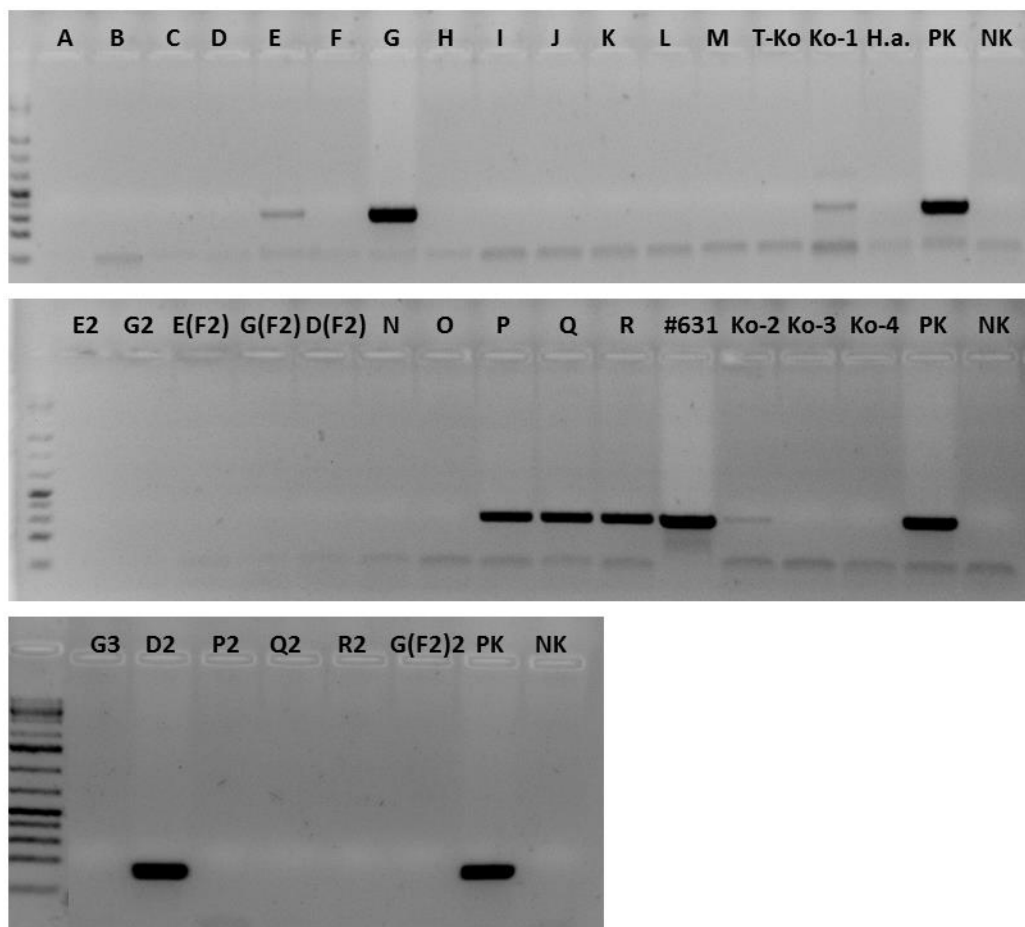


Abbildung 4.3.2: Ergebnis der Nachweis PCR für ein 324 bp großes Fragment des CP von PhV mit den Primern PhV_WG_F1/R2. Die Buchstaben A – R stehen für die verschiedenen Proben. Die Nummern 2 bzw. 3 sind neue RNA Extraktionen von derselben Blattscheibe. F2 ist eine Folgegeneration, welche aus der entsprechenden Probe hervorging. T-Ko bezeichnet eine Probe die alle Schritte der Transformation ohne Zugabe von Plasmiden durchlaufen hat. Ko-1 bis Ko-4 sind Kontrollen aus dem nicht behandelten *P. halstedii* Isolat. Bei #631 handelt es sich um einen virushaltigen *P. halstedii* Stamm. Die Positivkontrolle der PCR ist mit PK, die Negativkontrolle mit NK gekennzeichnet. H.a. ist eine Kontrolle die nur *H. annuus* RNA enthält.

Tabelle 4.3.3: Ergebnisse der PCR Versuche zum Nachweis von PhV Genen in Sporangien der F1 Generation von *Plasmopara halstedii* nach Infektion von Blattscheiben mit Sporen, die in Anwesenheit der Vektoren pT7RDRpA und pT7CPpA einer Elektroporation unterzogen worden waren. Zur cDNA Synthese wurden die Primer dT18 eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die nicht DNase behandelte RNA von der entsprechenden Proben. Als weitere Kontrollproben wurden cDNAs aus *Helianthus annuus* sowie aus *Plasmopara halstedii* Isolaten mit (#631) und ohne (Ko-1 – Ko-4) PhV eingesetzt.

	RdRp dT18	CP dT18	Hexa- ubiquitin	RdRp RNA		RdRp dT18	CP dT18	Hexa- ubiquitin	RdRp RNA
A	-	-	++	-	L	-	-	++	-
B	+	-	++	-	M	+	-	++	-
C	-	-	++	-	N	-	-	++	-
D	-	-	++	-	O	-	-	++	+
D2	+++	+++	++	-	P	+++	+++	++	-
D(F2)	-	-	++	-	P2	-	-	++	-
E	+	+	++	-	Q	+++	+++	++	-
E(F2)	-	-	++	-	Q2	-	-	++	-
F	-	-	++	-	R	+++	+++	++	-
G	+++	+++	++	-	R2	-	-	++	-
G2	-	-	++	-					
G3	-	-	++	-	<i>H. annuus</i>	-	-	++	-
G(F2)	-	-	++	-	Ko-1	+	+	++	-
G(F2)2	-	-	++	-	Ko-2 ₁	-	+	++	-
H	-	-	++	-	Ko-3 ₁	-	-	++	-
I	-	-	++	-	Ko-4 ₁	+	-	++	-
J	-	-	++	-	T-Ko *	-	-	++	-
K	-	-	++	-	#631 ₁	+++	+++	++	-

1: nicht mit DNase behandelt; *: Elektroporation, jedoch ohne Plasmide

- kein PCR Produkt; + schwaches PCR Produkt; ++ starkes PCR Produkt; +++ sehr starkes PCR Produkt

4.4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Nutzung von PhV zum Zweck der schwierigen Transformation von *P. halstedii*, die bisher nur transient gelungen war (Hammer *et al.*, 2007) und auch bei keinem anderen obligat biotrophen Oomyceten erfolgreich war (Dubresson *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu diesen bisherigen Arbeiten lag der Fokus nicht auf dem Einbringen und der Expression von Fluoreszenzproteinen wie zum Beispiel GFP, sondern darauf, virale RNA in *P. halstedii* zu vervielfältigen. Entscheidend ist hierbei, dass die bisher genutzten Vektoren allem Anschein nach nicht in den Oomyceten vermehrt und vermutlich nicht an die nächste Generation über Zoosporen weitergegeben werden. Hierbei spielt die obligat biotrophe Lebensweise eine große Rolle, da kein zusätzlicher Selektionsdruck über spezielle Medien zum Erhalt der eingebrachten Plasmide auf die Organismen ausgeübt werden kann. Dies sollte durch die Expression viraler Sequenzen umgangen werden, da diese sich theoretisch, nach der ersten Transkription ihrer Vektoren, selbstständig durch ihre eigene Polymerase weiter vermehren können.

Die notwendigen Voraussetzungen für diese Arbeiten wurden somit in den Kapiteln 2 und 3 dieser Arbeit geschaffen. So konnten virusfreie Isolate von *P. halstedii* ausfindig gemacht und kultiviert werden. Auch stellt die künstliche Übertragung von PhV (Kapitel 3) in den Oomyceten einen ersten Schritt in die Richtung dieser Art von Transformation dar. Hierbei konnte, durch Zugabe von, aus virushaltigen *P. halstedii* Proben extrahiertem Virus in eine Inokulationslösung, ein vormals virusfreies Isolat infiziert werden. Die so neu infizierten Isolate zeigten eine stabile Virusexpression, die auch nach über 10 Generationen nachzuweisen war.

Analog zu diesen Experimenten wurde in diesem Kapitel zuerst mit verschiedenen Inokulationsansätzen gearbeitet. Hierbei zeigten jedoch Versuche bei denen extrahierte RNA während der Inokulation aufgenommen werden sollten keine positiven Ergebnisse in der Überprüfung der daraus folgenden Oomycetengeneration. Dieses Ergebnis kann verschiedene Ursachen haben, wobei die geringe Stabilität von RNA sowie die Omnipräsenz von RNasen die wahrscheinlichste Erklärung bieten. Aus diesem Grund wurden die Inokulationsexperimente ebenfalls mit den stabileren DNA Vektoren durchgeführt. Für diese Versuche

wurden die Vektoren pRdRpH und pCPH, verwendet. Diese ähneln in ihrer ursprünglichen Variante p34TRH den erfolgreich bei transienten *P. halstedii* Transformationen verwendeten Vektoren (Hammer *et al.*, 2007). Allerdings konnte auch hier nach der Auswertung der ersten Generation des Oomyceten kein positives Ergebnis festgestellt werden. Dies betraf sowohl den Test auf RNA Transkripte, als auch den auf die DNA der Plasmide. Da in diesem Fall mit großem Überschuss, sowie stabileren Nukleinsäuren gearbeitet wurde, ist die Degeneration vom Großteil der Plasmide nahezu auszuschließen. Das Ergebnis legt eher den Schluss nahe, dass eine passive Aufnahme von Nukleinsäuren während der Inokulation nicht möglich ist. Im Umkehrschluss kann daraus allerdings auch eine aktive Aufnahme der PhV Viruspartikel durch *P. halstedii* vermutet werden.

Als andere mögliche Variante zur Einbringung der viralen Sequenzen bot sich die mechanische Perforation an. Diese als „Löchern“ beschriebene Methode wurde ebenfalls bei den Arbeiten von Hammer *et al.* (2007) erfolgreich verwendet. Hierbei sollen, durch mechanisch beigefügte Verletzungen des Hyphengewebes, die Transformationsansätze vom Mycel aufgenommen werden. Als Ansätze wurden hierbei wiederum PhV Partikel, PhV RNA sowie die Vektoren pRdRpH und pCPH verwendet. Hierbei erwies es sich teilweise als schwierig, geeignete Stellen an den Keimblättern der Sonnenblume zu finden, da sich nicht in allen Fällen infiziertes Blattgewebe farblich von gesundem unterscheiden ließ. Dennoch gelang es in mehreren Versuchen, infiziertes Blattgewebe mit dem Transformationsansatz darauf mit einer Nadel zu perforieren und an diesen Stellen nach zwei Tagen, wie bei Hammer *et al.* (2007), eine Sporulation zu induzieren. Im Gegensatz zu dieser Arbeit (Hammer *et al.*, 2007) konnte hierbei jedoch für keinen der Transformationsansätze ein positives Ergebnis verzeichnet werden. Am erstaunlichsten war hierbei, dass die Versuche mit ganzen Viruspartikeln kein positives Ergebnis zur Folge hatten. Dabei können verschiedene Faktoren eine Rolle spielen. So ist es beispielsweise möglich, dass der zeitliche Abstand zwischen der Transformation und der Sporulation zu kurz war, und somit nicht ausreichend Virus für einen Nachweis gebildet wurde. Eine andere Möglichkeit wäre eine Interaktion mit dem verletzten Gewebe der Sonnenblume. So werden in diesen perforierten Bereichen vermehrt Abwehrmechanismen aktiviert, was PhV möglicherweise schädigt. Bei den Versuchen, die RNA von PhV durch „Löchern“ zu übertragen, sind es, neben überall vorhandenen RNasen, vermutlich ebenfalls Abwehrmechanismen der Wirtspflanze, die die Transformation verhindern. Die Möglichkeiten des Einflusses der Pflanze auf die Versuche

mit den Vektoren pRdRpH und pCPH können jedoch nahezu ausgeschlossen werden. Zum einen handelt es sich hierbei um stabilere Plasmid DNA und zum anderen zeigen die Ergebnisse von Hammer *et al.* (2007), dass durch „Löchern“ Vektoren in Hyphengewebe von *P. halstedii* eingebracht werden kann. Da die Plasmide der beiden Arbeiten über den gleichen Promotor (Ham34 aus *Bremia lactucae*) verfügen, sollte bei einer erfolgreichen Aufnahme auch eine Transkription der PhV Sequenzen im Oomyceten möglich sein. Im Unterschied zu den Experimenten dieser Arbeit wurde jedoch nicht mit viralen Sequenzen sondern mit einem Fluoreszenzproteinen (GFP) gearbeitet, was einen qualitativen Nachweis durch Fluoreszenzmikroskopie erlaubte. Im Gegensatz hierzu erfolgte der Nachweis bei der Transformation mit PhV immer aufgrund der Transkripte. Da über die Quantität der Transkripte von GFP jedoch keine Angaben gemacht wurden, ist unklar, wie oft die Plasmide tatsächlich in *P. halstedii* abgelesen wurden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die Vektoren pRdRpH und pCPH zwar von dem Oomyceten aufgenommen wurden, jedoch die Transkription in einer zu geringen Anzahl für den Nachweis erfolgte.

In Anbetracht der Tatsache, dass der Ham34 Promotor ausschließlich in Arbeiten eingesetzt wurde, in denen ein qualitativer Nachweis durch Fluoreszenzmikroskopie möglich war (Hammer *et al.*, 2007; Ah-Fong und Judelson, 2011), sollte mit T7 ein anderer Promotor getestet werden. Dieser Promotor wurde bereits erfolgreich bei der Expression des *grapevine fanleaf nepovirus* in Weinpflanzen eingesetzt (Viry *et al.*, 1993). Analog zu den Arbeiten von Viry *et al.* (1993) sollte ebenfalls mit dem Grundgerüst eines pUC18 Plasmids gearbeitet werden. Der Wechsel des Vektors und des Promotors sollte die Transkription der viralen Sequenzen in den Fokus rücken, wogegen zuvor eher auf die Funktionalität des Promotors in Oomyceten geachtet wurde. Allerdings wurde der T7 Promotor bisher noch nicht in *P. halstedii* eingesetzt. Als Terminator sollte, wie in den Arbeiten von Viry *et al.* (1993), eine Polyadenylierung fungieren. Die so geplanten Vektoren konnten erfolgreich als pT7RDRPpA und pT7CPpA konstruiert werden.

Analog zu Viry *et al.* (1993), sollte die Transformation mittels Elektroporation getestet werden. Diese Methode wurde ebenfalls in den Arbeiten von Hammer *et al.* (2007) an *P. halstedii* getestet. Hierbei zeigte die Transformation von Sporangien eine Erfolgsquote von etwa 20%. Allerdings konnte das GFP nicht in den daraus freigesetzten Zoosporen nachgewiesen werden, woraus gefolgert wurde, dass entweder die Transformation die Keimung verhindert, oder die Plasmide nicht von den Zoosporen aufgenommen werden.

Aufgrund dieser Tatsache wurde entschieden die Elektroporation an bereits freigesetzten Zoosporen von *P. halstedii* durchzuführen.

Im Gegensatz zu den anderen Versuchen wurde die Transformation mittels Elektroporation in Zoosporen nur mit den beiden Plasmiden pT7RDRPpA und pT7CPpA durchgeführt. Bei den Auswertungen von 18 Proben in der PCR zeigten sich hierbei vier Proben deutlich positiv für Fragmente aus beiden Vektoren. Hierbei sind die Banden der PCR Produkte in etwa so stark, wie jene die aus der virushaltigen Kontrolle #631 erzeugt wurden. Es konnte hierbei ausgeschlossen werden, dass es sich um Verunreinigungen durch Plasmidrückstände handelt. Zwar zeigten einige der Kontrollen des nicht transformierten *P. halstedii* Stammes sehr leichte Banden in der entsprechenden Höhe, aber keine davon erreichte annähernd die Intensität der transformierten Proben. Auch der Vergleich dieser falsch positiven Kontrollen mit der virushaltigen Probe #631 zeigte einen deutlichen Unterschied. Auch zeigte die PCR für die Kontrollzoosporen (T-Ko), welche aus demselben Ansatz wie die transformierten Proben stammen, keine Amplifikate. Aus diesen Gründen kann eine Kontamination der Proben mit PhV ausgeschlossen werden. Die starke Amplifikation in den vier Proben legt daher die Aufnahme und Funktionalität der Vektoren nahe. Ob die hohe Anzahl an Amplifikaten auf die Aktivität des T7 Promotors oder eine möglicherweise aktive RdRp zurückzuführen ist, kann jedoch nicht unterschieden werden. Interessanterweise waren auch drei Proben vertreten, bei denen PCR Produkte in geringerer Anzahl gebildet wurden. Nur in einer dieser drei Proben konnten Fragmente aus beiden viralen Segmenten nachgewiesen werden. In den beiden anderen zeigte sich nur bei der PCR der RdRp eine Bande. Das hierbei keine einzelnen Banden des Hüllproteins zu sehen waren, könnte auf eine Aktivität der Polymerase hindeuten. Bei 5 Proben wurden die sporulierenden Blattscheiben in zwei bis drei Abschnitte unterteilt und mehrfach getestet. Hierbei zeigte sich jedoch, dass keine der Proben doppelt positiv getestet werden konnte. Dies könnte die Folge von mehrfach Infektionen der Blattscheibe durch *P. halstedii* sein. Hierbei könnten transformierte und nicht transformierte Zoosporen das Blatt gemeinsam infiziert haben und sich in der Zeit von 12 – 14 Tagen nicht miteinander vermischt haben. Da Folgegenerationen zwar von derselben Blattscheibe, jedoch nicht vom direkt getesteten Abschnitt hergestellt wurden, würde dies auch erklären warum in den F2 Generationen von positiv getesteten Proben kein positiver Nachweis erfolgte.

Abschließend lässt sich aus den Ergebnissen bisher nicht beurteilen, ob es zu einer stabilen oder transienten Transformation durch die Verwendung von pT7RDRPpA und

pT7CPpA in der Elektroporation kommt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine Aufnahme von Vektoren durch die Elektroporation in Zoosporen möglich ist. Ebenfalls wurde gezeigt, dass der T7 Promotor auch in *P. halstedii* genutzt werden kann. Hierauf aufbauend sind jedoch weitere Experimente notwendig um eine Expression von PhV in dem *P. halstedii* zu erreichen.

Epilog und Ausblick

In dieser Arbeit konnte das Wissen um das *Plasmopara halstedii* Virus (PhV) in vielen Aspekten erweitert und präzisiert werden. So zeigten die phylogenetischen Berechnungen, dass PhV weder in die Familie der Tombus- noch die der Nodaviren einzuordnen ist. Viel eher bildet das Virus gemeinsam mit SMV-A eine eigene phylogenetische Gruppe. Hierbei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese Gruppe eine phylogenetische Verbindung der beiden großen Virusfamilien herstellt. Ob diese phylogenetische Gruppe durch horizontalen Gentransfer zwischen Pflanzen- und Insektenviren hervorgegangen ist, sollte in Zukunft überdacht und diskutiert werden. Anhaltspunkte für diese Möglichkeit bieten hierbei die Arbeiten von Stedman (2013) sowie Koonin und Dolja (2014). In dieser Arbeit wurde auch festgestellt, dass zurzeit keine weiteren nahen Verwandten dieser beiden Viren bekannt sind.

Die Untersuchungen zur genetischen Vielfalt sowie der weltweiten Verbreitung von PhV zeigten, dass das Virus in Proben aus 17 Ländern auf fünf Kontinenten verteilt über die letzten 40 Jahre aufzufinden ist. Hierbei konnte PhV in über 90% verschiedener *P. halstedii* Isolate nachgewiesen werden. Es zeigte sich dabei keine Korrelation zwischen dem geographischen Ursprung, dem Alter der Probe sowie der An- bzw. Abwesenheit des Virus. Die bestimmte genetische Diversität erwies sich über alle Proben als sehr gering. Bei 22 vollständig sequenzierten Proben aus 13 Ländern konnten SNPs an 18 Positionen nachgewiesen werden. Die genetischen Distanzen betrugen 0,001 für die RdRp und 0,002 für das Hüllprotein. Dies stellt somit die geringste bekannte Diversität bei RNA Viren dar. In diesen Versuchen wurden somit die bisherigen Ergebnisse von Heller-Dohmen *et al.* (2008, 2011) bestätigt und sinnvoll erweitert. Die hieraus resultierende Veröffentlichung stellt die erste Arbeit dieser Art für Oomyceten- und Mykoviren dar (Grasse und Spring, 2015).

Die Experimente zum Einfluss von PhV auf die Aggressivität und Pathogenität von *P. halstedii* zeigten, dass das Virus einen hypovirulenten Effekt auf den Oomyceten ausübt. Bei diesen Versuchen wurden isogene Stämme von *P. halstedii* mit PhV infiziert und Biotests an Sonnenblumen durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass PhV die Sporangienproduktion des Oomyceten um etwa 30% mindert und das Auftreten der ersten Sporulation sich durchschnittlich um einen Tag verlängert. Auch die Fähigkeit von *P. halstedii*, die Sonnenblume systemisch zu infizieren, wird durch das Virus um ein Drittel reduziert. Die

hierbei geschaffenen Techniken wie die Virusübertragung konnten als Grundlage für weitere Experimente genutzt werden. Die Übertragung von PhV in *P. halstedii* sollte auch weiterhin untersucht werden, da der Vorgang der aktiven Aufnahme von Mykoviren bisher nur einmal beobachtet wurde (Yu *et al.*, 2010). Hierbei können die Erkenntnisse von Bendel (2013) zur Induktion der Enzystierung von Zoosporen genutzt werden um den Zeitpunkt der Virusaufnahme zu präzisieren.

Bei Versuchen PhV durch aktive cDNA Klone in *P. halstedii* zu exprimieren, wurden zwei verschiedenen Vektoren und verschiedene Transformationssysteme miteinander kombiniert. Hierbei zeigte sich, dass die Elektroporation eine geeignete Methode zur Einbringung von Plasmiden in Zoosporen darstellt. Ebenso konnte dargestellt werden, dass der T7 Promotor in *P. halstedii* eine Transkriptionsaktivität aufweist. Allerdings zeigte sich dies nicht in Nachfolgegenerationen. Diese Erkenntnisse können Grundlagen zu weiteren Arbeiten zur Transformation von obligat biotrophen Oomyceten liefern. So wären, nach einer erfolgreichen Expression von PhV in *P. halstedii*, Techniken wie das Virus-induzierte-Gene-Silencing (VIGS) (Ratcliff *et al.*, 2001) möglich. Hierbei würde das virale Genom um kurze RNAi Abschnitte erweitert, welche die Expression bestimmter Gene in ihrem Zielorganismus unterdrücken. Diese Technik würde ein neuartiges Instrument für die Transformation und Erforschung obligat biotropher Zielorganismen bereitstellen.

Zusammenfassung

Das *Plasmopara halstedii* Virus (PhV) ist ein ss(+)RNA Virus mit zwei RNA Strängen, welches ausschließlich in seinem Wirt *Plasmopara halstedii*, dem Erreger des Falschen Mehltaus der Sonnenblume, vorkommt. Die beiden RNA Stränge kodieren zum einen für eine RNA abhängige RNA Polymerase (RdRp) und zum anderen für ein Hüllprotein (CP). Die bisherige phylogenetische Einordnung zeigte eine Verwandtschaft der RdRp mit der Familie der Nodaviren und des CP mit der Familie der Tombusviren. Berechnungen mit den kombinierten Sequenzen in dieser Arbeit legen die Einordnung in eine eigene Gruppierung, gemeinsam mit dem *Sclerophthora macrospora* Virus A, nahe, welche basal zu den beiden Virusfamilien liegt.

Untersuchungen zur genetischen Vielfalt sowie der weltweiten Verbreitung von PhV zeigten, dass das Virus in Proben aus 17 Ländern auf fünf Kontinenten verteilt über die letzten 40 Jahre, aufzufinden ist. Hierbei konnte PhV in über 90% der getesteten *P. halstedii* Isolate nachgewiesen werden. Es zeigte sich dabei keine Korrelation zwischen dem geographischen Ursprung, dem Alter der Probe sowie der An- bzw. Abwesenheit des Virus. Die genetische Diversität erwies sich über alle Proben als sehr gering. Bei 22 vollständig sequenzierten Proben aus 13 Ländern konnten SNPs an 18 Positionen nachgewiesen werden. Die genetischen Distanzen betrugen 0,001 für die RdRp und 0,002 für das Hüllprotein.

Experimente zum Einfluss von PhV auf die Aggressivität und Pathogenität von *P. halstedii* zeigten, dass das Virus einen hypovirulenten Effekt bewirkt. Bei diesen Versuchen wurden isogene Stämme von *P. halstedii* mit PhV infiziert und Biotests an Sonnenblumen durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass PhV die Sporangienproduktion des Oomyceten um etwa 30% mindert und das Auftreten der ersten Sporulation sich durchschnittlich um einen Tag verlängert. Auch die Fähigkeit von *P. halstedii*, die Sonnenblume systemisch zu infizieren, wird durch das Virus um ein Drittel reduziert.

Bei Versuchen, PhV durch aktive cDNA Klone in *P. halstedii* zu exprimieren, wurden zwei verschiedenen Vektoren und verschiedene Transformationssysteme miteinander kombiniert. Hierbei zeigte sich, dass die Elektroporation eine geeignete Methode zur Einbringung von Plasmiden in Zoosporen darstellt. Ebenso konnte dargestellt werden, dass der T7 Promotor in *P. halstedii* eine Transkriptionsaktivität aufweist. Allerdings zeigte sich dies nicht in Nachfolgenerationen. Daher wurden zwar PhV RNA Sequenzen gebildet, jedoch

entwickelte sich hieraus kein funktionelles Virus.

Conclusions

The *Plasmopara halstedii* Virus (PhV) is a ss(+)RNA virus with two segments. It occurs only in its host *Plasmopara halstedii*, the downy mildew pathogen of the sunflower. The two RNA strands encode for an RNA depending RNA Polymerase (RdRp) and a coat protein (CP), respectively. So far the phylogenetic analysis has shown similarities of the RdRp with the family of Nodaviruses while the CP seems to belong to the family of Tombusviruses. Phylogenetic comparison based on both sequences now suggest a new clade, containing PhV and the *Sclerophthora macrospora* Virus A, which is basal to both mentioned virus families.

Studies about diversity and the occurrence of PhV have shown that the virus existed in samples from 17 countries from five continents which were collected over the past 40 years. Its presence in more than 90% of these samples was documented. No correlation was found between the geographic origin and age of the samples, and presence or absence of PhV sequences. The calculated genetic diversity among all samples was surprisingly low. For 22 fully sequenced samples from 13 countries, only 18 SNP positions were reported. Genetic distances were extremely low with means of 0.001 for the RdRp and 0.002 for the CP.

Investigations of the influence of PhV on the aggressiveness and pathogenicity of *P. halstedii* have shown a hypovirulent effect of the virus. In this study, isogenic strains of the Oomycete were infected with PhV and used for a series of bioassays on sunflowers. The production of sporangia was lowered by ca. 30% in case of virus presence and the latent period, i.e. the day of the first observed sporulation, was delayed by one day. The potential for systemic infections of the sunflower was also lowered by one third when PhV was present.

Experiments to generate PhV by means of active cDNA clones in *P. halstedii* were performed with two different vectors and three transformation methods. It was shown that electroporation techniques were useful to transport plasmids into the zoospores of *P. halstedii* and that the T7 promotor was able to start the transcription. The following generation of sporangia, however, lacked these sequences. This indicates that there was a transient transformation which produced PhV RNA sequences, but these sequences were unable to rebuild the virus itself.

Literatur

Ahola T und Karlin DG (2015). Sequence analysis reveals a conserved extension in the capping enzyme of the alphavirus supergroup, and a homologous domain in nodaviruses. *Biology Direct* 10: 16.

Ah-Fong AMV und Judelson HS (2011). Vectors for fluorescent protein tagging in *Phytophthora*: tools for functional genomics and cell biology. *Fungal Biology* 115: 882-890.

Barr JN und Fearn R (2010). How RNA viruses maintain their genome integrity. *Journal of General Virology* 91: 1373-1387.

Buck KW (1986). Fungal virology – An overview. In: Buck, K.W. (ed.) *Fungal Viruses*. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, p. 2-84.

Buck K (1998). Molecular variability of viruses of fungi. In: Bridge PD, Couteaudier Y, Clackson JM (eds), *Molecular Variability of Fungal Pathogens*, CAB International, Wallingford, UK, pp 53–72.

Bendel N (2013). Optimierung der Versuchsbedingungen zur Erzeugung der Einzelsporeninfektionen bei *Plasmopara viticola*. BSc, Universität Hohenheim

Cai G, Myers K, Hillman BI, Fry WE (2009). A novel virus of the late blight pathogen, *Phytophthora infestans*, with two RNA segments and a supergroup 1 RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 392: 52-61.

- Cai G, Myers K, Fry WE, Hillman BI (2012).** A member of the virus family Narnaviridae from the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans*. Archives of Virology 157: 165-169.
- Cai G, Krychiw JF, Myers K, Fry WE, Hillman BI (2013).** A new virus from the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans* with an 8 kb ds RNA genome: The sixth member of a proposed new virus genus. Virology 435: 341-349.
- Chaure P, Gurr SJ, Spanu P (2000).** Stable transformation of *Erysiphe graminis*, an obligate biotrophic pathogen of barley. Nature Biotechnology 18: 205-207.
- Cohen Y, Sackston WE (1973).** Factors affecting infection of sunflower by *Plasmopara halstedii*. Canadian Journal of Botany 51: 15-22.
- Dickson AM und Wilusz J (2011).** Strategies for viral RNA stability: live long and prosper. Trends in Genetics 27: 286-293.
- Diemer GS und Stedman KM (2012).** A Novel Virus Genome Discovered in an Extreme Environment Suggests Recombination between Unrelated Groups of RNA and DNA Viruses. Biology Direct 7: 13.
- Dubresson R, Kravchuk Z, Neuhaus JM, Mauch-Mani B. (2008).** Optimisation and Comparison of transient expression methods to express the green fluorescent protein in the obligate biotrophic oomycete *Plasmopara viticola*. Vitis 47(4): 235–240.
- Farlow WG (1883).** Note on some species in the third and eleventh centuries of Ellis's North American Fungi. Proceedings of the American Academy of Arts and Science 18: 71–73.

- Fraile A, Escribe F, Aranda MA, Malpica JM, Gibbs AJ, García-Arenal F (1997).** A century of tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. *Journal of Virology* 71: 8316-8320.
- García-Arenal F, Fraile A, Malpica JM (2001).** Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* 39: 157-186.
- Grasse W, Zipper R, Totska M, Spring O (2013).** *Plasmopara halstedii* virus causes hypovirulence in *Plasmopara halstedii*, the downy mildew pathogen of the sunflower. *Fungal Genetics and Biology* 57: 42-47.
- Grasse W und Spring O (2015).** Occurrence and genetic diversity of *Plasmopara halstedii* virus in sunflower downy mildew populations of the world. *Fungal Biology*. 119: 170-8.
- Greninger AL, deRisi JL (2015).** Draft Genome Sequence of Tombunodavirus UC1. *Genome Announcements* 3(4): e00655-15.
- Gulya TJ, Freeman TP, Mayhew DE (1990).** Virus-like Particles in *Plasmopara halstedii*, Sunflower Downy Mildew. *Phytopathology* 80: 1032.
- Gulya T, Rashid KY, Masirevic SM (1997).** Sunflower diseases. In: Schneider AA (eds), *Sunflower Technology and Production*, American Society of Agronomy, Madison, pp 263–380.
- Gulya TJ (2007).** Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. In: Lebeda A, Spencer-Phillips PTN (eds), *Advances in Downy Mildew Research*, Volume 3 Palacky University and JOLA Publishers, Olomouc, CZ, pp 121–134.

- Hall AT (1999).** Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Hammer TR, Thines M, Spring O (2007).** Transient expression of gfp in the obligate biotrophic Oomycete *Plasmopara halstedii* using electroporation and a mechanoperforation method. Plant Pathology 56: 177-182.
- Han K und Byun Y (2003).** PseudoViewer2: visualization of RNA pseudoknots of any type. Nucleic Acids Research 31: 3432-3440.
- Heller A, Rozynek B, Spring O (1997).** Cytological and physiological reasons for the latent type of infection in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. Journal of Phytopathology. 145: 441-445.
- Heller-Dohmen M, Göpfert JC, Hammerschmidt R, Spring O (2008).** Different pathotypes of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii* all contain isometric virions. Molecular Plant Pathology 9: 777-786.
- Heller-Dohmen M, Göpfert JC, Pfannenstiel J, Spring O (2011).** The nucleotide sequence and genome organization of *Plasmopara halstedii* virus. Virology Journal 8: 123-131.
- Hofacker IL, Fontana W, Stadler PF, Bonhoeffer S, Tacker M, Schuster P (1994).** Fast Folding and Comparison of RNA Secondary Structures. Monatshefte für Chemie 125: 167-188.
- Jiang Y, Zhang T, Luo C, Jiang D, Li G, Li Q, Hsiang T, Huang J (2015).** Prevalence and diversity of mycoviruses infecting the plant pathogen *Ustilaginoidea virens*. Virus Research 195: 47-56.

- Koonin EV und Dolja VV (2014).** Virus World as an Evolutionary Network of Viruses and Capsidless Selfish Elements. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 78(2): 278–303.
- Krupovic M, Zhi N, Li J, Hu G, Koonin EV, Wong S, Shevchenko S, Zhao K, Young NS (2015).** Multiple Layers of Chimerism in a Single-Stranded DNA Virus Discovered by Deep Sequencing. *Genome Biology and Evolution* 7(4): 993 – 1001.
- Lawrence GJ, Dodds PN, Ellis JG (2010).** Transformation of the flax rust fungus, *Melampsora lini*: selection via silencing of an avirulence gene. *Plant Journal* 61: 364-369.
- Malmstrom CM, Shu R, Linton EW, Newton LA, Cook MA (2007).** Barley yellow dwarf viruses (BYDVs) preserved in herbarium specimens illuminate historical disease ecology of invasive and native grasses. *Journal of Ecology* 95: 1153-1166.
- Nishimura M (1922).** Studies in *Plasmopara halstedii*. *Journal of the College of Agriculture, Hokkaido Imperial University*. 11: 185-210.
- Nouri S, Arevalo R, Falk BW, Groves RL (2014).** Genetic Structure and Molecular Variability of Cucumber mosaic virus Isolates in the United States. *PLoS ONE* 9: e96582.
- Nuss D (2005).** Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal plant interface. *Nature reviews Microbiology* 8: 632-642.
- Pearson MN, Beever RE, Boine B, Arthur K (2009).** Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 10: 115-128.
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC (2001).** Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal* 25(2): 237-245.

- Roux S, Enault F, Bronner G, Vaulot D, Forterre P, Kropovic M (2013).** Chimeric viruses blur the borders between the major groups of eukaryotic single-stranded DNA viruses. *Nature Communications* 4: 2700.
- Rozynek B und Spring O (2000).** Pathotypes of sunflower in Southern Germany. *Helia* 23: 27-34.
- Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, deRisi JL (2011).** Temporal Analysis of the Honey Bee Microbiome Reveals four novel Viruses and seasonal prevalence of known Viruses, Nosema, and Crithidia. *PLoS ONE* 6(6): e20656.
- Sackston WE (1981).** Downy mildew of sunflower. In: Spencer DM (eds), *The downy mildews*, Academic, pp 545–575.
- Sakr N, Ducher M, Tourvieille J, Walser P, Vear F, Tourvieille De Labrouhe D (2009).** A method to measure aggressiveness of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). *Journal of Phytopathology* 157: 133–136.
- Smith O, Clapham A, Rose P, Liu Y, Wang J, Allaby RG (2014).** A complete ancient RNA genome: identification, reconstruction and evolutionary history of archeological Barley Stripe Mosaic Virus. *Scientific Reports* 4: 4003.
- Spring O, Rozynek B, Zipper R (1997).** Leaf disk inoculation - a useful tool for selecting infections of sunflower downy mildew at low inoculum concentration, but inappropriate to pathotype characterization. *Journal of Phytopathology*. 145: 189–191.
- Spring O, Rozynek B, Zipper R (1998).** Single spore infections with sunflower downy mildew. *Journal of Phytopathology*. 146: 577–579.

- Stedman K (2013).** Mechanisms for RNA capture by ssDNA viruses: Grand Theft RNA!
Journal of Molecular Evolution. 76(6): 359-364.
- Tourvieille LD, Gulya TJ, Masirevic S, Penaud A, Rashid KY, Viranyi F (2000).** New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). Proceedings of the 15th International Sunflower Conference. Toulouse, France. 2: 61-65.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011).** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.
- Tooley PW, Hewings AD, Falkenstein KF (1998).** Detection of Double-Stranded RNA in *Phytophthora infestans*. Phytopathology. 79: 470-474.
- Vainio EJ, Hakanpää J, Dai Y-C, Hansen E, Korhonen K, Hantula J (2011).** Species of Heterobasidion host a diverse pool of partitiviruses with global distribution and interspecies transmission. Fungal Biology 115: 1234-1243.
- Viranyi F und Spring O (2011).** Advances in sunflower downy mildew research. European Journal of Plant Pathology 129: 207-220.
- Viry M, Serghini MA, Hans F, Ritzenthaler C, Pinck M, Pinck L (1993).** Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine fanleaf nepovirus RNAs. Journal of General Virology 74: 169-174.

Yokoi T, Takemoto Y, Suzuki M, Yamashita S, Hibi T (1999). The nucleotide sequence and genome organization of *Sclerophthora macrospora* Virus B. Virology 264: 344-349.

Yokoi T, Yamashita S, Hibi T (2003). The nucleotide sequence and genome organization of *Sclerophthora macrospora* Virus A. Virology 311: 394-399.

Zuker M und Stiegler P (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamic and auxiliary information. Nucleic Acid Research 9: 133-148.

Yu X, Li B, Fu Y, Jiang D, Ghabrial SA, Li G, Peng Y, Xie J, Cheng J, Huang J, Yib X (2010). A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 8387-8292.

Abkürzungsverzeichnis

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
bt.	Bootstrap
cDNA	komplementäre DNA
CP	Hüllprotein
Da	Dalton
DNase	Desoxyribonuklease
dsRNA	doppelsträngige RNA
GFP	Green fluorescent protein (Grüne fluoreszierendes Protein)
GOS	Global Ocean Sequences
ff	folgende
kb	Kilobasen
MCS	Multiple cloning site (verschiedene Restriktionsschnittstellen in Folge)
NCBI	National Center for Biotechnological Information
nt.	Nukleotid
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PhV	<i>Plasmopara halstedii</i> Virus
RdRp	RNA depending RNA polymerase (RNA abhängige RNA Polymerase)
SMV-A	<i>Sclerophthora macrospora</i> Virus A
ssRNA	einzelsträngige RNA
ü.N.	über Nacht

Material

Alle verwendeten Chemikalien und biologischen Arbeitsstoffe wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Fermentas GmbH (St. Leon Rot) einem Teil von ThermoFisher Scientific (USA), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bzw. von der Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. Die verwendeten Verbrauchsmaterialien stammten von der Firma Sarstedt AG & Co (Nümbrecht).

Danksagung

Herr Professor Spring, Ihnen möchte ich an dieser Stelle als erstes für die Überlassung dieses interessanten Themas danken. Besonders hervorheben möchte ich die Freiräume in der wissenschaftlichen Forschung und die damit verbundenen Möglichkeiten eigenen Ideen und Experimenten nachzugehen. Auch danke ich Ihnen für die vielen anregenden wissenschaftlichen und politischen Diskussionen, sowie viele gute Vorschläge während der Promotion und vor allem während der Schreibphasen.

Herrn Professor Pfitzner danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Deutsche Forschungsgemeinschaft danke ich für das Projekt SP292/21-2 mit dem die Forschung in den Kapiteln 2 und 3 finanziert wurde.

Reinhard, dir danke ich für viele Besuche des Institutsbalkons. Ganz besonders danke ich dir aber für die vielen Hilfestellungen im Umgang mit den Versuchspflanzen und für den Kaffee an jedem morgen.

Der AG Spring: Katharina, Fabian, Max, Javier, Sukanya, Evelyn, Anna und Bärbel danke ich für die tolle Aufnahme in ein super Team. Ich danke euch für viele interessante Diskussion und eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre in der jeder jedem hilft. Auch danke ich allen Bachelor- und Masterstudenten die zu der guten Stimmung in der Arbeitsgruppe beigetragen haben.

Liebe Isabel, ich danke dir für das Verständnis und den Rückhalt während der ganzen Zeit der Promotion. Auch allen anderen aus meiner Familie ein großes Danke für die Unterstützung.

Anhang

pT7RDRPpA

tcgcgcgtttcggatgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacgggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggag
cagacaagcccgtcagggcgcgctcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgag
agtgcaccatatgcgggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaa
ctgttgggaagggcgatcgggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagtgggta
acgccagggttttccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagcttgcctgcaggtcgactctagaggatcCCC
GGGTAATACGACTCACTATAGtatcacgcagagtacactatgtcatttggactttgttttcgcgttacacacttatggtt
tcatctgtaagtgtgggtggccttgcgactccatggcggttatgtcatgtcgaagacgctaaacgaattcggagaggagtggtctatagaac
cagcgaatctccgatccctgtttggggacatacaggttggtgaatttaaaagacaacctggacatccccatggcgctgcggctgcagac
cgtagcgcgggttcgtacttcattgagagggtcggcagggtggtgtagagaagtgggtctactatcagtcagcaactccgacctgag
aaacggccgaagtggagctagagagtggtagtggaaggtgcttatgtgcagccgaaattgttctctttgagttcagttcaatggt
gtcgattattgatgtgatcaatatgtcgacatgaactggttctaacggaacattttgtccgggtgtgttatacactttccagccgagcgat
gcgctgctgaccgtggggagtagtactatacactcaactcaaacgaggttaattaccgtgttgcggaggtgcagagtatgtccac
aaggtgtggaactacgacactgatgtcgtaacgactacccgggtattcgcgggaaagtcgtggaccaaattggaggaaactggatccatt
tgtcacttgtgcctatttgggtgacaagagacagatggatgcagaccaccaataattggattatttccagttaaagcgggtggttggcccc
tagcccttcttggccgatgtctcaaaggcagacccttcccgggttaaaatcgtgagaggggatttcttaggctgttgaatcatggtcata
atggaatgaccatttcaaccgtaaggtgagtcgccactgtgtggcacgattaccgcccgagaagatgctgcttagcgctccctagca
cgtacaaccaagagtgggttaactcttatgcatgttaagaagttaatgcctgatgatacacttgggtgctacgtatgtttatgaataccattcg
cagaaactaccagaagcaactgttgtttcttatagtgagcgaagaaagatgggtgtcgtggatatcaattcaaccgatgaactacgac
ccactggcgaagcagtcgcttgtttcttatgtcaccgataattgatggtgggttttgtcccgcacatgactgaggacaatgtgaaacaggc
aattgtggggcgcatagtagatgtgaagagtgttactacaatggaccgtttcttgatgaaaaccattgatgaattcgcgcacttgttataaa
gagtgtggcggtacagcacaatctctgttaccatgtggttatgaagatgtgtatgaacgtcaggatagacctacacaacgtaggatctc
gaacaagctgaattcgtttaggtaagaatataggaaagaacttcctaagcgtgaagcttatggtaaattgtctgatccccgtattattacc
acaatcgaagggtcaagaaagatcggtagtgcacatttatatggttatacggatgaagttatcaaacaccaacagtggtatgcatttg
gtaaaacacccgtggatgtatcatgcatgtatcgagaattgttcaactgccagaacaattagtaacactgattttcccgcttgatggaa
cgataagcgaagtagttagagcgcttgagcgtaggtgcataatttggcttccgacctgaatacacgaatgaacttcttgagttgtacgt
gatcagtgccgggattgactgctatataacagtcattgatgagtcagtcactataactcaggattagcgcgactctctggatctccagag
actagtaccttcaactactaactaacgcttctgtgcttatctaggcttccgatcaactagattgtcttccggaggccatatggacgccaca
gaagcgtattcacgtctcggcatgtacggaggtgatgatggaattactccagatttgcacctaagcgtgtatatgcgcgccgctcgaaag
ttaggctctaaattagacttgcaaccggttgagagggggaacgtgggtgtcaaatgttgaaccggcttatggaccgaggtctggttg
gtgacaccacgagcatgtgtgatccggttcgggctttatccaaattccatttgtgtgtgaatatggatgctcggaccacaaatatccagaa
actgatggagaaatcctatgcttattaccttagtgataagaatactccagtttgggacagtttgttctgcagtcgttccacacctccggca
agatatcaatttaagaatatccatggaatttgaacgctcagatgaagcaagcgtacaatatccaatgggtgagattactgattgtggaa
gtgaggtagcccctgattggatggttgaggagttcaaccatgcatgtcctaatttccgcatgatactttaataacctggatttcagagttag
gtaatgactttacgttatacctgtcaccaccagttaacatgctagaatctctagaccagttacgagtcatagcgtggttagttgatggtgata
tcgtcaatcccgttccgagcttaaatgacacaccaagcgtgggtgctccgccgaacagaaggcactactgttcacgaaggcgtaatga
acggaagaggaggagggagccggcggtgtacaaaccgaggaagccccggctatgagaagaattagccaatgtcctaagtatccaa
AAAAAAAAAAAAAAAAAGAGCTCgaattcgtaatcatggtcatagctgttccctgtgtgaaattgttatccg

ctcacaattccacacaacatacagaccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaagtgtgagtaactcacattaattgcgttg
cgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggttgcgta
ttggggtgcttccgcttctcgtcactgactcgctgcgtcgggtcgttcgggtgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtta
atacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaagg
ccgctgtgctggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagagggtggcgaacccgac
aggactataaagataaccaggcggtttcccctggaagctccctcgtgcgtctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgc
ctttctcccttcgggaagcgtggcggttttctcatagctcacgctgttaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtg
tgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgcca
ctggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgagggtatgtaggggtgctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggct
acactagaaggacagtatttggtatctgcgctcgtgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaaa
ccaccgctggtagcgggtgggtttttgttgcaggcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttctacg
gggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaatta
aaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtggagcacctatctcagcgat
ctgtctatttctgtcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggaggggttaccatctggccccagtgctgcaa
tgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaacagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcct
gcaactttatccgctccatccagcttattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcggcagttaatagtttgcgcaacgttgtgccc
attgctacaggcatcgtgggtgcacgctcgtcgttgggtatggcttcattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccc
ccatgttggtgcaaaaaagcgggttagctcctcggctcctcagatcgttgtcagaagtaagttggccgagtggttatcactcatggttatggca
gcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgc
ggcgaccgagttgctcttgcggcggtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatattggaaaacgt
tcttcggggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcagatgaaccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttt
tactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggggcgacacggaaatgttgaat
actcatactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaaca
ataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgta
tcacgaggccctttcgtc

pT7CPpA

tcgcgcgtttcgggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctccccggagacgggtcacagcttgtctgtaagcgggatgccgggag
cagacaagcccgtcagggcgcgctcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgag
agtgcaccatatgcgggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaa
ctgttgggaaggcgatcgggtcggggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtta
acgccagggtttccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccAAGCTTTAATAACGACTCACTATAGg
gtttaaccaacatgggtgttaaagtgcgttaaacagccccgacgcaggaaaacgaggaagaataaccccagccgtccgaaaaagac
tgaggttaccgacttggacaagctctccgctcgttagggcgactagcaggtggatcattaggtgccatagtaggtatgccgggagcg
ggctctgcttatggaaacagcctaggagccgcattgagtaagtggtgggtagtgagactacacagtcgaatcaaacagcattgtcca
acgttagccttcgggctagtgtactctgtaccccttatgcataaggagtcacagactgtcacagtgagacacaaagagtatctcgagaga
tcaagggtatcgtattcacagtgaatcgtacattaccattaatcctgggtgactccaaacatttcttgggtcagtggaatcgagg
gagattccaagagtacaagatccgaggtatgggtgtatcattacattcccacaagtgggaatgcaatcgcgctgcacaaacgccgcgttg
gaaccgttatgattagcacgtcataccgttccactgatgtatcaccggcttcaaggttgagctcctgaatgaatattgttcggtagagtgtg
ctccctcagaacagtttgcacccattgaatgtgatccaaagagaaccccttcaatattcagtatgttcgtactactagcgtgcctact
gaggattcacgtttactgtatgatctaggtgtaacgacagttgcaacctctggccaacagatagacggaaagggttttaggggacctctgg

gtaacgtatgagattgacctcaagaaacccatagtagctccaacgtaactcaattgtacgatgcagtttcgataacctttactgggtgtttt
gccaccactaattgggtatccaacagaactgtctcggtttggcggattggaagtagtggcttctgttaagaccatcactttcccgaaggaa
ccgtaggaaacttcttgattctgaccagatggacagaaacgggaggtttcagtagcttttagtacgactggggccgttacctacactaattg
tggtgccgtgggtaacatagctccaggaggtataccaaattggacctgaaccagccgtcagccgggtggatctgtaaagggtctatacc
acgccactggcggtatcatttctgatccacagctacaagctactgtagtcatgccgacaatcacgtatacaggcaacgtgactgccgtcta
cctcgtcattactccgcttgcccagtaagcgtagcagttacgtcgccgtttattgtgtgtgtttcgtacatatcgagtgggtttgcacaat
agttgccgtttctggttaaggtagtccaggagctagcgctgcaaacttacatatgcttgcttacacgttgattttaggtcgattaactgttttc
cgtgtagaagaaatcccgctctgggggacgtgccctcacccctcataatggttgggggagaccgcataaggcgaAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGGTACCgagctcgaattcgtaatcatgggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcac
aattccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaagtagtgagtaactcacattaattgcgttgcgct
cactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaaacgcgcgggggagaggcggtttgcgtattgg
gcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtataac
gggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccg
cgttgctggcggttttccataggctccccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacagg
actataaagataccaggcggtttccccctggaagctccctcgtcgcctcctgttccgaccctgccgcttaccggataacctgtccgcttt
ctccccctgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgc
acgaacccccgttcagcccagcgctgcgccttatccggttaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactg
gcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgtacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctaca
ctagaaggacagattttgggtatctcgcctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaacaaacca
ccgctggtagcggtgggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttacgggg
tctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttgggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatcctttaaattaa
tgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttgggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgc
tatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggccttaccatctggccccagtgctgcaatgata
ccgcgagaccacgctcacgggtccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaa
ctttatccgctccatccagcttattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgaacgttggtgccattgc
tacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttgggtatgggttcattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatg
ttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgagtggttatcactcatggttatggcagcact
gcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcg
accgagttgctcttgcccggcgtaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatattggaaaacgttcttc
ggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgtatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactt
tcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacagggaaggcaaaatgccgaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgttgaatactc
atactcttcttttcaatattattgaagcatttatcaggggtattgtctcatgagcggatacatatttgatgtatttagaaaaataaacaatag
gggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgatcac
gaggccctttcgtc

Curriculum vitae

Name	Wolfgang Grasse
Geburtsdatum	7. April 1983, in Stuttgart Bad Cannstatt
Nationalität	deutsch
Familienstand	Verheiratet, keine Kinder
Akademischer Titel	Diplom Biologe, technisch orientiert

Akademischer Werdegang

2003 – 10/2010	Universität Stuttgart, Studium der technischen Biologie Schwerpunkt: Industrielle Genetik
5/2009 – 8/2010	Diplomarbeit am Robert Koch-Institut, NG2: Neuartige Zoonosen
Seit 2/2011	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universität Hohenheim im Institut für Botanik mit Ziel der Promotion

Wissenschaftliche Arbeiten

Klöppel A., Grasse W., Brümmer F., Morlock G. (2008) HPTLC coupled with bioluminescence and mass spectrometry for bioactivity-based analysis of secondary metabolites in marine sponges. *Journal of Planar Chromatography*. 21(6): 431 - 436

Marklewitz M., Handrick S., Grasse W., Kurth A., Lukashev A., Drosten C., Ellerbrok H., Leendertz F. H., Pauli G., Junglen S. (2011) Gouléako Virus isolated from west African Mosquitoes constitutes a proposed novel genus in the family Bunyaviridae. *Journal of Virology*. 85(17): 9227 – 9234

Grasse W., Zipper R., Totska M., Spring O. (2013) *Plasmopara halstedii* virus causes hypovirulence in *Plasmopara halstedii*, the downy mildew pathogen of the sunflower. *Fungal Genetics and Biology*. 57: 42 – 47

Grasse W., Spring O. (2015) Occurrence and genetic diversity of *Plasmopara halstedii* virus in sunflower downy mildew populations of the world. *Fungal Biology*. 119: 170 - 178.

Vorträge und Poster

Grasse W., Spring O. (2012) Effects of the mycovirus PhV on the infectivity of *Plasmopara halstedii*, the downy mildew pathogen of sunflower. Tagung der DPG AK Mykologie und Wirt-Parasit-Interaktion (Tagungsvortrag)

Grasse W., Spring O. (2013) Worldwide occurrence and genetic variation of the mycovirus PhV in field isolates of *Plasmopara halstedii*, the downy mildew pathogen of sunflower. Tagung der DPG AK Mykologie und Wirt-Parasit-Interaktion (Poster)

Grasse W. (2015) Occurrence, diversity and transmission of the mycovirus PhV and effects on its host *Plasmopara halstedii*, the downy mildew of sunflower. Universität Hamburg (Einladungsvortrag)

Lehre

Molekular Biologie für Lehrer (PH Ludwigsburg) 2012

Experimentelle Botanik (Praktikum, 2 SWS) 2013, 2014 und 2015

Mikroskopische Übungen für Agrarwissenschaftler (Praktikum, 2 SWS) 2014

Mitbetreute Arbeiten

Maria Totska, B.Sc. (2012) Auswirkungen des Ph-Virus auf die Infektion der Sonneblume durch den Oomyceten *Plasmopara halstedii*.

Stefanie König, B.Sc. (2013) Konstruktion von Expressionsplasmiden für das *Plasmopara halstedii* Virus und Transformationsversuche

Zusatzqualifikationen

2014/2 Erwerb des Projektleiterscheins gem. §15 GenTSV