



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Fachgebiet Obstbau

Nutzung der Hypersensibilitätsresistenz der
Europäischen Pflaume (*Prunus domestica* L.) gegenüber dem
Scharkavirus (*Plum pox virus*) zur Einschränkung der
Virusverbreitung

Louisa Mühlberger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. B. Poppenberger-Sieberer
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. D. Treutter
2. Univ.-Prof. Dr. W. Oßwald

Die Dissertation wurde am 16.07.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.11.2013 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS..... III

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... VII

1. Einleitung	1
1.1. Die Bedeutung der Scharkavirose für den Anbau der Europäischen Pflaume (<i>Prunus domestica</i> L.).....	1
1.2. Die Scharkavirose.....	3
1.3. Strategien zur Minimierung der Schäden durch die Scharka-krankheit.....	6
1.3.1. Züchtung resistenter Sorten.....	6
1.3.1.1. Quantitative Resistenz.....	8
1.3.1.2. Hypersensibilitätsresistenz.....	8
1.3.2. Züchtung fruchtoleranter Sorten.....	11
1.3.3. Bekämpfung der Vektoren.....	12
1.3.4. Gesundes, zertifiziertes Pflanzmaterial.....	12
1.3.5. Rodung.....	13
1.4. Ziel der Arbeit.....	14
2. Untersuchung von SSR Markern auf Korrelation mit der Hypersensibilitätsresistenz der Europäischen Pflaume	17
2.1. Einleitung.....	17
2.1.1. Molekulare Marker.....	18
2.1.2. Marker-Analysen bei der Art <i>Prunus domestica</i> L.....	19
2.1.3. Vorgehensweise und Ziel der Arbeiten.....	20
2.2. Material und Methoden.....	22
2.2.1. Verwendete Pflanzen.....	22
2.2.2. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	24
2.2.3. DNA-Extraktion.....	25
2.2.4. SSR Marker-Analyse.....	26
2.2.4.1. Auswahl und Prüfen der SSR Marker.....	26
2.2.4.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	28
2.3. Ergebnisse.....	30
2.4. Diskussion.....	34
2.5. Zusammenfassung und Bewertung.....	37
3. Untersuchung einzelner PPV-Genomabschnitte hinsichtlich des Auslösers der hypersensiblen Reaktion bei der Europäischen Pflaume	39
3.1. Einleitung.....	39
3.2. Material und Methoden.....	41
3.2.1. Verwendete Pflanzen.....	41
3.2.2. PPV-cDNA-Klone.....	41
3.2.3. Methoden zur Infektion von <i>in vitro</i> kultivierten Pflanzen.....	43
3.2.3.1. Biolistische Inokulation.....	43
3.2.3.2. In-vitro-Veredlung.....	45
3.2.4. Virusnachweis mittels ELISA.....	46
3.2.5. Virusnachweis mittels GFP-Expimierung.....	47
3.3. Ergebnisse.....	48

3.3.1.	Biolistische Inokulation.....	48
3.3.2.	In-vitro-Veredlung	49
3.3.3.	Virusnachweis mittels GFP-Expression	49
3.3.4.	Inokulation von In-vitro-Pflanzen mit verschiedenen PPV-cDNA-Klonen.....	51
3.4.	Diskussion	53
3.4.1.	Entwicklung der Inokulationsmethode.....	53
3.4.2.	Inokulation von hypersensiblen und anfälligen Genotypen mit Gensequenz-veränderten cDNA-Klonen.....	54
3.4.3.	Stabilität der Hypersensibilitätsresistenz.....	57
3.5.	Zusammenfassung und weitere Vorgehensweise	58
4.	Untersuchung der Einsatzmöglichkeiten von hypersensiblen Unterlagen	59
4.1.	Einleitung.....	59
4.2.	Material und Methoden	60
4.2.1.	Veredlungs- und Inokulationsversuche unter Gewächshausbedingungen.....	60
4.2.1.1.	Verhalten von PPV-infizierten Sorten bei Veredlung auf hypersensible Unterlagen .	60
4.2.1.2.	Verhalten von mehrjährigen, hypersensiblen Pflanzen bei Inokulation mit PPV	67
4.2.2.	Versuche im Freiland unter natürlichem PPV-Infektionsdruck	70
4.2.3.	Histologische Untersuchung der Veredlungsstelle.....	72
4.3.	Ergebnisse.....	74
4.3.1.	Veredlungs- und Inokulationsversuche unter Gewächshausbedingungen.....	74
4.3.1.1.	Verhalten von PPV-infizierten Sorten bei Veredlung auf hypersensible Unterlagen .	74
4.3.1.2.	Verhalten von mehrjährigen, hypersensiblen Pflanzen bei Inokulation mit PPV	82
4.3.2.	Versuche im Freiland unter natürlichem PPV-Infektionsdruck	88
4.3.3.	Histologische Untersuchung der Veredlungsstelle.....	91
4.4.	Diskussion	93
4.4.1.	Veredlungsversuche unter Gewächshausbedingungen (Experimente 1 bis 4).....	93
4.4.1.1.	Durchführung der Experimente im Gewächshaus.....	93
4.4.1.2.	Verhalten von PPV-infizierten Sorten bei Veredlung auf hypersensible Unterlagen (Experimente 1 und 2)	95
4.4.1.3.	Verhalten von hypersensiblen Unterlagen bei Inokulation mit PPV (Experimente 1 bis 4)	97
4.4.2.	Verhalten von hypersensiblen Pflanzen bei Inokulation mit verschiedenen PPV-Stämmen und –Isolaten (Experimente 5 und 6)	98
4.4.3.	Verhalten von mehrjährigen, hypersensiblen Pflanzen bei Inokulation mit PPV (Experimente 6 und 7)	98
4.4.1.	Virusverbreitung in Pflanzen mit hypersensiblen Veredlungspartner (Experiment 8)....	99
4.4.2.	Versuche im Freiland unter natürlichem PPV-Infektionsdruck (Experimente 9 und 10)....	101
4.4.3.	Histologische Untersuchung der Veredlungsstelle.....	102
4.5.	Zusammenfassung	104
5.	Zusammenfassung	105
6.	Summary	109
	QUELLENVERZEICHNIS	111
	TABELLENVERZEICHNIS	119

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	120
ANHANG	121
VERÖFFENTLICHUNGEN	125
DANKSAGUNG	126
LEBENS LAUF	127

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Verzeichnis der verwendeten Einheiten und Abkürzungen

°C	Grad Celsius (Temperatur)	HEX	Hexachlorfluorescein
ACN	Astrablau-Chrysoidin- Neufuchsin	HI	Hypersensibilitätsindex
AFLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i>	Hi-Di	<i>highly deionized</i>
APS	Ammoniumpersulfat	HK	Hypersensibilitätsklasse
ATP	Adenosintri-phosphat	H ₂ O	Wasser
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>	HR	hypersensible Reaktion
bp	<i>basepair(s)</i> (Basenpaar(e))	IgG	Immunglobulin G
BSA	<i>bulk(ed) segregant analysis</i>	inHg	<i>inch of mercury</i> , Maßeinheit für Druck
BSA	Rinderserumalbumin	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalacto- pyranosid
CaCl ₂	Calciumchlorid	KCl	Kaliumchlorid
cDNA	<i>complementary DNA</i>	l	Liter (Volumen)
CTAB	Hexadecyltrimethyl- Ammoniumbromid	LAMP	<i>loop-mediated isothermal amplification</i>
Da	Dalton	LG	<i>linkage group</i>
DAS-ELISA	<i>double antibody sandwich</i> – ELISA	m	Meter (Länge)
DEPC	Diethylpyrocarbonat	M	molare Konzentration (mol/l)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
dNTPs	Desoxyribonukleosid- triphosphate	min	Minute(n) (Zeit)
dpi	<i>days post infection</i>	mol	Mol (Stoffmenge)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NaCl	Natriumchlorid
ELISA	<i>enzyme-linked immuno(ad)sorbant assay</i>	Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
ER	Edelreis	NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
EtOH	Ethanol	nt	Nukleotid(e)
FAM	Fluorescein	ORF	<i>open reading frame</i>
g	Erdbeschleunigung	PAL	Phenylalaninammoniumlyase
g	Gramm (Masse)	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	PCD	<i>programmed cell death</i>
GUS	β-Glucuronidase	PCR	polymerase chain reaction
h	Stunde(n) (Zeit)	PDS	<i>particle delivery system</i>
HCl	Hydrogenchlorid	PPV	Plum pox virus
		psi	Druck
		PVP	Polyvinylpyrrolidon

RAMP	<i>randomly amplified microsatellite polymorphisms</i>	t	Tonne (Masse)
		t	Zeit
RAPD	<i>random amplified polymorphic DNA</i>	TEMED	Tetramethylethyldiamin
		TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>	TSD	Triebspitzendürre
RGA	resistance gene analogue	U	Enzymaktivität
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	UL	Unterlage
rpm	Rotationen pro Minute	UV	Ultraviolett
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>	V	Volt (Spannung)
		Vol.	Volumen
ROX	X-Rhodamin	W	Watt (Leistung)
s	Sekunde(n) (Zeit)	w/v	<i>weight/volume</i>
SA	<i>salicylic acid</i> , Salicylsäure	ZV	Zwischenveredlung
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>	λ	Wellenlänge
SSR	<i>simple sequence repeats</i>		
STR	<i>short tandem repeats</i>		
T	Temperatur		

1. Einleitung

1.1. DIE BEDEUTUNG DER SCHARKAVIROSE FÜR DEN ANBAU DER EUROPÄISCHEN PFLAUME (*PRUNUS DOMESTICA* L.)

Zur Art der Europäischen Pflaume (*Prunus domestica* L.) zählen u. a. Pflaume, Zwetsche, Reneklode und Mirabelle. Das Anbauggebiet der Europäischen Pflaume (*Prunus domestica* L.) erstreckt sich über die ganze Welt. Die Hauptanbaugebiete befinden sich in den gemäßigten Klimazonen, vorzugsweise in Europa. Nach Angaben der FAOSTAT (2011) verteilt sich die weltweite Produktionsmenge an Pflaumen im Jahr 2011 folgendermaßen: Asien 62%, Europa 25%, Amerika 9%, Afrika 3% und Ozeanien < 1%. Bei diesen Daten wird nicht zwischen Japanischer (*Prunus salicina*) und Europäischer Pflaume unterschieden. Der Großteil der in Asien angebauten Pflaumen, sind Japanische Pflaumen, welche in erster Linie für den Frischverzehr produziert werden. Ebenso ist in den USA die Japanische Pflaume vorrangig (57%), die Europäische Pflaume (43%) wird dort vor allem für die Produktion von Trockenfrüchten verwendet (Topp et al. 2012).

Die meisten Zwetschen, Pflaumen und Schlehen wurden innerhalb Europas 2011 in Serbien angebaut (582000 t), gefolgt von Rumänien (574000 t). Die Gesamtproduktionsmenge von Deutschland im erwerbsmäßigen Anbau belief sich im Jahr 2011 auf 59000 t, mit einer Produktionsfläche von 4545 ha (FAOSTAT 2011). In den von der FAOSTAT ermittelten Mengen werden die Produktionsmengen aus der Direktvermarktung nicht berücksichtigt, daher sind die Daten mit Vorbehalt zu behandeln. Der Flächenertrag in Deutschland beträgt 12,98 t/ha, während in Serbien 3,46 t/ha erzeugt werden (ebda.).

Die Scharkavirose, welche als gefährlichste Erkrankung des Steinobstes bezüglich der agronomischen und wirtschaftlichen Schäden betrachtet wird, bedroht weltweit den Anbau der Europäischen Pflaume, und auch den der verwandten *Prunus*-Spezies (wie z. B. Aprikose oder Pfirsich) (Nemeth 1994). Trotz der Bemühungen Scharkainfektionen zu umgehen, wurde in den meisten wichtigen Industrieländern, in denen *Prunus*-Arten angebaut werden, vom Auftreten der Scharkakrankheit berichtet (Cambra et al. 2006). Gemäß den Angaben der

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO 2013) ist die Krankheit weltweit verbreitet (s. Abb. 1.1-1).

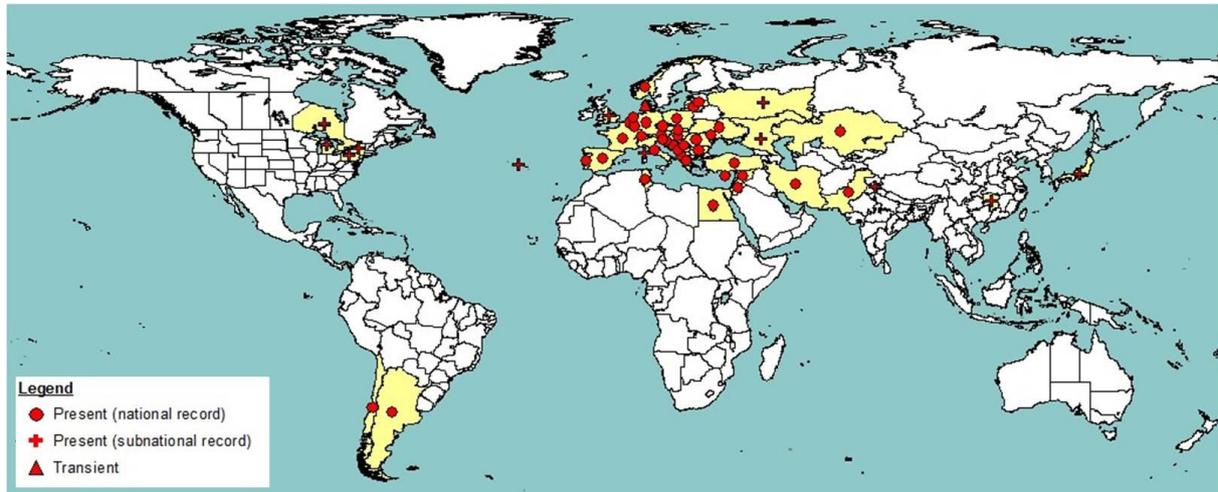


Abb. 1.1-1 Weltweite Verbreitung des Scharkavirus

EPPO 2013, PQR - EPPO database on quarantine pests (online erhältlich, <http://www.eppo.int>)

Symptome der Scharkakrankheit wurden bereits 1917-18 von bulgarischen Obstbauern bei *Prunus domestica* beobachtet. Atanasoff (1935) erkannte, dass ein Virus ursächlich für die Krankheit ist und beschrieb sie erstmals umfassend mit ihren Symptomen und möglichen Wirtspflanzen. Seitdem hat sich die Virose, ausgehend von Osteuropa, zunehmend über den Europäischen Kontinent ausgebreitet und kommt heute auf fast allen Kontinenten, in Amerika (Argentinien, Chile, Kanada und USA), Asien (China, Indien, Iran, Japan, Kasachstan und Pakistan) und Afrika nachweislich vor (Capote et al. 2010).

Die Scharkakrankheit mindert den Gewinn, der von einer Steinobstanlage erwirtschaftet werden kann. Eine solche Anlage kann kaum mehr gewinnbringend geführt werden (Neumüller 2005). Cambra et al. (2006) benennen die vielfältigen Kosten, welche durch die Krankheit entstehen können: Der Produktionsausfall, die Aufwendungen für die Vernichtung der befallenen Pflanzen und für Nachpflanzungen und auch die Kosten für Präventionsmaßnahmen, wie Quarantäne, Inspektion und Diagnostik müssen berücksichtigt werden; außerdem sind die Auswirkungen des Ausbruchs der Scharkakrankheit auf den ausländischen und heimischen Markt nicht zu vernachlässigen. Die Verluste durch die Scharkakrankheit bei der Europäischen Pflaume werden auf 1,5 Millionen Tonnen pro Jahr, mit 180 Millionen Euro damit verbundenen Kosten, geschätzt (ebda.).

1.2. DIE SCHARKAVIROSE

Die Scharkakrankheit wird auch als Pflaumenpockenkrankheit bezeichnet. Der Name „Pockenkrankheit“ leitet sich von einem der typischen Symptome auf den Früchten, den sogenannten „Pocken“, ab. Die Symptome der Krankheit können sich auf allen Pflanzenteilen, auf Blättern, Blüten, Früchten, Steinen, im Holz oder auch im Wurzelsystem, zeigen. Die Stärke und Ausprägungsform der Symptome hängt von Genotyp, Jahreszeit, Virusstamm sowie Umweltbedingungen ab (Neumüller 2005, Cambra et al. 2012).

Die auffälligsten Symptome zeigen sich auf den Blättern von anfälligen Sorten: je nach Genotyp erscheinen auf der Blattspreite chlorotische Verfärbungen in Form von Ringen, Flecken oder Bänderungen unterschiedlicher Größe (s. Abb. 1.2-1 A). Manche Sorten entwickeln nur zeitweise Symptome, einige können auch ganzjährig symptomlos bleiben. Symptome der Früchte sind Marmorierungen, Furchen, Einsenkungen oder Gummifluss (s. Abb. 1.2-1 B, C). Zudem ist die Qualität von geschädigten Früchten stark reduziert (Neumüller, 2005).

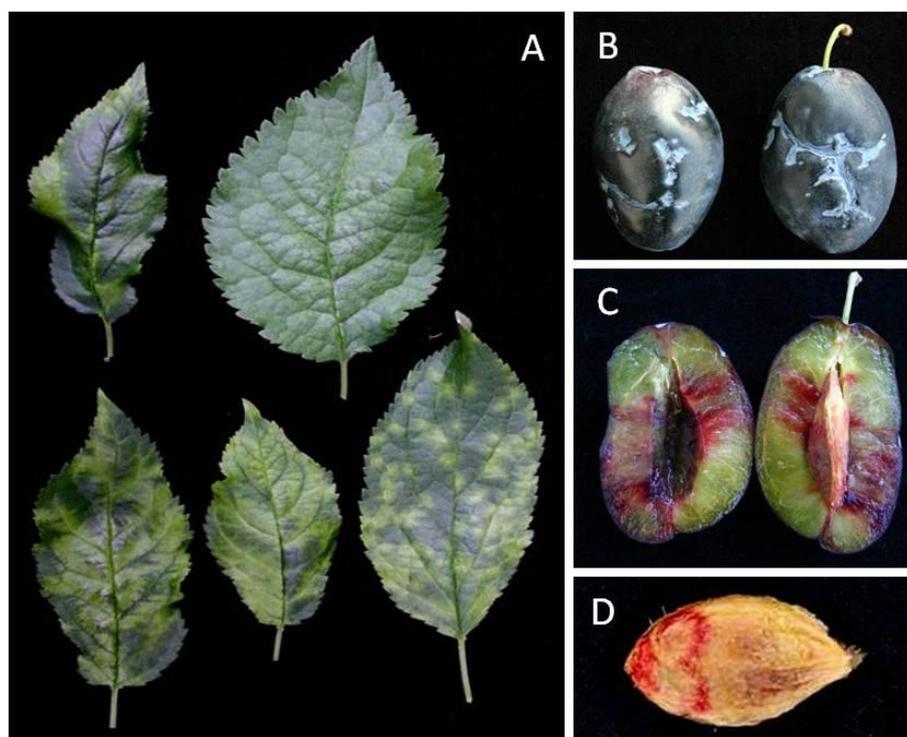


Abb. 1.2-1 Verschiedene PPV-Symptome bei *Prunus domestica* L.

A) Symptomausprägung auf den Blättern, B) Früchte mit Einsenkungen, C) Verfärbungen im Fruchtfleisch, D) rötliche Verfärbungen am Stein (Aufnahmen: Neumüller)

Die Krankheit wird durch das Scharkavirus, auch *Plum pox virus* (PPV) genannt, ausgelöst. Es gehört zur Gattung der Potyviren innerhalb der Familie der Potyviridae, welche als größte Familie der Pflanzen-infizierenden Viren betrachtet wird (Shukla et al. 1994).

Die Virus-Partikel sind lange, flexible Stäbchen mit einer Länge von ca. 750 nm und einem Durchmesser von 11-14 nm. Das einzelne virale RNA-Molekül wird von einer Proteinhülle von ungefähr 36 kDa umgeben, welche aus ca. 2000 gleichartigen Untereinheiten aufgebaut ist (Salvador et al. 2006).

Das Genom von PPV, welches aus einer einzelsträngigen, positiv orientierten RNA besteht, ist ca. 9800 nt lang und ähnlich dem Genom der anderen Mitgliedern der Gattung der Potyviren organisiert: Die genomische RNA hat ein virales Protein (VPg), das am 5'-Ende kovalent gebunden ist, und ein polyadenyliertes 3'-Ende (poly(A)). Das Genom enthält einen langen *open reading frame* (ORF), welcher nach der Infektion in ein großes Polypeptid von ca. 350 kDa translatiert wird. Dieses Polypeptid wird während und nach der Translation autokatalytisch - drei Regionen des Polypeptids weisen Proteinase-Aktivität auf - in zehn funktionale Proteine gespalten: P1, HCpro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa, (VPg+Pro), NIb und CP. In den letzten Jahren wurde ein zweiter, kurzer ORF (*pipo*) identifiziert, welcher innerhalb der P3-Region lokalisiert ist. Mit einem *frameshift* ist dieser in das Protein P3N+PIPO translatierbar, welches vermutlich an der Pathogenität des Virus beteiligt ist (López-Moya et al. 2009).

Das bestuntersuchte Protein ist das Hüllprotein (*coat protein*, CP). Neben der Umhüllung der viralen RNA ist dieses Protein am Zell-/Zell-Transport beteiligt und es beeinflusst die Blattlaus-Übertragung durch posttranslationale Modifikationen (z. B. Phosphorylierung, Glykosylierung) sowie durch Interaktion mit dem Protein HCpro (López-Moya et al. 2009). Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung des Hüllproteins der verschiedenen Virusstämme, konnten spezifische Antikörper generiert und zum Virusnachweis verwendet werden.

Bisher sind für das *Plum pox virus* sieben Virusstämme bekannt, welche sich in ihren biologischen und epidemiologischen Eigenschaften wie Pathogenität, den bevorzugten Wirtspflanzen, Symptomatik, Effizienz bei der Blattlaus-Übertragung und der geographischen Verteilung unterscheiden. Die Zuordnung zu den einzelnen Stämmen beruhte ursprünglich auf unterschiedlichen serologischen Eigenschaften des Hüllproteins. Die beiden Hauptgruppen PPV-D (Dideron) und PPV-M (Marcus) sind am meisten verbreitet. Die beiden Stämme PPV-EA (El-Amar, geographisch begrenzt auf Ägypten), und PPV-C (Cherry), welcher unter natürlichen Bedingungen nur die Kirsche befällt, bilden zwei kleinere Gruppen. Das Aufkommen molekularbiologischer Methoden, mit welchen die genaue Gensequenz untersucht werden konnte, führte zum Nachweis einer weiteren großen Stamm-Gruppe, nämlich dem rekombinanten Stamm PPV-Rec (Recombinant), welcher sich durch natürliche Rekombination der Stämme D und M gebildet hat (EPPO 2004, Glasa et al. 2004). Außerdem gibt es zwei kleinere Stammgruppen, welche in den letzten Jahren identifiziert wurden, nämlich PPV-W (Wirona, in Kanada entdeckt) und PPV-T (Turkey). PPV-T ist bisher auf die Türkei geographisch begrenzt (Glasa et al. 2011). Zu jedem der Virusstämme gibt es zahlreiche Isolate.

Unter natürlichen Bedingungen wird das Scharkavirus von verschiedenen geflügelten Blattlausarten als Vektoren übertragen. Auf diese Weise wird es nichtpersistent über kurze Entfernungen (500 Meter bis wenige Kilometer) verbreitet. Dabei kann das Virus bis max. eine Stunde nach der Aufnahme auf andere Wirtspflanzen übertragen werden (Krczal & Kunze 1972). Die Übertragung findet während der Pflanzensaft-Aufnahme statt, wobei der Stechrüssel der Blattlaus für wenige Sekunden in die Blattepidermis gesteckt wird (Racchah et al. 2001). Der Infektionsprozess verläuft in der Regel in verschiedenen Phasen: nach der Penetration einer Pflanze mit Viruspartikeln, kommt es zur Trennung von Proteinhülle und Nukleinsäure, anschließend wird die DNA repliziert und die entstandenen Funktionseinheiten werden zusammengebaut und abtransportiert. Die Verbreitungswege des Virus in der Pflanze sind noch nicht genau bekannt, es wird aber angenommen, dass die Viruspartikel von Zelle zu Zelle über Plasmodesmata und über weitere Distanzen über die Gefäße, sowohl über das Phloem, als auch das Xylem, transportiert werden (Kegler et al. 1993, Rubio et al. 2008). Als wichtigste Blattlausarten, die das Scharkavirus übertragen, gelten: die Große Pflaumenblattlaus (*Brachycaudus cardui*), die Kleine Pflaumenblattlaus (*Brachycaudus helichrysi*), die Grüne Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae*) und die Hopfenblattlaus (*Phorodon humuli*) (Krczal & Kunze 1972).

Die Übertragung des Scharkavirus ist auch mechanisch möglich. Das Virus kann durch Veredlung oder mechanische Inokulation auf Wirtspflanzen übertragen werden. Die mechanische Inokulation kann bei krautigen Pflanzen leicht durchgeführt werden (Martínez-Gómez et al. 2000). Bei holzigen Pflanzen gelingt eine systemische Virusinfektion durch mechanische Inokulation selten (Dallot et al. 2001).

Über kurze Distanzen kann das Scharkavirus durch Blattläuse als Vektoren verbreitet werden, während das Virus über weite Entfernungen durch infiziertes Pflanzenmaterial übertragen wird. Trotz bestehender Quarantänemaßnahmen werden (z. T. latent) infizierte Edelreiser, Unterlagen oder Bäume in befallsfreie Gebiete eingeführt und tragen so zur Ausbreitung der Virose bei. Wenn das Virus in einer Plantage eingeführt ist, kann es von dort aus durch Blattläuse lokal verbreitet werden. Durch das Fehlen des Bewusstseins für die Krankheit und auch von zuverlässigen Detektionsmethoden konnte sich die Scharkavirose über Jahre weltweit ausbreiten und in Anbaugebieten etablieren (Cambra et al. 2006).

1.3. STRATEGIEN ZUR MINIMIERUNG DER SCHÄDEN DURCH DIE SCHARKA-KRANKHEIT

Das Scharkavirus ist ein Quarantäne-Schaderreger. Demnach stellt es ein großes Risiko für die Länder, in denen die Virose noch nicht aufgetreten ist oder bisher lokalisiert blieb, dar. Zudem entstehen für die Länder, in denen es auftritt, Schwierigkeiten beim Export von zertifiziertem Pflanzmaterial (EPPO 1994).

Eine direkte Bekämpfung, bzw. eine „Virusfreimachung“ infizierter Pflanzen ist nicht möglich. Deshalb konzentrieren sich die Maßnahmen auf die Verhinderung und Einschränkung von Infektionen.

In der Erforschung der Scharkakrankheit konnten in den letzten 15 Jahren große Fortschritte verzeichnet werden. Dadurch geschaffene Kenntnisse und Maßnahmen, welche die Kontrolle der Virose erleichtern, fassen Cambra et al. (2006) zusammen:

- Verbesserung der Methoden zum PPV-Nachweis
- Durchführung von epidemiologischen Studien
- Produktion von zertifiziertem Pflanzmaterial
- Transfer des Wissens über die Scharkakrankheit
- Rodung von scharkainfizierten Pflanzen
- Ständige Kontrolle zur Früherkennung der Krankheit

Eine der effektivsten Möglichkeiten Infektionen, bzw. ökonomische Schäden zu minimieren, ist der Einsatz resistenter Pflanzen. So kann umgesetzt werden, die Virose von bislang befallsfreien Gebieten fernzuhalten, und sie in befallenen Gebieten besser kontrollieren zu können.

1.3.1. Züchtung resistenter Sorten

Der Begriff „Resistenz“ gegen Pathogene wird sehr unterschiedlich und zum Teil auch widersprüchlich definiert. Bevor die Resistenzformen, welche bei der Europäischen Pflaume gegenüber dem Scharkavirus vorliegen, erläutert werden, sollen deshalb die dafür notwendigen Begriffe definiert werden.

Cooper und Jones (1983) schlagen eine Definition des Resistenzbegriffes vor, welche weitgehend akzeptiert ist. Grundsätzlich ist zu unterscheiden, ob ein Pathogen eine Pflanze infizieren kann (Wirt) oder nicht (Nicht-Wirt, immun). Bei Immunität kommt es zu keiner Interaktion zwischen Pathogen und Pflanze, während sich in einer Wirtspflanze das Pathogen vermehren kann. Die Begriffe „anfällig“ oder „resistent“ beziehen sich auf das Verhalten des Pathogens in der Pflanze. Bei resistenten Pflanzen sind Virusreplikation und/oder Virusaus-

breitung in der Pflanze behindert, wohingegen sich das Virus bei anfälligen Pflanzen in gewissem Ausmaß vermehren und ausbreiten kann. Die Reaktion auf die Virusinfektion einer Pflanze kann in Abhängigkeit ihres Genotypen unterschiedlich ausfallen: Eine Pflanze kann empfindlich (sensibel) reagieren, d. h. sie reagiert mit starken Symptomen, oder sie ist tolerant, wobei geringe oder nur wenige Symptome ausgeprägt werden. Eine weitere Möglichkeit ist eine hypersensible Reaktion (HR), welche stark oder schwach ausgeprägt sein kann. Einige Pflanzen reagieren schwach hypersensibel und sind damit infizierbar, da es zu keiner vollständigen Lokalisierung des Virus kommt, andere reagieren stark hypersensibel (s. Abb. 1.3-1 und Kap. 1.3.1.2).

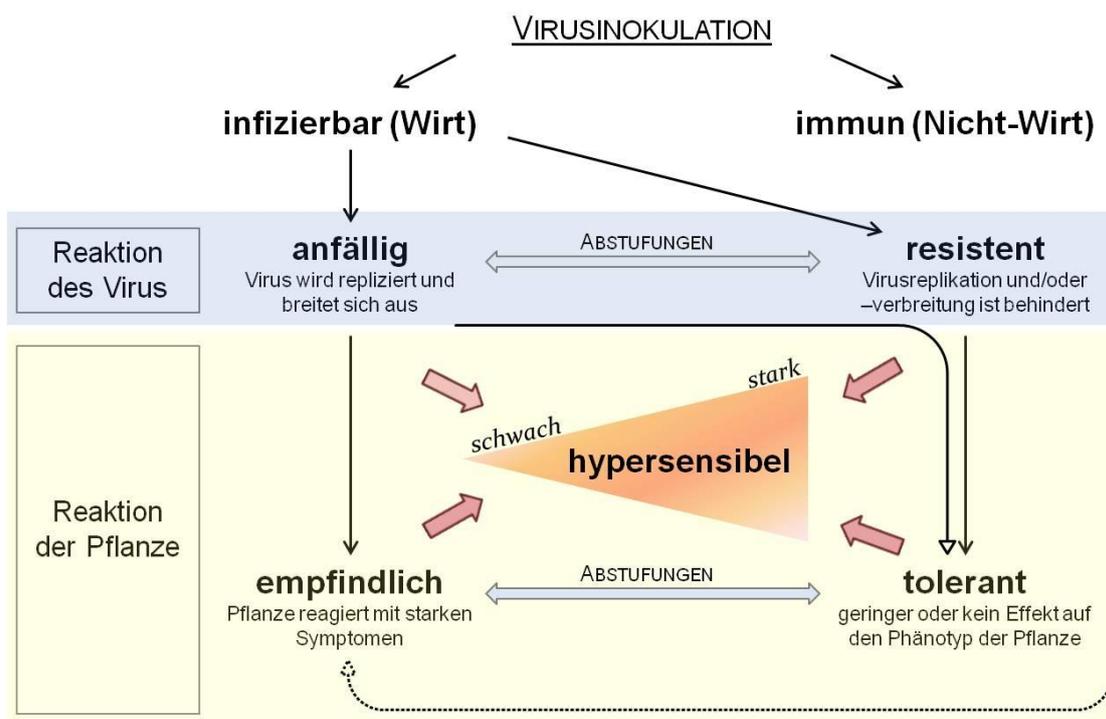


Abb. 1.3-1 Reaktion des Virus und der Pflanze nach Virusinokulation (nach Cooper und Jones 1983 und Kegler und Friedt 1993, verändert)

Die Übergänge zwischen den gegensätzlichen Reaktionen „anfällig“ und „resistent“ sowie „empfindlich“ und „tolerant“ (auch schwach hypersensibel und stark hypersensibel) sind fließend. Es gibt Reaktionen, welche nicht eindeutig diesen gegensätzlichen Reaktionen zugeordnet werden können, sondern eine abgeschwächte Ausprägungsform von diesen einnehmen. Welche Sorten als empfindlich oder tolerant einzustufen sind, kann unterschiedlich ausfallen, da die Beurteilung vom betrachteten Symptom und dessen Einstufung abhängig sind (Neumüller 2005).

Bei der Europäischen Pflaume sind keine immunen Genotypen bekannt (Hartmann & Neumüller 2006). Deshalb werden in Züchtungsprogrammen in erster Linie resistente oder tolerante Sorten (s. Absatz 1.3.2, Seite 11) entwickelt. Es sind zwei Arten der natürlich vor-

kommenen Resistenz gegenüber dem Scharkavirus bei der Europäischen Pflaume bekannt, nämlich quantitative Resistenz und Hypersensibilitätsresistenz.

1.3.1.1. Quantitative Resistenz

Im Gegensatz zur qualitativen Resistenz, wobei es zu einer lokalen Infektion kommt, ist die quantitative Resistenz durch eine ungleichmäßige Virusausbreitung, einen unterschiedlichen Virustiter und einer unterschiedlichen Symptomausprägung von Genotypen einer Art charakterisiert (Kegler et al. 1998). Es kommt zur systemischen Ausbreitung des Erregers, allerdings mit einer Ungleichverteilung in der Pflanze. Der Virusbefall bzw. Krankheitsverlauf ist abgeschwächt (Kegler et al. 1993). Zu den bekannten quantitativ resistenten Sorten zählen 'Cacaks Beste' ('Cacanska najbolja'), 'Freya' oder der Hohenheimer Zuchtklon 'Hoh 2043'. Die Züchtung von quantitativ resistenten Sorten ist schwierig, da die Resistenzprüfungen sehr aufwendig sind (mehrjährige Prüfung, Bestimmung des Virusgehalts); zusätzlich erschweren fehlende Kenntnisse zur Vererbung der quantitativen Resistenz die erfolgreiche Nutzung dieses Resistenzmechanismus für die Züchtung (Neumüller 2005).

1.3.1.2. Hypersensibilitätsresistenz

Erstmals berichteten Kegler et al. (1985) von der Hypersensibilität der Europäischen Pflaume. Er beschreibt diese Form der Resistenz als „qualitativ bestimmte Ausbreitungsresistenz“, welche bei der 'Kischinever Hybride 4' (Nachkomme der Kreuzung 'Kirke' × 'Persikovaya'), abgekürzt 'K4', vorkommt, wobei 'Kirke' als Donor der Resistenz angesehen wird (Kegler et al. 1991). Bei eingehenderen Experimenten mit 'K4' ergab sich, dass die Resistenz virusisolatspezifisch ist und nur bei Infektion mit dem PPV-Isolat des Typs CG (PPV-Rec; aus der Pflaumensorte 'Cambridge Gage' isoliert) und mit Isolaten, welche diesem Typ ähnlich sind, zum Ausdruck kommt (Kegler et al. 2001).

Kegler sieht die Hypersensibilitätsreaktion (HR) als epidemiologisch wichtig, wenn es mit der Eigenschaft der Viruslokalisierung (VL) verbunden ist, wie es bei Sämlingen von 'K4' Fall ist. Bei Kombination von HR und VL kommt es zur Lokalisierung des Virus an der Infektionsstelle durch lokales, schnelles Zellsterben und somit zur Verhinderung der Ausbreitung des Virus in der Pflanze. Genotypen mit diesen Eigenschaften werden als komplett resistent gegenüber PPV eingestuft. Diese Art der Resistenz wird von Kegler et al. (1993) als qualitative Resistenz mit monogener oder oligogener Vererbung betrachtet.

1997 beschreibt Hartmann die Hypersensibilitätsresistenz bei Hohenheimer Hybriden aus verschiedenen Kreuzungen mit der Sorte 'Ortenauer' mit gleichen Reaktionen der HR wie 'K4'. Von diesen Kreuzungen wurde die erste hypersensible Sorte 'Jojo' ('Ortenauer' × 'Stanley 13') in die Praxis eingeführt. Die Sorte 'Jojo' zeigte sich bisher gegenüber allen PPV-

Stämmen resistent, und sie konnte in langjährigen Feldtests bei z. T. starkem PPV-Infektionsdruck nicht über Blattläuse infiziert werden (Hartmann 2001).

Die Hybride 'K4' und die Sorte 'Jojo' werden beide als hypersensibel resistent eingestuft. Bei 'K4' allerdings ist diese Resistenz virusisolatspezifisch und wird daher züchterisch als weniger wertvoll betrachtet als die Resistenz von 'Jojo'. Hartmann (1998) kam nach Untersuchungen an hypersensiblen Hybriden zu dem Schluss, dass es innerhalb der HR zu verschiedenen Abstufungen kommt, wobei zwischen unvollständiger Lokalisierungsresistenz und absoluter Resistenz mehrere Zwischenstufen existieren. Daraus leitet er ab, dass an der HR der Europäischen Pflaume gegenüber PPV mehrere Gene beteiligt sein müssen oder es zu einer Genakkumulation kommt.

Neumüller untersuchte die Hypersensibilitätsresistenz, welche aus dem Hohenheimer Zuchtmaterial stammt, in Experimenten mit einer größeren Anzahl an Pflanzen und versuchte eine systematische Einteilung der möglichen Ausprägungsformen der HR zu entwickeln (Neumüller 2005 und Neumüller & Hartmann 2008). Mögliche auftretende Symptome einer hypersensiblen Reaktion sind demnach folgende:

- **Triebspitzendürre:** Verfärbungen der Sprossspitze; Welkeerscheinungen der Blätter z. T. mit Krümmungen der Terminale nach unten; Nekrotisierung der Sprossspitze; Absterben des Sprosses (s. Abb. 1.3-2 A und B)
- **Nekrosen an der Blattspreite:** unregelmäßige Flecke; Auftreten stets entlang der Blattader; entweder punkt-oder streifenförmig, selten beides an einer Pflanze; Kräuselung der Blätter aufgrund des Gewebezusammenbruchs; Abstoßung der Blätter (s. Abb. 1.3-2 C-G)
- **PPV-Symptome auf der Blattspreite:** z. T. starke Chlorosen mit weitflächiger Ausbreitung über die Blattspreitenoberfläche (s. Abb. 1.3-2 H)
- **Rindennekrosen am Spross:** erstes Sichtbarwerden durch feine, braun-schwarze Linien am primären Abschlussgewebe, senkrecht zum Sprossquerschnitt; Ausweitung der Nekrose auf den gesamten Trieb; Verkrümmung der Triebspitze durch gestörtes Wachstum, Absterben des darüber liegenden Sprosses oder der Blätter des nekrotischen Sprosses (s. Abb. 1.3-2 I-K)
- **Veränderungen im Wuchsverhalten:** entweder keine Beeinträchtigung oder reduziertes Triebwachstum mit gestauchter Sprossachse

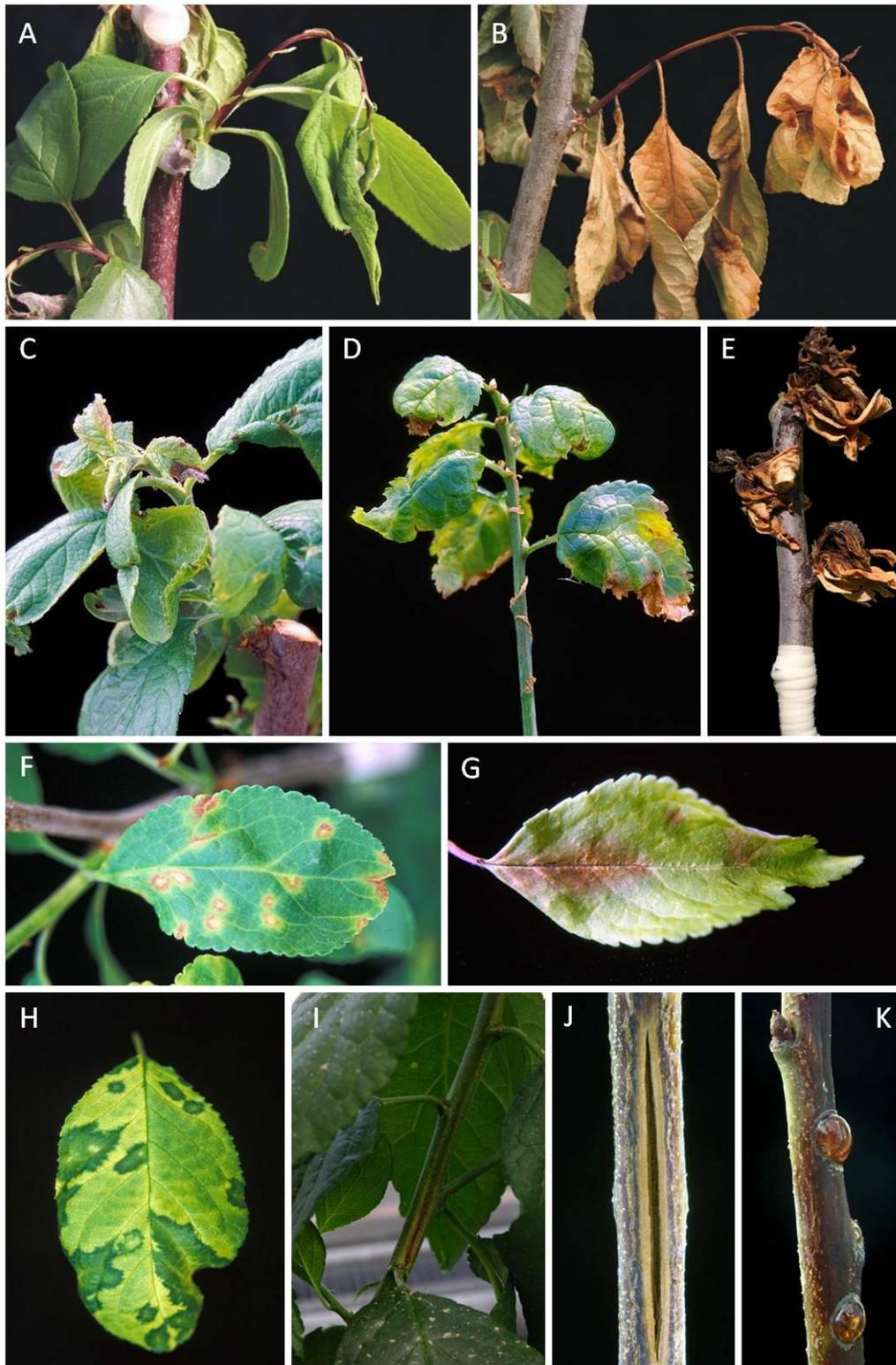


Abb. 1.3-2 Mögliche hypersensible Reaktionen bei *Prunus domestica* L.

A) beginnende Triebspitzendürre mit Welken der Blätter und Krümmung der Terminale nach unten; B) abgestorbener Spross; C) und D) Blattspreitennekrosen, D) mit Chlorosen und Kräuselung der Blätter; E) abgestorbene Blätter; F) Nekrosenbildung um die scharkatypischen chlorotischen Flecke; G) nekrotische Blattspreite; H) extrem stark ausgeprägte Chlorose; I) beginnende Rindennekrose mit nekrotischer Linie; J) extreme Rindennekrose mit bis ins Xylem reichender Spalte; K) Gummifluss (Aufnahmen: Neumüller)

Die beschriebenen Reaktionen können mit allen oder nur einzelnen der genannten Symptome erscheinen. Auch in der Intensität der Symptome und der Schnelligkeit des Auftretens (sehr rasch bis mehrere Monate) gibt es große Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen.

Neumüller (2005) und Neumüller und Hartmann (2008) bildeten aufgrund der vielfältigen Ausprägungsformen der hypersensiblen Reaktionen vier verschiedenen Hypersensibilitätsklassen (HK), zu welchen die verschiedenen Pflanzen nach Bewertung der einzelnen Merkmale und Gewichtung der Stärke der Symptome eingeteilt werden können:

- Genotypen ohne Anzeichen von Hypersensibilität (HK 0)
- Genotypen mit schwach ausgeprägter Hypersensibilität (HK 1)
- Genotypen mit normal ausgeprägter Hypersensibilität (HK 2)
- Genotypen mit stark ausgeprägter Hypersensibilität (HK 3)

Die Übergänge zwischen den verschiedenen Klassen sind fließend.

Zur Testung auf Hypersensibilität bei der Europäischen Pflaume wird ein standardisierter Resistenztest, die „Doppelpfropfungsmethode“, angewandt. Dabei wird auf eine gesunde Unterlage eine PPV-infizierte Zwischenveredlung gesetzt und auf diese der zu testende Genotyp veredelt (Kegler et al. 1994). Alternativ kann auch auf PPV-infizierte Unterlagen veredelt werden. Auf diese Weise kann in ca. einem Jahr festgestellt werden, ob eine Pflanze hypersensibel reagiert.

1.3.2. Züchtung fruchttoleranter Sorten

Die Eigenschaft tolerant bezieht sich, wie in Absatz 1.3.1 beschrieben, auf die Reaktion der Pflanze nach Virusinfektion: Die Infektion hat auf den Phänotyp einer toleranten Pflanze eine geringe oder keine Auswirkung. Die Pflanze ist ohne sichtbare Symptome infiziert. Bei der Europäischen Pflaume unterscheidet man zwischen blatttoleranten und fruchttoleranten Sorten. Bei blatttoleranten Sorten bleiben nach einer Virusinfektion die Blätter, bei fruchttoleranten Sorten die Früchte symptomlos (Neumüller 2011). Diese Eigenschaft ist für den Obstbauern von Bedeutung, da Früchte von einer fruchttoleranten Sorte bei PPV-Infektion des Baumes vermarktungsfähig bleiben. Als fruchttolerante Sorten gelten 'Hanita', 'Katinka' und 'Presenta' (Hohenheimer Zwetschenzüchtung).

Die Verwendung von toleranten Sorten ist problematisch. Dadurch, dass keine oder kaum Symptome sichtbar sind, kann ein Baum infiziert sein, ohne visuell als solcher erkannt zu werden. In befallsfreien Gebieten kann dies zur Einführung und Ausbreitung der Virose füh-

ren. Bei Neumüller (2005) wird beschrieben, dass sich der Phänotyp einer Sorte im Laufe der Zeit durch Umweltfaktoren verändern kann.

1.3.3. Bekämpfung der Vektoren

Eine Bekämpfung der PPV-übertragenden Blattläuse ist eine Maßnahme, welche mithelfen kann, den Infektionsdruck zu minimieren und so die Virusverbreitung einzuschränken. Vor allem in den Hauptbefallszeiträumen im Frühjahr und im Herbst sollte die Blattlausbekämpfung mit handelsüblichen Mitteln durchgeführt werden.

Im Rahmen des EU-Projektes „SharCo“ (*European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013)*, Grant Agreement no.204429) wurde die Behandlung von Pflanzen mit Öl zur Einschränkung der Verbreitung der Scharkavirose untersucht. Diese Maßnahme soll als physikalische Barriere dienen und so die Virusübertragung durch Blattläuse minimieren. In Gebieten mit hohem und mit niedrigem PPV-Infektionsdruck wurde der Einfluss von 1%igen Mineralölbehandlungen auf die Verbreitungsgeschwindigkeit von PPV in Blöcken aus *Prunus*-Unterlagen getestet. Vidal et al. (2010) kommen durch ihre Untersuchungen zum dem Schluss, dass die Verwendung von Mineralölbehandlungen eine gute Ergänzung zur Verwendung von PPV-resistenten oder weniger anfälligen Sorten sind, um die Ausbreitung der Scharkakrankheit in Baumschulen zu reduzieren; verhindern können die Mineralölbehandlungen diese nicht.

1.3.4. Gesundes, zertifiziertes Pflanzmaterial

Gemäß der Anbaumaterialverordnung (AGOZV) wurden 1998 zwei Qualitätsstufen des Anbaumaterials für Obstgehölze eingeführt: „Standardmaterial“ und „Zertifiziertes Material“. Bei einer Zertifizierung des Pflanzmaterials sind zusätzlich zu dem Mindestanforderungen des Standardmaterials Testungen des Anbaumaterials und der Vermehrungsstufen auf bestimmte Krankheiten notwendig (Schröder 2005). So sollte durch Verwendung von ausschließlich gesunden, zertifizierten Sorten und Unterlagen eine Weiterverbreitung des Scharkavirus nicht möglich sein. Jedoch zeigt sich, dass eine Zertifizierung von Pflanzmaterial keine Garantie für gesundes Material ist, da bei manchen Sorten eine PPV-Infektion erst nach einigen Jahren detektierbar wird. Die Verbreitung von latent infiziertem Pflanzmaterial ist einer der Hauptgründe für die weltweite Ausbreitung der Virose.

1.3.5. Rodung

Die Rodung von Pflanzen bleibt als letzte Konsequenz bei Ausbreitung der Krankheit in größeren Neuanlagen oder Gebieten, in denen die Scharkavirose noch nicht flächendeckend vorkommt. Nur so kann eine Weiterverbreitung der Krankheit verhindert werden. In Deutschland gibt es die Verordnung zur Bekämpfung der Scharkakrankheit (ScharkaV, BGBl.I), welche vorgibt, dass PPV-infizierte Pflanzen gerodet oder verbrannt werden müssen. Aber auch in den weltweiten PPV-Verbreitungsgebieten werden Rodungsprogramme durchgeführt, um der Krankheit entgegenzuwirken (Thompson 2006, Cambra et al. 2006).

1.4. ZIEL DER ARBEIT

Es wurde dargestellt, dass die Scharkakrankheit große Schäden beim Anbau der Europäischen Pflaume hervorruft und es deshalb von Bedeutung ist, die Verbreitung der Virose einzudämmen. Die Möglichkeiten dazu konzentrieren sich darauf, Infektionen zu verhindern oder Schäden nach einer Infektion gering zu halten. Die Kombination von mehreren Maßnahmen schafft eine Absicherung gegen die Ausbreitung der Virose: Neben der Bekämpfung der Vektoren, der Verwendung von ausschließlich zertifiziertem Pflanzmaterial für Neupflanzungen, der regelmäßigen Kontrolle der Baumbestände sowie der Rodung von infizierten Pflanzen, ist die Verwendung von resistenten Sorten die effizienteste Vorkehrung, die Virusausbreitung einzuschränken.

Bei der Europäischen Pflaume scheint derzeit die Hypersensibilitätsresistenz die einzig vorhandene Art der Resistenz zu sein, mit welcher Sorten entwickelt werden können, die den Anforderungen der obstbaulichen Praxis entsprechen. Für die Nutzung der Hypersensibilitätsresistenz in der Sortenzüchtung ist es wichtig, resistente Zuchtklone effizient zu selektieren, die Stabilität der Hypersensibilitätsresistenz sicherzustellen und außer Sorte auch Unterlage mit Hypersensibilitätsresistenz nutzbar zu machen.

Die Selektion von hypersensiblen Zuchtklonen wird derzeit mit der Doppelpfropfungsmethode nach Kegler et al. (1994) durchgeführt. Durch den Einsatz von Markern zur markergestützten Selektion könnten geeignete Zuchtklone schneller und effizienter erkannt werden. Um Marker für einen Genlocus zu generieren, welche zu einsetzbaren, molekularen Markern weiterentwickelt werden können, sind ausreichende Kenntnisse über die genetische Determinierung des Locus notwendig. Lichtenegger (2012) hält eine monogene Vererbung der Hypersensibilitätsresistenz für möglich, da die Nachkommen von interspezifischen Hybriden 1:1 in hypersensible und sensible Nachkommen aufspalten. Kenntnisse zur genauen genetischen Lokalisierung der Hypersensibilitätsresistenz bei der Europäischen Pflaume sind zum derzeitigen Stand nicht vorhanden. Um jedoch eine Aussage über die Resistenzlokalisierung treffen zu können, sollte eine Marker-Analyse mit Markern, welche bereits in nah verwandten *Prunus*-Arten zum Einsatz kamen und über das *Prunus*-Referenz-Genom verteilt liegen, durchgeführt werden.

Desweiteren soll die Genregion des Scharkavirus, welche für die Auslösung der hypersensiblen Reaktion bei der Europäischen Pflaume verantwortlich ist, identifiziert werden. Dazu wurden *in-vitro* kultivierte Pflanzen hypersensibler resistenter Zuchtklone mit Chimären aus PPV-cDNA-Klonen mit unterschiedlicher Infektiosität infiziert und auf ihre Reaktion geprüft, um Hinweise auf die HR-auslösende Genregion und die Stabilität der Hypersensibilitätsresistenz zu erhalten.

Die Evaluierung von hypersensiblen Zuchtklonen als Unterlagen soll anhand verschiedener Experimente unter Gewächshausbedingungen und im Freiland unter natürlichem PPV-Befallsdruck erfolgen. Ziel dieses Arbeitspunktes war die Entwicklung einer in der Obstbau-Praxis einsetzbaren, hypersensibel resistenten Unterlage.

2. Untersuchung von SSR Markern auf Korrelation mit der Hypersensibilitätsresistenz der Europäischen Pflaume

2.1. EINLEITUNG

Die Nutzung der Hypersensibilitätsresistenz der Europäischen Pflaume gegenüber dem Scharkavirus ist nach derzeitigem Wissensstand eine der meistversprechenden Möglichkeiten, die Ausbreitung der Virose einzuschränken. Deshalb ist es für Züchtungszwecke von großem Interesse, Zuchtklone mit Hypersensibilitätsresistenz frühestmöglich zu selektieren. Bei Gehölzen ist die Züchtung aufgrund der langen juvenilen Phase mit hohen Kosten verbunden, da Gewächshaus- und Feldressourcen sowie Laborkapazitäten für Qualitäts- und Resistenztests, jeweils ausgestattet mit entsprechenden Kontingenten an Arbeitskräften, benötigt werden. Daher werden molekulare Techniken wichtiger, welche das Screening ganzer Zuchtpopulationen und die Selektion von Pflanzen mit bestimmter Merkmalsausprägung beschleunigen können. Molekulare Marker bieten die Möglichkeit, Pflanzen mit gewünschten genetischen Eigenschaften (z. B. Hypersensibilitätsresistenz) in einem frühen Entwicklungsstadium zu identifizieren. Ziel des Markereinsatzes ist es, die Kosten für die Selektion in der Pflanzenzüchtung zu senken.

2.1.1. Molekulare Marker

Die Pflanzenzüchtung kennt drei verschiedene Marker-Systeme: morphologische, biochemische und molekulare Marker. Morphologische Marker, welche auf dem Phänotyp basieren, werden seit jeher in der gezielten Pflanzenzüchtung genutzt. Biochemische Marker erfassen die genetisch fixierte Variabilität anhand von Stoffwechselprodukten, z. B. Proteinen, welche jedoch - wie auch morphologische Marker - von Umweltbedingungen und vom Entwicklungsstadium der Pflanze beeinflusst werden. Molekulare DNA-Marker basieren auf der Variabilität des Genotyps, sind unbeeinflusst von Umweltfaktoren und können bereits in frühen pflanzlichen Entwicklungsstadien zur Verwendung kommen.

Der Einsatzbereich von molekularen Markern ist weitreichend, sie werden für Genkartierungen, Populations- und Systematikanalysen, Sortenidentifizierung und -evaluation und zur genetischen Analyse von quantitativ vererbten Eigenschaften verwendet (Zhang et al., 1994). Als etablierte Techniken gelten beispielsweise *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) und *simple sequence repeats* (SSR), welche entsprechend ihrer Möglichkeiten für verschiedene Anwendungen eingesetzt werden. Es gibt inzwischen aber auch eine neuere Art von Markern, welche durch Kombination der oben genannten Basis-Technologien oder durch Modifikation der bestehenden Methoden weiterentwickelt wurden. Zum Beispiel ist mit *randomly amplified microsatellite polymorphisms* (RAMP) eine Technik entstanden, bei welcher die Vorteile der SSR-basierten Marker (große Anzahl an Polymorphismen) mit denen von RAPD Markern (kostengünstig, geringer Arbeitsaufwand) kombiniert werden (Agarwal et al. 2008).

Simple sequence repeats (SSR), auch als *short tandem repeats* (STR) oder Mikrosatelliten bekannt, sind kurze DNA-Sequenzabschnitte, in welchen Wiederholungen von sehr kurzen Nukleotidabfolgen (1-6 bp) blockweise auftauchen. Diese repetitiven Elemente kommen sehr häufig in allen eukaryotischen Organismen vor (Tautz et al. 1984) und sind relativ gleichmäßig über das Genom verteilt. Die unterschiedliche Anzahl der Wiederholungen des *repeats* zwischen den einzelnen Individuen kann aufgrund von Fragmentlängen-Polymorphismen detektiert werden, wodurch einzelne Genotypen unterscheidbar werden. Die hohe Variabilität der Anzahl der *repeats* zwischen einzelnen Genotypen kommt durch sog. *slippage* während der DNA-Replikation zustande, wobei unterschiedliche Sequenzlängen durch Weglassen oder Hinzufügen einzelner *repeats* entstehen (Schlötterer et al. 1992). Da dieses „Verrutschen“ der Polymerase während der Replikation häufiger vorkommt als Punktmutationen, sind Mikrosatelliten hochvariabel. Vorteile von Mikrosatelliten sind: 1) PCR-Basiertheit, 2) Co-Dominanz, 3) hoher Polymorphismusgrad, 4) Erkennen von vielfachen Allelen und 5) die zufällige Verteilung im ganzen Genom (Qureshi et al. 2004). Aufgrund dieser Eigenschaften

sind sie sehr gut geeignet, für die Beurteilung von genetischer Variabilität innerhalb von Populationen und zur Feststellung von Abstammungsverhältnissen (Martínez-Gómez et al. 2003). Aufgrund dieser Vorteile wurden SSR Marker für die Genomanalyse in der vorliegenden Arbeit verwendet.

2.1.2. Marker-Analysen bei der Art *Prunus domestica* L.

Innerhalb der Gattung *Prunus* ist auf molekulargenetischer Ebene in den letzten Jahrzehnten intensive Forschung betrieben worden. Der Pfirsich (*Prunus persica*) ist die bestuntersuchte Art innerhalb der *Rosaceae* und hat neben seinem verhältnismäßig kleinen Genom (~220-230 Mbp) weitere Vorteile (zweifacher Chromosomensatz, kurze juvenile Phase), welche ihn als genetisches Referenzmodell sowohl für *Prunus*, als auch für andere Arten der *Rosaceae* qualifizieren. Wie auch bei anderen diploiden *Prunus*-Arten, z. B. der Aprikose oder der Mandel, sind für den Pfirsich molekulare Marker für verschiedene Eigenschaften, wie Resistenzen oder Fruchtqualität bekannt (Dirlewanger et al. 2004).

Bei *Prunus domestica* L. werden molekulare Marker in erster Linie zur Untersuchung von Abstammungsverhältnissen oder zur Sortenbestimmung verwendet (Decroocq et al. 2004). Allerdings sind im Vergleich zu den verwandten *Prunus*-Arten wenige Untersuchungen bekannt. 2005 berichtete Neumüller über die Entwicklung von DNA-Markern für die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume und führte eine AFLP-Analyse gekoppelt mit einer BSA (*bulk segregant analysis*) durch. Dabei konnten Polymorphismen im Bandenmuster zwischen hypersensiblen und sensiblen Genotypen gefunden werden, es konnten aber keine einsetzbaren PCR-Marker generiert werden (Neumüller 2005). Derartige Arbeiten sind mit Schwierigkeiten verbunden, da die Europäische Pflaume ein hexaploides Genom besitzt und auch die Abstammungsverhältnisse nicht eindeutig bekannt sind. Bei der Untersuchung von Polyploiden ist zu beachten, dass in einer segregierenden Population eine große Anzahl von möglichen Genotypen erwartet werden kann und diese mit mehr Arbeitsaufwand identifiziert werden müssen. Außerdem ist meist nicht eindeutig bekannt, ob es sich um einen allopolyploiden oder einen autopolyploiden Organismus handelt (Wu et al. 1992), wie es auch bei der Europäischen Pflaume der Fall ist. Desweiteren bietet die Neukombination der elterlichen Chromosomen in der Meiose bei einem Polyploiden, aufgrund des Vorhandenseins eines größeren Chromosomensatzes weit mehr Möglichkeiten als bei einem Diploiden. In den letzten Jahrzehnten wurden immer mehr Arbeiten bekannt, welche sich mit der Aufklärung der Problematik genetischer Analysen polyploider Organismen beschäftigen (Wu 2002). Auch für statistische Methoden, welche in erster Linie auf diploide Organismen ausgerichtet sind, gibt es Ansätze, polyploide Strukturen zu analysieren und in statistischen Modellen zu verrechnen.

nen (Wu et al. 2004). Insbesondere die mit den Züchtungsbemühungen an wichtigen polyploiden Nutzpflanzen, wie Kartoffel (tetraploid), oder Weizen (hexaploid), zusammenhängenden Arbeiten haben zum Einsatz von molekularen Marken beigetragen.

2.1.3. Vorgehensweise und Ziel der Arbeiten

Um die Selektion auf Hypersensibilitätsresistenz bei der Europäischen Pflaume zu optimieren und zu beschleunigen, sollten molekulare Marker gefunden werden, welche mit der Hypersensibilität gegenüber PPV eindeutig korrelieren, um diese zur markergestützten Selektion einsetzen zu können. Als Markertechnik wurde aufgrund der oben beschriebenen Vorteile die Anwendung von *Simple Sequence Repeats* (SSRs) gewählt. Der hohe Polymorphismusgrad und die Möglichkeit, vielfache Allele zu erkennen, sind bei einem polyploiden Organismus von großer Wichtigkeit.

Da die Syntenie zwischen einzelnen *Prunus*-Spezies sehr hoch ist (Jung et al. 2009) und eine gute Übertragbarkeit von vorhandenen *Prunus* SSR-Marker auf andere *Prunus*-Spezies nachgewiesen wurde (Wünsch 2009), wurden die Kenntnisse von diploiden *Prunus*-Arten herangezogen und SSR Marker von nah verwandten *Prunus*-Spezies zur Analyse in der Europäischen Pflaume verwendet. *Prunus armeniaca* (Aprikose) gehört wie *Prunus domestica* zur Subspezies der *Prunophora* (Decroocq et al. 2003), und somit ist die Europäische Pflaume mit der Aprikose enger verwandt als mit den weiteren *Prunus*-Spezies. Deshalb wurden bei der Auswahl der SSRs in erster Linie Marker gewählt, welche für die Aprikose entwickelt wurden oder auf die Aprikose übertragbar sind. Der Locus für die Hypersensibilitätsresistenz der Europäischen Pflaume gegenüber PPV ist nicht bekannt. Daher wurde eine große Anzahl an SSRs, welche über das gesamte Genom der *Prunus Reference Map* verteilt sind, ausgewählt und getestet, um möglichst das komplette Genom mittels der generierten SSR abzudecken.

Als zu testende Population wurde eine am Fachgebiet Obstbau der TUM generierte Nachkommenschaft der Kreuzungskombination 'Ortenauer' × 'Stanley' verwendet; deren Nachkommen spalten hinsichtlich des Merkmals Hypersensibilitätsresistenz auf (Hartmann 1997). Außerdem wurden die Selbstungsnachkommen der Eltern und eine Vergleichspopulation mit einem hypersensiblen und einem sensiblen Elternteil hinzugezogen ('Hoh 4517' × 'Jubiläum'). Die untersuchte Nachkommenschaft der Kreuzungskombination 'Ortenauer' × 'Stanley' umfasst 35 Individuen, wobei nur fünf Zuchtklone (14%) hypersensibel sind. 'Ortenauer', an sich eine stark PPV-empfindliche Sorte, gilt als Donor der Hypersensibilitätsresistenz. Der Genlocus für die Hypersensibilitätsresistenz muss in der Sorte 'Ortenauer' determiniert sein,

da der Großteil der Nachkommen der Selbstung von 'Ortenauer' eine hypersensible Reaktion zeigt (Hartmann 1998, Lichtenegger et al. 2012).

Für die Analyse der SSRs wurde die Methode nach Michelmore et al. (1991), mit welcher auf schnelle und einfache Weise genomische Marker für eine gewünschte Eigenschaft identifiziert werden können, geprüft. Bei der sog. *bulk segregant analysis* (BSA) werden die zu testenden Individuen zu zwei verschiedenen *bulks* vereinigt, welche sich möglichst nur in der gesuchten Eigenschaft unterscheiden. Diese Methode eignet sich auch für eine geringe Anzahl an Individuen (ebda.) und somit wurde sie für die vorliegende Untersuchung getestet. Aus der zu untersuchenden Population wurden Genotypen mit hohem, bzw. niedrigem Hypersensibilitätsindex zu zwei verschiedenen *bulks* vereinigt. Die beiden *bulks* sollten sich nur bezüglich der gesuchten Eigenschaft unterscheiden, alle anderen Merkmale sollten in jedem der *bulks* randomisiert verteilt vorhanden sein. Diese Art der Untersuchung hat sich bei der Bearbeitung ähnlicher Fragestellungen bewährt: Badenes et. al (2000) führten eine RAPD Marker-Analyse kombiniert mit einer BSA durch, um Marker für die männliche Sterilität und die Selbstfruchtbarkeit der Aprikose zu finden, und konnten mit zehn von 228 Primern spezifische Banden, welche in den *bulks* unterschiedlich ausfielen, detektieren; auch Claverie et al. (2004) setzten eine BSA ein, um Gene für die Resistenz gegen Wurzelhals-Nematoden bei Pflaume und Pfirsich zu lokalisieren. Durch eine Kombination der BSA mit einer RFLP- und einer SSR-Analyse konnten je zwei Loci bei Pfirsich und bei Pflaume detektiert werden, welche mit der Resistenz zusammenhängen.

2.2. MATERIAL UND METHODEN

2.2.1. Verwendete Pflanzen

Als Populationen wurden Nachkommen der Kreuzungskombination ‘Ortenauer’ × ‘Stanley’ und Selbstungsnachkommen beider Elternsorten gewählt. Stanley (‘Prune d’Agen’ × ‘Grande Duke’) ist eine sensible Sorte, während die Reaktion von ‘Ortenauer’ (Ursprung nicht bekannt) nach PPV-Infektion einen Sonderfall darstellt. Sie reagiert mit starken Nekrosen der Blattspreite, mitunter sterben auch einzelne Triebe des befallenen Baumes ab; es findet keine Lokalisierung des Virus statt (Hartmann 1998). Als Vergleichspopulation wurden außerdem Nachkommen der Kreuzung ‘Hoh 4517’ × ‘Jubiläum’ zur Untersuchung hinzugezogen. ‘Hoh 4517’ (‘Elena’ × ‘Hoh 512’) ist ein hypersensibler Zuchtklon von *Prunus domestica* aus dem Hohenheimer Genpool, ‘Jubiläum’ (‘Königin Viktoria’ × ‘The Czar’) eine PPV-sensible Sorte. Die Nachkommen dieser Kreuzungen wurden anhand der Doppelpfropfungsmethode nach Kegler et al. (1994) auf Hypersensibilität getestet: Die Nachkommen der Kreuzung ‘Ortenauer’ × ‘Stanley’ segregieren in hypersensible und nicht hypersensible Zuchtklone. Bei Selbstungen von ‘Stanley’ entstehen ausschließlich nicht hypersensible Nachkommen, während der Großteil der Nachkommen der Selbstung ‘Ortenauer’ × ‘Ortenauer’ starke hypersensible Reaktion gegenüber PPV zeigt. Bei der Kreuzungspopulation ‘Hoh 4517’ × ‘Jubiläum’ entstehen größtenteils nicht hypersensible (64%) und wenige hypersensible (11%) Nachkommen. In Abb. 2.2-1 ist die Anzahl der Nachkommen der jeweiligen Kreuzungskombination in die vier verschiedenen Hypersensibilitätsklassen (s. Kapitel 1, Absatz 1.3.1.2, Seite 11) eingeteilt.

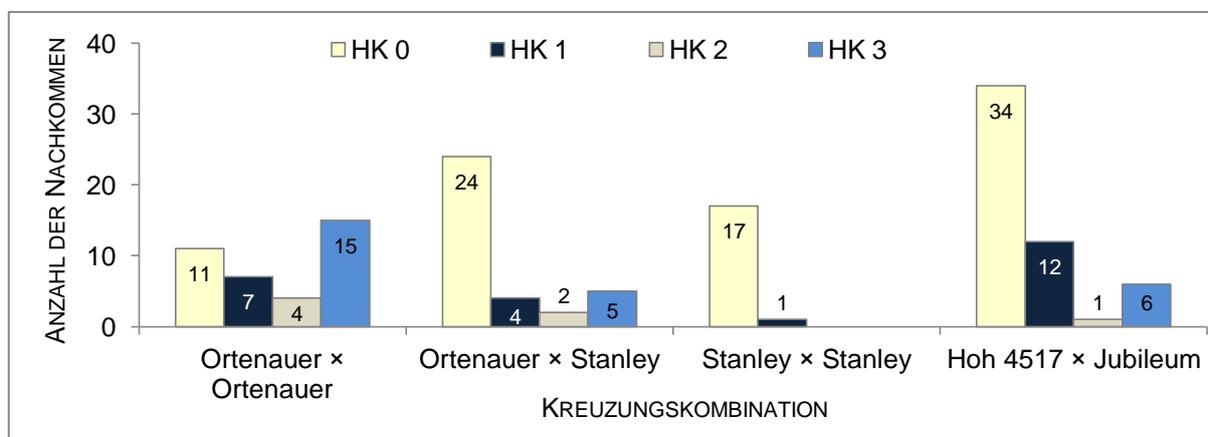


Abb. 2.2-1 Aufspaltung der Nachkommen der verwendeten Kreuzungskombinationen
Anzahl der Nachkommen der einzelnen Kreuzungskombinationen je Hypersensibilitätsklasse (HK 0-3)

In diesem Kapitel werden die Nachkommen, die in die Hypersensibilitätsklasse 0 (HK 0) eingestuft werden, als nicht hypersensibel und die Nachkommen der HK 3 als hypersensibel bezeichnet. Aus diesen beiden Hypersensibilitätsklassen wurden jeweils fünf bis sechs

Zuchtklone ausgewählt (s. Tab. 2.2-1) und für das SSR-Screening verwendet. Bei der Selbstung der Elternsorte 'Stanley' entstehen keine Nachkommen der HK 3, hier wurden nur Nachkommen der HK 0 getestet.

Tab. 2.2-1 Ausgewählte Zuchtklone

Auflistung der ausgewählten Zuchtklone, Sortierung nach Kreuzungskombination und Hypersensibilitätsklasse

Kreuzungskombination	Zuchtklon		Anzahl Zuchtklone je Kreuzungskombination
	HK 3 hypersensibel	HK 0 nicht hypersensibel	
Ortenauer x Ortenauer	Wei 494	Wei 496	12
	Wei 507	Wei 500	
	Wei 512	Wei 506	
	Wei 5125	Wei 510	
	Wei 514	Wei 513	
	Wei 517	Wei 516	
Ortenauer x Stanley	Wei 461	Wei 456	10
	Wei 463	Wei 457	
	Wei 472	Wei 460	
	Wei 479	Wei 464	
	Wei 484	Wei 467	
Stanley x Stanley		Wei 193	6
		Wei 194	
		Wei 198	
		Wei 199	
		Wei 208 Wei 209	
Hoh 4517 x Jubileum	Wei 5036	Wei 5031	10
	Wei 5044	Wei 5037	
	Wei 5048	Wei 5039	
	Wei 5345	Wei 5041	
	Wei 5385	Wei 5045	
Anzahl, gesamt			38

2.2.2. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte mit Angabe der Bezugsquelle für die Durchführung der weiteren Arbeitsschritte sind in Tab. 2.2-2 aufgelistet.

Tab. 2.2-2 Verwendete Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Name, Beschreibung	Firma, Ort
<i>Chemikalien, Oligonukleotide, Enzyme:</i>	
10x Taq-Puffer mit KCl	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
2-Propanol	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Agarose	Duchefa, Haarlem, (NL)
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe (D)
Borsäure	Roth, Karlsruhe (D)
Chloroform	Roth, Karlsruhe (D)
Dinatriummethylenediamintetra-Essigsäure (EDTA-Na ₂)	Roth, Karlsruhe (D)
dNTPs, <i>Desoxynucleotide Solution Mix</i>	New England BioLabs, Frankfurt am Main (D)
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe (D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
<i>Gene Ruler</i> 50 bp	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Harnstoff	Roth, Karlsruhe (D)
Hexadecyltrimethyl-Ammoniumbromid (CTAB)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
<i>HiDi-Formamide</i>	Applied Biosystems, Kalifornien (USA)
Hydrogenchlorid (HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Ladepuffer	Applied Biosystems, Kalifornien (USA)
<i>Long Ranger</i> 50%	Lonza, Basel (CH)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Natriummetabisulfid	Roth, Karlsruhe (D)
Oktanol	Roth, Karlsruhe (D)
Pop7-Polymer	Applied Biosystems, Kalifornien (USA)
Primer	Metabion, Martinsried (D)
Taq DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe (D)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
<i>Verbrauchsmaterial:</i>	
96-Well Platten	Sarstedt, Nümbrecht (D)
ABgene Klebefolien, Aluminium	Thermo Scientific, Roskilde (DK)
ABgene PCR-Platten, 48 Wells	Thermo Scientific, Roskilde (DK)
Mikro-UV-Küvetten	Brand, Wertheim (D)

SEPTA-Matten	Applied Biosystems, Kalifornien (USA)
Spritze, 60 ml	Brand, Wertheim (D)
<i>Geräte:</i>	
ABI 3130xl <i>Sequencer</i>	Applied Biosystems, Kalifornien (USA)
ABI Prism 377 DNA <i>Sequencer</i>	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg (D)
C1000 <i>Thermal Cycler</i>	Bio-Rad, München (D)
Elektrophorese Spannungsquelle EPS 3500	Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
Elektrophorese-System	Bio-Rad, München (D)
Exsikkatorkammer	Roth, Karlsruhe (D)
<i>Gel Hold Imager 2009</i>	Intas, Göttingen (D)
Wärmeschrank U27	Memmert, Schwabach (D)
Zentrifuge <i>Biofuge fresco</i>	Heraeus, München (D)
Zentrifuge Mikro 22R	Hettrich Zentrifugen, Tuttlingen (D)

2.2.3. DNA-Extraktion

Anfang Juli wurden von den 38 verschiedenen Zuchtklonen und den vier Elternsorten junge Blätter genommen und daraus die genomische DNA nach einer modifizierten CTAB-Methode (Lefort et al. 1999) extrahiert: 200 mg frisch genommene, junge Blätter wurden in 5 ml Puffer 1 (0,2 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,07 M EDTA (pH 8,0), 2 M NaCl, 0,02 M Natriummetabisulfit) gemörsert. 500 µl des entstandenen Pflanzensaftes wurden mit 450 µl des Puffers 2 (1,4 M NaCl, 0,02 M EDTA (pH 8,0), 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0), 2% Hexadecyltrimethyl-Ammoniumbromid) gemischt und 1 h bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde bei 4°C und 3000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Auf Eis wurden zu 500 µl des Überstandes 450 µl eines Chloroform:Oktanol-Gemisches (24:1) pipettiert und anschließend wieder bei 4°C und 3000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Zu 300 µl eiskaltem Isopropanol mit 150 µl 10 M Ammoniumacetat wurden 300 µl des Überstandes gegeben, auf dem Vortexer gemischt und für 25 Minuten bei -20°C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (4°C, 3000 rpm, 25 min) wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet mit 750 µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach weiterem Abzentrifugieren wurde der Überstand dekantiert, und die Pellets wurden bei offenem Reaktionsgefäß getrocknet.

Die isolierte DNA wurde anschließend in bidestilliertem Wasser gelöst und die Konzentration der DNA in Mikro-UV-Küvetten photometrisch (Wellenlänge 260 nm) bestimmt. Zur Qualitätskontrolle wurden außerdem die Wellenlängen 280 und 230 nm gemessen, um den Grad der Verunreinigung mit Proteinen oder Phenolen einzuschätzen. Die DNA-Ausbeute lag zwischen 60 und 800 µg/g Blattfrischsubstanz. Für die weiteren Untersuchungen wurde die DNA-Konzentration auf 100 µg/ml eingestellt. Die DNA wurde bei -20° C gelagert.

Für die *bulk segregant analysis* (BSA) wurde die DNA von hypersensiblen oder nicht hypersensiblen Genotypen nach Kreuzungskombination zu *bulks* vereinigt. Die *bulks* wurden aus Kombination von zwei, drei oder fünf bzw. sechs Individuen zusammengestellt (s. Tab. 2.2-3).

Tab. 2.2-3 Zusammenstellung der *bulks* für die *bulk segregant analysis*

Angabe der Zuchtklone pro *bulk* sowie deren Hypersensibilitätsklasse (HK) und Kreuzungskombination

Anzahl Zuchtklone	Zuchtklone	HK	Kreuzungskombination
2	Wei 494, Wei 507	3	Ortenauer x Ortenauer
2	Wei 512, Wei 5125	3	Ortenauer x Ortenauer
2	Wei 514, Wei 517	3	Ortenauer x Ortenauer
3	Wei 494, Wei 507, Wei 512	3	Ortenauer x Ortenauer
3	Wei 5125, Wei 514, Wei 517	3	Ortenauer x Ortenauer
6	Wei 494, Wei 507, Wei 512, Wei 5125, Wei 514, Wei 517	3	Ortenauer x Ortenauer
6	Wei 496, Wei 500, Wei 506, Wei 510, Wei 513, Wei 516	0	Ortenauer x Ortenauer
5	Wei 461, Wei 463, Wei 472, Wei 479, Wei 484	3	Ortenauer x Stanley
5	Wei 456, Wei 457, Wei 460, Wei 464, Wei 467	0	Ortenauer x Stanley
6	Wei 193, Wei 194, Wei 198, Wei 199, Wei 208, Wei 209	0	Stanley x Stanley

2.2.4. SSR Marker-Analyse

2.2.4.1. Auswahl und Prüfen der SSR Marker

Die Datenbank *Genome Database for Rosaceae* (GDR 2011, <http://www.rosaceae.org/>) wurde als Informationsquelle über bestehende Marker-Serien bei verschiedenen *Prunus*-Spezies genutzt. Aus dieser wurden insgesamt 127 SSR Marker (s. Tab. 2.2-4) ausgewählt und bei *Prunus domestica* geprüft. Bevorzugt wurden Marker, welche bereits in mehreren *Prunus*-Spezies zur Anwendung kamen und so eine gute Übertragbarkeit auf andere, verwandte *Prunus*-Spezies gezeigt haben. Ein Teil der Primer wurde vom Institut *National de la Recherche Agronomique* (INRA) in Bordeaux Aquitaine bzw. Avignon (Frankreich) zur Verfügung gestellt, weitere Primer wurden von der Firma Metabion, Martinsried, bezogen.

Tab. 2.2-4 Ausgewählte SSR Marker-Serien

Angabe der Ursprungsspezies, SSR-Serie mit Referenz, sowie die Anzahl der getesteten Marker je Serie

Spezies	SSR-Serie	Referenz	Anzahl getesteter SSR-Marker
<i>Prunus armeniaca</i>	AMPA	Hagen et al. 2004	7
<i>Prunus armeniaca</i>	Pac	Decroocq et al. 2003	10
<i>Prunus armeniaca</i>	PaCITA	Lopes et al. 2002	3
<i>Prunus armeniaca</i>	UDAp	Messina et al. 2004	15
<i>Prunus persica</i>	BPPCT	Dirlewanger et al. 2002	16
<i>Prunus persica</i>	CPPCT	Aranzana et al. 2002	9
<i>Prunus persica</i>	EPPB	Howad et al. 2005	4
<i>Prunus persica</i>	EPPCU	Mnejja et al. 2005	16
<i>Prunus persica</i>	M, MA	Yamamoto et al. 2001	11
<i>Prunus persica</i>	pchc(g)ms	Sosinski et al. 2000	3
<i>Prunus persica</i>	UDP	Cipriani et al. 1999, Testolin et al. 2000	16
<i>Prunus dulcis</i>	CPDCT	Mnejja et al. 2005	9
<i>Prunus dulcis</i>	EPDCU	Howad et al. 2005	1
<i>Prunus salicina</i>	CPSCT	Mnejja et al. 2004	5
<i>Prunus avium</i>	PMS	Cantini et al. 2001	1
<i>Prunus avium</i>	PS	Joobeur et al. 2000, Cantini et al. 2001	1
Anzahl, gesamt			127

Jeder einzelne Primer wurde anhand einer PCR mit der DNA von mindestens zwei der Elternsorten und einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese auf Amplifizierung überprüft. Der Ansatz der PCR wurde gemäß den PCR-Bedingungen von Decroocq et al. (2004) gewählt: 10 ng der extrahierten DNA einer Elternsorte, 0,4 µM eines jeden Primers, 0,1 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂ und 0,5 U Taq Polymerase wurden mit 10x Taq-Puffer zu einem Volumen von 20 µl ergänzt. Die Amplifikation wurde mit einem C1000 Thermal Cycler in ABgene PCR-Platten (48 Wells) durchgeführt, welche mit adhäsiven ABgene Klebefolien aus Aluminium abgedeckt wurden. In Tab. 2.2-5 sind die Temperaturregime der PCR dargestellt.

Tab. 2.2-5 Einstellungen der PCR

	T [°C]	t [sec]	
Denaturierung	92	30	35 Zyklen
Denaturierung	92	30	
Annealing	50-61	30	
Extension	72	45	
Final Extension	72	300	

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden 5 µl des PCR Ansatzes mit 1 µl Ladebuffer (Blue Dextran, 50 mg/ml; deionisiertes Formamid in 25 mM EDTA) gemischt und anschließend auf ein 2%iges Agarose-Gel in TBE-Puffer und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen. Als Längenmarker wurde eine DNA-Leiter, *Gene Ruler* 50 bp, verwendet. Die DNA-Fragmente wur-

den bei 50 V 120 Minuten elektrophoretisch getrennt. Abschließend wurden die Gele unter UV-Licht gesichtet und fotografiert.

Anhand der ungefähren Größe der amplifizierten Fragmente wurden jeweils zwei Primerpaare kombiniert, welche Fragmente unterschiedlicher Länge amplifizierten, um gewährleisten zu können, dass im späteren Screening die verschiedenen Fragmente nicht übereinander liegen. Bei jedem Primerpaar wurde jeweils der *forward* Primer am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff, 6-Fam oder Hex, markiert. Anschließend wurde mit jedem der SSR Primer und der DNA eines *bulks* oder der einzelnen Genotypen eine PCR (s. Seite 27 oben) durchgeführt. Die verschiedenen *bulks* (ein, zwei oder vier Individuen) wurden in unterschiedlichen DNA-Konzentrationen (10, 20, 30 ng) getestet. Nach Überprüfung der Amplifikate mit einer Agarose-Gelelektrophorese, wurden sie je nach Stärke der Banden im Agarose-Gel mit bidestilliertem, autoklaviertem Wasser verdünnt. Der Verdünnungsgrad mit Wasser wurde nach Erfahrungswerten abgeschätzt. Bei den meisten Läufen war diese Vorgehensweise passend, in wenigen Fällen war die Verdünnung zu gering und der Lauf wurde daraufhin mit nachverdünntem Ansatz wiederholt.

2.2.4.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Screening der Marker wurde in den Laboren des Lehrstuhls für Pflanzenzüchtung in Weihenstephan, TUM, durchgeführt. Der Test der Primer wurde anhand einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese zum Teil an einem ABI *Prism 377 DNA Sequencer* und zum Teil an einem ABI 3130xl *Sequencer* durchgeführt. Die beiden Geräte wurden zuvor auf Kompatibilität getestet und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER

Zur Durchführung der Analyse am ABI *Prism 377 DNA Sequencer* wurden die Proben wie folgt vorbereitet: Je 0,6 µl der PCR-Ansätze der bereits im Vorfeld kombinierten Primer (Hex und 6-Fam) wurden mit 1,4 µl des Standards ROX 362 (mit Fluoreszenzfarbstoff ROX markiert; Fragmentgrößen: 79, 91, 106, 131, 152, 184, 202, 254, 306, 338 und 362 bp; Lehrstuhl Pflanzenzüchtung, TUM) zu einem Gesamtvolumen von 2,6 µl ergänzt. Der Standard wurde vor Gebrauch mit Ladepuffer (Blue Dextran, 50 mg/ml; deionisiertes Formamid in 25 mM EDTA) im Verhältnis 1:1,4 gemischt. Anschließend wurde der Ansatz kurz zentrifugiert (10000 rpm), bei 95°C für 2 Minuten denaturiert und bis zur Auftragung auf das Gel auf Eis gelagert.

Für den Lauf am ABI 377 wurde ein 5%iges Polyacrylamidgel hergestellt. Dazu wurden 12,6 g Harnstoff, 3,5 ml Long Ranger 50% und 3,5 ml 10x TBE-Puffer (pH 8.0) gemischt und mit bidestilliertem, autoklaviertem H₂O auf ein Volumen von 35 ml aufgefüllt. In einer Exsikkator-

kammer wurde die Gellösung 30 Minuten entgast. Kurz vor dem Gießen wurden 24,5 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin) und 175 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat) beigemischt. Die Lösung wurde mit einer 60 ml Spritze in die Gelkammer gefüllt. Die weitere Vorbereitung und der Einbau der Gelkammer erfolgten nach Herstellerangaben. Je 1 µl der Proben wurde auf das Gel aufgetragen. Der Lauf wurde bei 3000 V für 2-3 h Stunden (je nach Fragmentgröße) durchgeführt.

Die Datenerfassung und –analyse erfolgte mit *ABI Prism 377 Collection 2.5/96* und der *GeneScan-Analysis* Software 2.0/95 (Applied Biosystems).

ABI 3130XL SEQUENCER

Für die Analyse am ABI 3130xl Sequencer wurden 96-Well-Platten verwendet, in welche je 0,3 µl Standard ROX 362 (Lehrstuhl Pflanzenzüchtung, TUM), 11,2 µl *HiDi-Formamide* pipetiert und anschließend 0,5 µl des PCR-Ansatzes (bei zwei Proben je 0,3 µl) dazugegeben wurden. Der Ansatz wurde abgedeckt, kurz zentrifugiert (10000 rpm), bei 95°C für 2 Minuten denaturiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Anschließend wurde die Platte mit einer SEPTA-Matte abgedeckt, die Platteneinheit zusammengefügt und der Lauf der Proben am ABI 3130xl nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Polymer wurde das Pop7-Polymer von ABI verwendet. Die Datenerfassung und –analyse erfolgte mit *GeneMapper* Version 4.0 (Applied Biosystems).

2.3. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der *bulk segregant analysis* (BSA) wurden mit der Einzelanalyse verglichen, um zu prüfen, ob eine BSA aussagekräftige Ergebnisse liefert. In der Auswertung der Fluoreszenzsignale der BSA mit der *GeneScan-Analysis* Software zeigte sich sowohl bei der Kombination von nur zwei Individuen, als auch bei mehreren Individuen (vier oder sechs), dass die Ausprägung der Peaks schwach, und somit schlecht erkennbar war, und vor allem, dass viele Signale verschiedener Individuen überlagert waren. Der Einsatz von unterschiedlichen DNA-Konzentrationen zeigte keine Veränderung der Ergebnisse. Auch die Interpretation der Ergebnisse von einigen der Einzelanalysen war schwierig, da der hohe Ploidiegrad von *Prunus domestica* zu einer Vielzahl von Fluoreszenzbanden, und somit zu vielen Peaks, führte. Mit der Einzelanalyse war möglich, manche Amplifikate einzelner SSR Markern auszuwerten und zu interpretieren, welches anhand der BSA nicht möglich gewesen wäre. So wurde zugunsten einer detaillierteren Interpretation der Ergebnisse der Ansatz einer *bulk segregant analysis* verworfen. Jedes Individuum wurde einzeln getestet und der dabei entstehende Mehraufwand für ein eindeutigeres Ergebnis in Kauf genommen.

Insgesamt wurden 127 SSR Marker in den hypersensiblen und nicht hypersensiblen Nachkommen der Eltern 'Ortenauer' und 'Stanley', sowie 'Hoh 4517' und 'Jubiläum', getestet. Beim Test der Elternsorten bildeten 21 der SSR Marker keine oder nur sehr schwache Amplifikate unter den Standard-PCR-Bedingungen. Bei weiteren vier Markern waren die amplifizierten Fragmente größer als für SSR erwartet: für den Test des Markers BPPCT036 wurde ein längerer ROX-Standard (bis 700 bp) verwendet, die anderen drei SSR Marker (AMPA124, BPPCT035 und CPDCT047) wurden nicht weiter verwendet, da diese noch längere Fragmente bildeten. Somit verblieben 103 Primerpaare, welche eine geeignete Amplifikatlänge in den Elternsorten erzielten. Von diesen wurden 87 SSRs (85%) als polymorph in *Prunus domestica* eingestuft. In den Tabellen 2.3-1, 2.3-2 und 2.3-3 sind alle 127 SSRs mit den Ergebnissen zu Amplifizierung, Polymorphismus und Allel-Größenbereich der amplifizierten Fragmente dargestellt.

Alle getesteten SSR Marker, welche ursprünglich in *Prunus armeniaca* entwickelt wurden (s. Tab. 2.3-1), sind auch in *Prunus domestica* polymorph. Neun von insgesamt sechzehn der nicht polymorphen SSR Marker, d. h. 53% der Marker, stammen aus der Serie EPPCU (Ursprung: *P. persica*). Die Marker der PAC-Serie (Decroocq et al. 2004), welche bereits in *Prunus domestica*, und sogar in der Sorte 'Stanley', getestet wurden, liefern für 'Stanley' Allele in einem ähnlichen Größenbereich wie bei Decroocq et al. Nur der Marker PacB22 zeigte in der vorliegenden Arbeit sehr viele, überlagerte Banden. Eine Auswertung bzw. Benennung der einzelnen Fragmente war nicht möglich.

Tab. 2.3-1 Verwendete SSR Marker der Ursprungsspezies *P. armeniaca*

Ergebnisse der PCR: Amplifizierung, Polymorphismus und Allel-Größenbereich in den genannten Populationen von *P. domestica* L.

Spezies	SSR	Amp.* ¹	n. p.* ²	Allel-Größenbereich [bp]	Spezies	SSR	Amp.* ¹	n. p.* ²	Allel-Größenbereich [bp]	
<i>P. armeniaca</i>	AMPA100	x		133-149	<i>P. armeniaca</i>	UDAp-407	x		194-262	
	AMPA101	x		177-244		UDAp-415	x		129-175	
	AMPA107	x		167-206		UDAp-416	x		78-91	
	AMPA109	x		199-240		UDAp-420	x		152-176	
	AMPA121	x		104-292		UDAp-422	x		155-193	
	AMPA123	x		178-202		UDAp-436	x		102-108	
	AMPA124	* ³		-		UDAp-439	x		88-125	
	PacA10	x		85-115		UDAp-444	x		103-170	
	PacA18	x		150-194		UDAp-446	x		129-166	
	PacA33	x		172-201		UDAp-456	x		133-188	
	PacA49	x		102-250		UDAp-457	x		136-174	
	PacB22	x		* ⁴		UDAp-467	x		181-234	
	PacB26	x		170-193		UDAp-472	x		106-209	
	PacB35	x		217-235		UDAp-483	-		-	
	PacC13	x		115-153		UDAp-485	x		166-201	
	PacC25	x		185-195						
	PacC3	x		128-163						
PACITA6	-		-							
PACITA12	x		131-168							
PACITA16	-		-							
					Anzahl, gesamt		32	0		

*¹: Amplifikate vorhanden, *²: nicht polymorph,
*³: Amplifikate zu groß, *⁴: zu viele, überlagerte Banden

Tab. 2.3-2 Verwendete SSR Marker der Ursprungsspezies *P. dulcis*, *P. salicina* und *P. avium*

Ergebnisse der PCR: Amplifizierung, Polymorphismus und Allel-Größenbereich in den genannten Populationen von *P. domestica* L.

Spezies	SSR	Amp.* ¹	n. p.* ²	Allel-Größenbereich [bp]
<i>P. dulcis</i>	CPDCT008	x		187-236
	CPDCT016	x		131-191
	CPDCT023	x		168-193
	CPDCT028	x		132-189
	CPDCT035	-		-
	CPDCT041	-		-
	CPDCT044	x		162-261
	CPDCT045	x		122-151
	CPDCT047	* ³		-
	EPDCU3489	x	x	154-173
<i>P. salicina</i>	CPSCT012	x		139-170
	CPSCT021	x		125-185
	CPSCT022	x		151-203
	CPSCT027	x		11-196
	CPSCT033	-		-
<i>P. avium</i>	PMS67	x		141-152
	PS08E08	-		-
Anzahl, gesamt		13	1	

Tab. 2.3-3 Verwendete SSR Marker der Ursprungsspezies *P. persica*Ergebnisse der PCR: Amplifizierung, Polymorphismus und Allel-Größenbereich in den genannten Populationen von *P. domestica* L.

Spezies	SSR	Amp.* ¹	n. p.* ²	Allel-Größenbereich [bp]	Spezies	SSR	Amp.* ¹	n. p.* ²	Allel-Größenbereich [bp]
<i>P. persica</i>	BPPCT001	x		121-172	<i>P. persica</i>	M12a	x		163-229
	BPPCT007	x		126-151		M6a	x		179-229
	BPPCT008	x		93-195		MA005c	x		148-194
	BPPCT009	x		121-164		MA010a	x		103-116
	BPPCT010	x		111-142		MA013a	x		181-224
	BPPCT011	x		147-172		MA015a	x		292-332
	BPPCT012	x		124-169		MA017a	x	x	125-181
	BPPCT018	-		-		MA020a	x		160-195
	BPPCT022	x	x	90-97		MA024a	-		-
	BPPCT024	x		77-110		MA027a	x		96-141
	BPPCT025	x		156-196		MA039a	x		170-196
	BPPCT030	x		136-181		pchcms04	x		214-242
	BPPCT035	* ³		-		pchgms05	-		-
	BPPCT036	x		237-436		pchgms10	x		221-227
	BPPCT040	x		124-155		UDP96-003	x	x	79-82
	BPPCT041	x		206-230		UDP96-005	x		106-149
	CPPCT018	-		-		UDP96-008	x		123-143
	CPPCT025	x		216-218		UDP96-018	x		91-284
	CPPCT03	-		-		UDP96-019	x		* ⁴
	CPPCT030	-		-		UDP97-402	-		-
	CPPCT04	-		-		UDP98-022	-		-
	CPPCT052	x		105-157		UDP98-024	x		76-114
	CPPCT13	-		-		UDP98-406	-		-
	CPPCT23	x	x	166-168		UDP98-408	-		-
	CPPCT24	x		139-198		UDP98-409	x		123-150
	EPPB4217	x	x	107-124		UDP98-410	x		129-150
	EPPB4225	x		106-166		UDP98-411	x		121-196
	EPPB4229	-		-		UDP98-412	-		-
	EPPB4230	x		178-223		UDP98-412	x		95-231
	EPPCU0004	x		173-192		UDP98-416	x	x	83
	EPPCU1090	x	x	118-161		Anzahl, gesamt	61	15	
	EPPCU1775	x		146-175		* ¹ : Amplifikate vorhanden, * ² : nicht polymorph,			
	EPPCU1902	x	x	167-177		* ³ : Amplifikate zu groß, * ⁴ : zu viele, überlagerte Banden			
	EPPCU2005	x		149-168					
	EPPCU2256	x		148-181					
	EPPCU3664	x	x	90-100					
	EPPCU4921	x	x	114-118					
	EPPCU5176	x	x	97-105					
	EPPCU5516	x		157-172					
	EPPCU9168	x	x	174-180					
	EPPCU9268	x	x	187					
	EPPCU9300	x		122-154					
EPPCU9338	x	x	174-229						
EPPCU9343	x		188-218						
EPPCU9366	x	x	213-219						

Cipriani et al. (1999) testeten neun Marker der UDP-Serie in 'Stanley'. Die Ergebnisse zum Größenbereich der amplifizierenden Fragmente stimmen bei fünf Markern mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein, ein Marker zeigt übereinstimmend keine Amplifikation (UDP98-408). Drei der UDP-Marker (UDP96-019, UDP97-402 und UDP98-406) brachten im Gegensatz zu Cipriani et al. keine verwendbaren Ergebnisse.

Die Größe der Fragmente, welche sich bei den einzelnen Zuchtklonen bildeten, wurde für jeden SSR Marker ausgewertet und der prozentuale Wert des Auftretens der Fragmente in hypersensiblen und nicht hypersensiblen Zuchtklonen, unabhängig von der Kreuzungskombination, errechnet. Sieben SSRs wurden gefunden, welche möglicherweise mit der Hypersensibilität, bzw. Sensibilität, korrelieren: diese SSRs segregierten mit einer höheren prozentualen Wahrscheinlichkeit entweder in den nicht hypersensiblen oder in hypersensiblen Zuchtklonen. Ein SSR, UDAp-472, segregierte mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in hypersensiblen Zuchtklonen, die weiteren sechs SSRs in den nicht hypersensiblen Zuchtklonen. In Tab. 2.3-4 sind diese sieben Marker mit dem jeweiligen amplifizierten Fragment, welches zu einem höheren prozentualen Wert in nicht hypersensiblen oder hypersensiblen Zuchtklonen vorkam, aufgelistet. Die Amplifikate aller anderen Marker waren in nicht hypersensiblen und hypersensiblen Zuchtklonen gleichverteilt. Eine Auflistung aller verwendeten SSR-Marker mit den erhaltenen Amplifikaten in den Elternsorten finden sich im Anhang (s. Tabelle I, Seite 121).

Tab. 2.3-4 Segregation der sieben Marker in hypersensiblen und nicht hypersensiblen Zuchtklonen

Angabe der Größe [bp] desjeweiligen Fragments und der Prozentzahl, mit welcher dieses Fragment in entweder hypersensiblen oder nicht hypersensiblen Zuchtklonen auftaucht

SSR	Fragment-Größe [bp]	Segregation in hypersensiblen Zuchtklone [%]	Segregation in nicht hypersensiblen Zuchtklone [%]
CPPCT24	139	36	84
pchcms04	241	35	64
pchgms10	227	18	58
UDAp-420	186	37	58
UDAp-444	129	36	74
UDAp-472	209	53	37
UDP96-005	109	45	74
UDP96-005	138	45	95

2.4. DISKUSSION

Obwohl sich eine BSA bei ähnlichen Untersuchungen als zielführend erwiesen hat, und so eine große Menge an Individuen auf ein Merkmal hin untersucht werden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit der Ansatz einer BSA zugunsten von Einzelanalysen aller Individuen verworfen. Beispielsweise wandten Claverie et al. (2004) erfolgreich eine BSA zur Überprüfung von RFLP und SSR Marker in resistenten und sensiblen Genotypen von diploiden Myrobalanen-Populationen gegenüber Wurzelhals-Nematoden an. Bei der Durchführung der SSR Marker-Analyse in der Europäischen Pflaume ergaben die Testläufe im *bulk* allerdings undeutliche Ergebnisse. Da der Großteil der verwendeten SSR Marker in der Europäischen Pflaume bisher nicht getestet wurde und aufgrund der Polyploidie des *P. domestica*-Genoms in den meisten Fällen viele Amplifikate erzielt wurden, erwies es sich als problematisch, die DNA mehrerer Individuen in einem Ansatz zu testen. Die Fragmente der einzelnen Individuen waren in der Analyse im *bulk* nur als Bandenprofil erkennbar. Die Bildung von Fragmenten, welche sich nur geringfügig in ihrer Länge voneinander unterschieden (1-5 bp), hatte zur Folge, dass die Auswertung dieses Bandenprofils über die *GeneScan-Analysis* Software 2.0/95 nicht möglich war. Die visuelle Unterscheidung der Bandenprofile von hypersensiblen und nicht hypersensiblen Zuchtklonen erschien zu ungenau. In der Einzelanalyse, welche im Vergleich durchgeführt wurde, konnten die unterschiedlichen Amplifikate für Zuchtklone einer Hypersensibilitätsklasse detektiert werden.

Die Verwendungsmöglichkeit von SSRs innerhalb verschiedener *Prunus*-Arten ist gut untersucht, und es ist bekannt, dass die Übertragbarkeit von SSRs zwischen verwandten Arten besser ist, je näher diese miteinander verwandt sind (Dirlewanger et al. 2002, Decroocq et al. 2003, Dondini et al. 2007). Somit war eine hohe Wahrscheinlichkeit gegeben, dass SSRs, die in der Aprikose anwendbar sind oder ursprünglich für diese entwickelt wurden, auch auf die Europäische Pflaume übertragbar sind. Dies konnte mit den Ergebnissen der vorliegenden SSR Marker-Analyse bestätigt werden. Beim Test von insgesamt 127 SSR Markern aus verwandten *Prunus*-Arten, zeigte sich bei 81% der getesteten SSRs eine gute Übertragbarkeit auf *Prunus domestica*, und 69% der SSRs waren zudem polymorph. Die Syntenie der Genome der verschiedenen *Prunus*-Spezies scheint trotz unterschiedlichen Ploidiegrades sehr hoch zu sein.

Mit drei Markern der UDP-Serie (UDP96-019, UDP97-402 und UDP98-406) und dem Marker PacB22 wurden keine verwendbare Fragmente amplifiziert (zu viele, überlagerte Banden), in anderen Arbeiten (Cipriani et al. 1999, Decroocq et al. 2004) mit denselben Markern in der Sorte 'Stanley' jedoch schon. Ursache dafür könnte sein, dass in den genannten Arbeiten die Amplifikate anhand eines Agarosegels aufgetrennt wurden und die Auswertung der Signale visuell durchgeführt wurde. Durch die Analyse mittels eines Sequenzierers (Polyakrylamid-

gel, Analyse-Software) werden die Fragmente besser aufgetrennt und somit deutlichere Ergebnisse erhalten, was in der vorliegenden Arbeit teils zu überlagerten, nicht auswertbaren Banden in der Elektrophorese geführt hatte.

Der Locus oder die Loci, die die genetische Information für die Hypersensibilitätsresistenz von *Prunus domestica* gegenüber PPV enthalten, ist/sind nicht bekannt. Daher ist es auch möglich, dass die verwendeten SSRs weit entfernt von den Resistenz-Loci liegen. Um mit dieser Vorgehensweise eine Aussage über einen unbekanntem Genlocus treffen zu können, müsste das Markernetz „engmaschiger“ angelegt sein. Dazu müssten mehr Informationen über das Genom von *P. domestica* vorliegen, um so den gesuchten Genlocus mit höherer Wahrscheinlichkeit zu erfassen.

Bei der Marker-Analyse konnte keine hinreichend hohe Korrelation eines SSR Markers oder einer Kombination von Markern mit der Hypersensibilitätsresistenz, bzw. der Sensibilität gegenüber PPV gefunden werden: Einer von diesen Markern (UDAp-472) segregierte mit einer Wahrscheinlichkeit von 53% in hypersensiblen Zuchtklonen und zu 37% in nicht hypersensiblen Zuchtklonen. Der Marker UDP96-005 segregierte mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% in nicht hypersensiblen Zuchtklonen, allerdings auch zu 45 % in hypersensiblen Zuchtklonen. Es konnte kein Marker bzw. keine Kombination von Markern gefunden werden, mit welchem/welcher hypersensible Zuchtklone eindeutig identifiziert werden konnten.

Nach Abgleich der Lokalisierung dieser sieben Marker auf dem *Prunus* Referenz-Genom (GDR 2009) wurde entdeckt, dass drei der Marker (CPPCT24, pchcms4 und UDP96-005) im Referenz-Genom auf Chromosom G1 lokalisiert sind. Im Genom der Aprikose befindet sich auf LG1 (*linkage group 1*) ein Locus für die Scharka-Resistenz. Vergleicht man die Position der Marker mit der Lokalisierung des bekannten Scharka-Resistenzlocus, ist festzustellen, dass der Marker, der diesem Locus am nächsten liegt (UDP96-005), als einziger zwei Fragmente bildete, welche mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in nicht hypersensiblen Zuchtklonen auftauchten. Bei der Scharka-Resistenz der Aprikose handelt es sich um keine Hypersensibilitätsresistenz. Letztere Ausprägungsform der Resistenz liegt – soweit bekannt – innerhalb der *Prunus*-Spezies nur bei *Prunus domestica* vor. Es ist daher anzunehmen, dass zwischen der genetischen Lokalisierung der Hypersensibilitätsresistenz und der PPV Resistenz der Aprikose kein Zusammenhang besteht.

Es sprechen einige Hinweise dafür, dass die Hypersensibilitätsresistenz eine oligogen bzw. polygen vererbte Eigenschaft ist. Neumüller und Hartmann (2008) verwiesen darauf, dass die Hypersensibilitätsresistenz der Europäischen Pflaume gegenüber PPV offensichtlich eine quantitative Eigenschaft ist, da die Symptome bei PPV-Infektion zwischen einzelnen Zuchtklonen sehr variabel ausgeprägt werden. Es gibt nicht nur Genotypen mit PPV-Symptomen (Sensibilität) oder mit starken nekrotischen Reaktionen in Form von Triebspitzendürre bei Inokulation durch Doppelpfropfung (Hypersensibilität), sondern auch Genotypen mit schwä-

chere Ausprägungsformen der Hypersensibilität. Bestätigt wird dies auch durch Beobachtungen an Nachkommen der Kreuzung 'Ortenauer' × 'Stanley', welche in dieser Arbeit verwendet wurden. Diese Population spaltet nicht nur in nicht hypersensible und stark hypersensible Nachkommen auf, sondern es gibt auch einige Zuchtklone mit schwacher Hypersensibilität. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Hypersensibilitätsresistenz eine monogen bedingte Eigenschaft ist, gering. Quantitative, variable Eigenschaften sind meist polygen vererbt und werden von mehreren Genen gesteuert. Durch die „kombinierte Wirkung“ von zahlreichen Genen, kommt die Ausprägung der Resistenz zustande. Im Vergleich zur monogen bedingten Resistenz, wird eine polygen vererbte Resistenz als dauerhaft angesehen (Becker 2011).

Auch bei der genetischen Kontrolle der Scharka-Resistenz der Aprikose werden die Theorien von der Codierung durch zwei Loci (Dosba et al 2001), durch drei (Guillet-Bellanger et al. 2001) oder durch einen einzigen Locus (Dicenta et al. 2000), durch neuere Ergebnisse mit der Annahme einer polygenen genetischen Determinierung (Dondini et al. 2010), bzw. einem Hauptlocus (*PPVres*) auf LG1 und mehreren Nebenloci abgelöst (Ruiz et al. 2011). Ausgehend vom Locus auf LG1 konnten Soriano et al. (2011) erstmals drei SSR Marker generieren, durch deren Anwendung mit hoher Wahrscheinlichkeit resistente Genotypen von sensiblen Genotypen aus unterschiedlichen Zuchtpopulationen unterschieden werden können. Dieser Arbeit gingen zahlreiche Vorarbeiten voraus, aus welchen *linkage maps* verschiedener Aprikosensorten entstanden sind, und so SSRs für den Bereich um den bekannten Resistenzlocus generiert werden konnten.

2.5. ZUSAMMENFASSUNG UND BEWERTUNG

Von Nachkommen der Kreuzungen 'Ortenauer' × 'Stanley', 'Hoh 4517' × 'Jubiläum' und Selbstungsnachkommen der beiden Eltern, welche bereits auf Hypersensibilitätsresistenz getestet worden waren, wurden hypersensible und nicht hypersensible Zuchtklone ausgewählt. Insgesamt wurden 42 Individuen zusammengestellt, mit welchen eine SSR Marker-Analyse durchgeführt wurde, um mögliche Marker für die Hypersensibilitätsresistenz gegenüber PPV in der Europäischen Pflaume zu entdecken. Als SSR Marker wurden 127 bereits bekannte SSRs aus verwandten *Prunus*-Arten, wie Aprikose, Pfirsich und Mandel, ausgewählt und darauf geachtet, dass durch diese eine weitgehende Verteilung über das *Prunus* Referenz-Genom erreicht wurde. Von den getesteten SSRs waren 69% polymorph, es konnten allerdings keine Marker identifiziert werden, welche hinreichend mit der Hypersensibilitätsresistenz korrelierten.

Die beschriebene Vorgehensweise, SSRs, welche in den nächsten verwandten Spezies generiert wurden und angewendet werden, zur Untersuchung einer Spezies hinsichtlich eines bestimmten Genlocus zu verwenden, ist eine bekannte Anwendungsmöglichkeit. Mit dieser Methode molekulare Marker für einen bestimmten Resistenzlocus in einer Spezies mit ungenauem Wissensstand über deren Entstehungsgeschichte und geringen Kenntnissen über die genetische Lokalisierung der Resistenz, zu generieren, bringt jedoch Schwierigkeiten mit sich. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der Einsatz von in verschiedenen *Prunus*-Spezies generierten SSR Markern in *Prunus domestica* problemlos möglich ist, dass jedoch für die Identifizierung von brauchbaren Markern, weitere, intensive Arbeit zur Erforschung des hexaploiden Genoms der Europäischen Pflaume notwendig ist.

Am Beispiel der bei der Aprikose ausgeführten Arbeiten ist ersichtlich, dass trotz Kenntnis von einem für die Scharka-Resistenz verantwortlichen Genlocus, die Entwicklung von praxiseinsetzbaren Markern schwierig ist und noch nicht zu praxisverwertbaren Ergebnissen geführt hat. Die Schwierigkeiten der Analysen bei der Aprikose bestehen nach Ruiz et al. (2011) vor allem darin, dass die Resistenz aufgrund des Phänotyps häufig falsch eingestuft wird und dass sich deshalb bisherige Marker-Analysen bei der Validierung der Marker in weiteren Populationen nicht als zielführend herausstellten.

Der Aufwand, der für die Entwicklung und Validierung eines Markersystems notwendig ist, muss mit dem Nutzen einer solchen Analyse abgewogen werden. Im Fall der Aprikose scheint es notwendig, da die einzig bekannte Selektionsmethode auf Scharkaresistenz aufwendig durchzuführen ist und zu langen Verzögerungen im Züchtungsprozess führt. Bei der Europäischen Pflaume jedoch, bei welcher Pflanzen auf Hypersensibilitätsresistenz mittels Doppelveredlung (s. Kapitel 1, Absatz 1.3.1.2, Seite 11) getestet werden können, steht ein praktisches System zur Selektion zur Verfügung: Anhand einer scharkainfizierten Zwischen-

veredlung kann innerhalb eines Jahres zuverlässig festgestellt werden, ob eine Pflanze hypersensibel ist. Zum derzeitigen Wissensstand überwiegt der Aufwand der Entwicklung von molekularen Markern bei der Europäischen Pflaume den Nutzen des Einsatzes solcher Marker.

Eine interessante Herangehensweise den Mechanismus der HR gegenüber PPV besser verstehen zu können, wäre allerdings, an der Resistenz beteiligte Gene zu identifizieren. Auf diese Weise konnte beispielsweise ein Genlocus der Aprikose für die Scharkaresistenz identifiziert werden: Dondini et al. (2004) nutzten dazu bekannte Sequenzen von Resistenzgenen aus krautigen Pflanzen, um mit diesen analoge Resistenzgene bei der Aprikose zu identifizieren. So konnte unter anderem eine spezifische Sequenz für scharkaresistente Genotypen gefunden werden. Die gleiche Methode wurde angewandt um eine *resistance map* für *Prunus* zu erstellen. Sequenzen von Kandidatengen für Virusresistenzen wurden in einer BAC-Bibliothek von Pfirsich hybridisiert, wodurch 42 mögliche Resistenzloci gefunden wurden, welche als Referenz für weitere Untersuchungen verwendet werden können (Lalli et al., 2005). Dieser Ansatz könnte auch für die Europäische Pflaume angewandt werden, um Gensequenzen zu identifizieren, die an der Ausprägung der Hypersensibilitätsresistenz beteiligt sind.

Eine weitere Möglichkeit den Resistenzmechanismus der Hypersensibilität eingehender zu untersuchen, könnte durch die Identifizierung der Resistenz-auslösenden Proteine geschehen. Bei Kenntnis des Auslösers der Hypersensiblen Reaktion könnten Rückschlüsse auf die korrespondierenden Gensequenzen in der Pflanze gezogen werden. Im folgenden Kapitel wird die Untersuchung des Auslösers der HR beim Scharkavirus dargestellt.

3. Untersuchung einzelner PPV-Genomabschnitte hinsichtlich des Auslösers der hypersensiblen Reaktion bei der Europäischen Pflaume

3.1. EINLEITUNG

Die Nutzung von virus-basierten Vektoren zur Expression von fremden Gensequenzen in Pflanzen ist in den letzten Jahrzehnten eine häufig angewandte Methodik geworden, welche weitreichende Möglichkeiten bietet. Das sog. „Amplikon“-Expressionssystem, wobei Pflanzengenome mit vollständigen cDNA-Kopien des Genoms von Virusvektoren transformiert werden, kombiniert die genetische Stabilität der transgenen Pflanzen mit der erhöhten Replikationsrate der Pflanzenviren. Diese Anwendung kann für die Übertragung verschiedener Gene genutzt werden und ist unabhängig vom Virus, auf welchem sie basiert (Calvo et al. 2010). Für das Plum pox virus wurden verschiedene Expressions-Vektoren konstruiert, durch welche Sequenzen – aus anderen PPV-Isolaten oder von Markergenen - erfolgreich in den transfizierten Pflanzen exprimiert werden konnten. Das Plum pox virus bietet einige Vorteile hinsichtlich der Verwendung als Expressionsvektor: 1) die Expression des Virus durch ein einzelnes, großes Polyprotein sichert die einheitliche Expression aller seiner Produkte und auch die von fremden, eingefügten Genen, 2) keine Beschränkungen bei der Verpackung der flexiblen Viruspartikel und 3) der weite Wirtspflanzenbereich, welcher neben verschiedenen *Prunus*-Arten auch krautige Pflanzen, wie *Nicotiana*-Arten oder *Arabidopsis thaliana*, umfasst, ermöglicht die Forschung an experimentellen Pflanzen und auch die Untersuchung von agronomisch wichtigen Nutzpflanzen (García et al. 2006).

Verschiedene Arten PPV-basierter Vektoren wurden entwickelt, so zum Beispiel Vektoren für die Genexprimierung von kleinen Peptiden, welche mit dem Hüllprotein verbunden sind. Die Peptide werden auf der Oberfläche des Hüllproteins gebunden und so wird eine Immunisierung gegen Pathogene erreicht (Fernández-Fernández et al. 2002). Zudem sind vielfältige Vektoren entwickelt worden, welche zusätzlich zum Virusgenom unabhängige Gene wie β -Glucuronidase (GUS) oder *green fluorescent protein* (GFP) exprimieren oder welche Bereiche aus der Gensequenz unterschiedlicher PPV-Isolate enthalten und zur Studie in den holi- zigen Wirtspflanzen von PPV verwendet werden (García et al. 2006).

López-Moya und García (2000) konstruierten den cDNA-Klon pIC-PPV, bei welchem gegenüber der zuvor entwickelten Klone von PPV (pT-PPV (Riechmann et al. 1990), pC-PPV) einige Optimierungen vorgenommen wurden: Durch Verwendung des 35S-Promotors und das Einfügen eines Introns in der P3-Region ist pIC-PPV einfacher zu manipulieren und zu benutzen. Bakterienkolonien, welche mit pIC-PPV transformiert wurden, wachsen schneller und die Ausbeute an Plasmidgehalt nach der Isolierung ist im Vergleich mit den anderen beiden Klonen höher. Außerdem ist die Infektiosität von pIC-PPV sowohl bei mechanischer, als auch bei biolistischer Inokulation gesteigert. cDNA-Klone von pIC-PPV mit unterschiedlichen Modifikationen (z. B. verschiedene Isolate von PPV, zusätzlich eingefügte Gensequenz des *green fluorescent protein*) wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die Zielstellung dieses Arbeitspunktes war es, die PPV-Genomabschnitte, die in Zusammenhang mit der für die Auslösung der Hypersensiblen Reaktion (HR) verantwortlichen Genregion stehen, einzugrenzen. Zu diesem Zweck wurde ein cDNA-Klon benötigt, welcher *P. domestica* infizieren und eine HR auslösen kann, und ein weiterer cDNA-Klon, der keine HR initiieren kann. Durch Bildung von Chimären aus diesen beiden Klonen, in welchen bestimmte Gensequenzbereiche gegeneinander ausgetauscht wurden, und Überprüfung der Reaktion von hypersensiblen Genotypen bei Infektion mit den Chimären, sollten Rückschlüsse auf die Notwendigkeit der untersuchten Genregion für die Auslösung der HR gezogen werden können.

3.2. MATERIAL UND METHODEN

3.2.1. Verwendete Pflanzen

Für die verschiedenen Versuche kamen anfällige und hypersensible In-vitro-Pflanzen der Europäischen Pflaume zum Einsatz. Mittels Meristemkultur wurden die Kultivare 'Jojo' (hypersensibel), 'Wei 235' (hypersensibel), 'Wei 240' (hypersensibel), 'Hauszwetsche, Typ Schüfer' (anfällig) und 'Weiwa[®]' (= 'Wangenheims', anfällig) *in vitro* auf den Medien BMV/2 und C₂D (Neumüller 2011), herangezogen und vermehrt. Nach ca. achtwöchigem Wachstum wurden die Pflanzen für die verschiedenen Versuche verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass alle verwendeten Pflanzen in einem ähnlichen Entwicklungsstatus waren. Die Pflanzen wurden in der Klimakammer bei 21°C unter Langtagsbedingungen (16 h) kultiviert.

3.2.2. PPV-cDNA-Klone

Verschiedene cDNA-Klone wurden von Juan-Antonio García, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC (Madrid), zur Verfügung gestellt. Die cDNA-Klone enthielten die komplette PPV-Sequenz, welche zwischen einen 35S-Promoter des *Cauliflower mosaic virus* und einer Nopalin-Synthase eingefügt wurde. Die cDNA-Klone pIC-PPV-5'BD-GFP (Salvador et al. 2008) und pIC-PPV-NK-GFP (Fernández-Fernández et al. 2001) enthalten außerdem die Sequenz für das grün-fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP), welche sich zwischen den Sequenzbereichen von NIb und dem Hüllprotein (*coat protein*, CP) befindet. Eine schematische Darstellung aller cDNA-Klone findet sich in Abb. 3.2-1 auf Seite 42.

Beschreibung der cDNA-Klone:

pIC-PPV-NK-GFP enthält die PPV-Sequenz des PPV-Isolats Rankovic (D-Stamm), welches die Fähigkeit, Prunus-Wirtspflanzen zu infizieren, verloren hat, nachdem es ausgiebig in krautigen Pflanzen vermehrt wurde (Fernández-Fernández et al. 2001, Salvador et al. 2008).

pIC-PPV-5'BD-GFP ist eine Chimäre aus dem Isolat Rankovic (Nukleotide 6932-9786) und dem Isolat Dideron (D-Stamm; Nukleotide 1-6931). Für das Isolat Dideron wurde gezeigt, dass es fähig ist, Pfirsich-Sämlinge, aber keine krautigen Pflanzen, zu infizieren (Salvador et al. 2008).

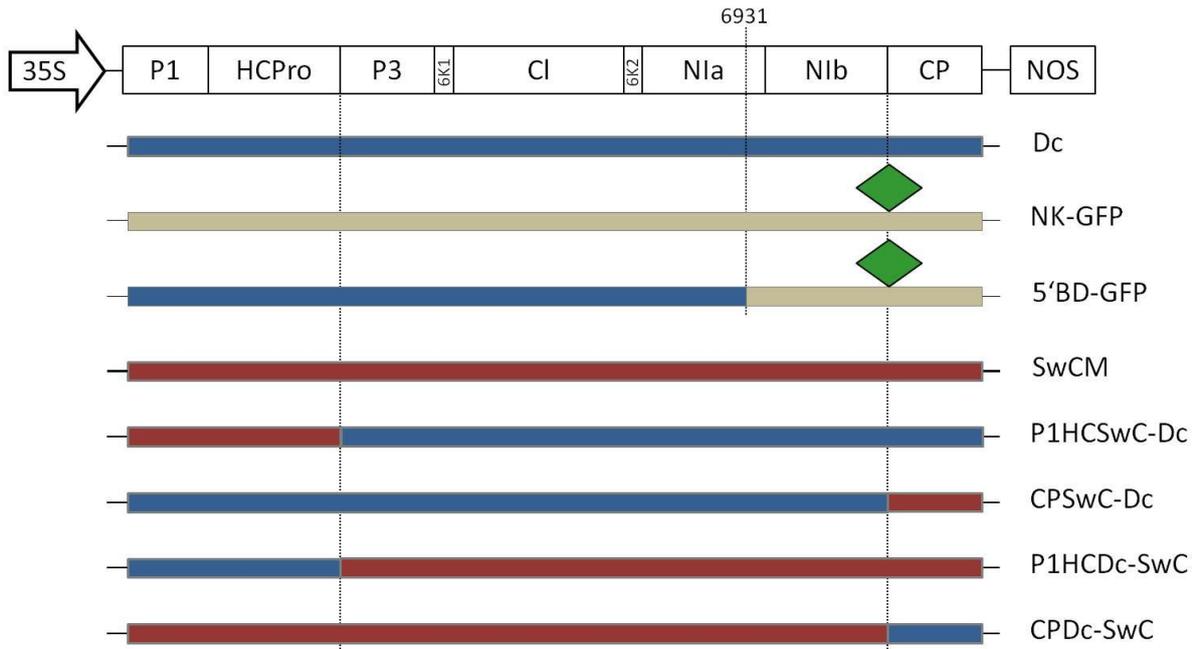


Abb. 3.2-1 Schematische Darstellung der PPV-cDNA-Klone Dc (blau), NK (beige), SwCM (rot) und der daraus entstandenen Chimären

Die Positionen der Schnittstellen zur Konstruktion der Chimären sind mit vertikalen Linien gekennzeichnet. Für die Schnittstelle zur Konstruktion der Chimäre 5'BD ist die entsprechende Nukleotidzahl angegeben, die Schnittstellen der anderen Chimären befinden sich zwischen HCpro und P3, bzw. zwischen N1b und CP. Die Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) ist zwischen den Sequenzen N1b und CP eingefügt und als grüne Raute im Schema dargestellt.

pIC-PPV-Dc enthält die PPV-Sequenz des Isolats Dideron (D-Stamm).

pIC-PPV-SwCM enthält die PPV-Sequenz des *SweetCherry*-Isolats (C-Stamm).

P1HCSwC-Dc, CPSwC-Dc, P1HCDc-SwC und CPDc-SwC sind Chimären aus den beiden oben genannten Konstrukten, bei welchen entweder die P1HCpro-Region oder die CP-Region jeweils durch die Sequenz des anderen Konstrukts ersetzt wurde:

P1HCSwC-Dc: Chimäre, die die PPV-Dc Sequenz enthält und die P1HCpro-Sequenz durch die Sequenz von PPV-SwCM ausgetauscht wurde

CPSwC-Dc: Chimäre, die die PPV-Dc Sequenz enthält und die CP-Sequenz durch die Sequenz von PPV-SwCM ausgetauscht wurde

P1HCDc-SwC: Chimäre, die die PPV-SwCM Sequenz enthält und die P1HCpro-Sequenz durch die Sequenz von PPV-Dc ausgetauscht wurde

CPDc-SwC: Chimäre, die die PPV-SwCM Sequenz enthält und die CP-Sequenz durch die Sequenz von PPV-Dc ausgetauscht wurde

Die jeweilige cDNA in den zur Verfügung gestellten Lösungen wurde mit einem Polyacrylamidgel geprüft und die Konzentration mit einem UV-Spektrophotometer gemessen und auf 1 µg/µl eingestellt. Die Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3. Methoden zur Infektion von *in vitro* kultivierten Pflanzen

3.2.3.1. Biolistische Inokulation

Zur biolistischen Inokulation der In-vitro-Pflanzen wurde das PDS-1000/He *Particle Delivery System* der Firma Bio-Rad Laboratories (Kalifornien, USA) verwendet. Die Arbeit mit dem PDS-1000/He sowie alle weiteren Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Durchführung der biolistischen Inokulation der Pflanzen sind in Tab. 3.2-1 aufgelistet.

Tab. 3.2-1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte zur biolistischen Inokulation

Name, Beschreibung	Firma, Ort
2-Propanol, ACS	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Analysenwaage	Mettler Toledo, Gießen (D)
Kalziumchlorid (CaCl ₂), wasserfrei 96%	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Ethanol (EtOH), absolut p. a.	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Glycerol, 99+%	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Gold Partikel, 0,3-3 µm	ChemPur, Karlsruhe (D)
Wasser (H ₂ O), DEPC-behandelt, steril, autoklaviert	Roth, Karlsruhe (D)
Helium 5.0	Linde, Unterschleißheim (D)
<i>Macrocarrier</i>	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien (USA)
Mikrozentrifugenröhrchen, Polypropylen (<i>low-bind</i>), 1,5 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
<i>Particle Delivery System</i> PDS-1000/He	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien (USA)
<i>Rupture Disks</i> 600, 900, 1100 psi	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien (USA)
Spermidin	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
<i>Stopping Screens</i>	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien (USA)
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg (D)
Tungsten Partikel M-5 0,4 µm	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien (USA)
Vakuumpumpe RZ8	Vacuubrand, Wertheim (D)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)

Die Vorbereitung der Inokulation und die Beschichtung der Goldpartikel wurden wie folgt vorgenommen (nach den Richtlinien von Bio-Rad und den Angaben von Kikkert (1993)):

Vorbereitung:

- H₂O: bidestilliert, autoklaviert, Lagerung in Aliquots bei -20°C
- CaCl₂ (2,5 M): sterilfiltriert, Lagerung in Aliquots bei -20°C

- Spermidin (0,1 M): sterilfiltriert, frisch hergestellt
- Glycerol (50%): sterilfiltriert, Lagerung in Aliquots bei -20°C
- Autoklavieren der **Macrocarrier**, vor Gebrauch werden diese kurz in 70%igem Ethanol (EtOH) sterilisiert, Trocknung im sterilen Raum
- **Rupture disks** werden vor dem Einlegen in das *Retaining cap* kurz in 70%iges Isopropanol getaucht
- Autoklavieren der **Stopping screens**
- Herstellen der **Microcarrier** (Goldpartikel-Lösung): gemäß der Bedienungsanleitung von Bio-Rad (http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_9075.pdf, Stand: 04.02.2013), Aufbewahrung der Aliquots max. zwei Wochen bei 4°C

Beschichten der Gold-Partikel:

- Vortexen der *Microcarrier* für 10 min

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden sehr zügig und unter ständigem Mischen der Mikrozentrifugenröhrchen auf dem Vortexer durchgeführt, um eine Agglomeration der Goldpartikel zu verhindern.

- 50 µl *Microcarrier* in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen geben,
5 µl Plasmidlösung,
50 µl CaCl₂ (2,5 M),
20 µl Spermidin (0,1 M) zufügen
- Mischen auf dem Vortexer für weitere 5 Minuten
- Sedimentation der Partikel für 1 Minute
- Zentrifugieren, 5 Sekunden bei 8000 rpm
- Überstand vorsichtig abnehmen und verwerfen
- 140 µl 70% EtOH zugeben
- EtOH abnehmen und verwerfen
- 140 µl 100% EtOH zugeben
- EtOH abnehmen und verwerfen
- 48 µl 100% EtOH zugeben
- Pellet durch vorsichtiges „Schnippen“ mit den Fingern an den unteren Rand des Reaktionsgefäßes resuspendieren, anschließend bei geringer Geschwindigkeit mit dem Vortexer mischen

Die Inokulation wurde gemäß der Bedienungsanleitung von Bio-Rad (http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_9075.pdf, Stand: 04.02.2013), durchgeführt. Nach der biologischen Inokulation wurden die Pflanzen in frisches Medium gesetzt und anschließend in der Klimakammer unter Standardbedingungen (s. Seite 41) weiterkultiviert.

Die biologische Inokulation wurde entsprechend folgender Parameter durchgeführt:

Tab. 3.2-2 Parameter für die Durchführung der biolistischen Inokulation

DNA	DNA-Größe	12 kb
	Menge DNA pro Bombardement	ca. 5 µl (1 µg/µl)
Microcarrier	Material <i>Microcarrier</i>	Gold
	Größe <i>Microcarrier</i>	0,3-3,0 µm
	Menge <i>Microcarrier</i> pro Bombardement	ca. 8 µl (60 mg/ml)
Experimentelle Details	Helium-Druck	verschiedene
	Ziel-Distanz	9 cm
	Vakuum	22-25 inHg

In der ersten Untersuchungsreihe wurden *in vitro* kultivierte Pflanzen der hypersensiblen Sorte 'Jojo', des hypersensiblen Zuchtklons 'Wei 240', sowie der anfälligen Sorten 'Hauszwetsche, Typ Schüfer' und 'Weiwa[®]' mit den beiden PPV-cDNA-Klonen pIC-PPV-5'BD-GFP und pIC-PPV-NK-GFP (hier nur 'Jojo' und 'Weiwa[®]') inokuliert. Zwischen der Inokulation der einzelnen Sorten und der verschiedenen Klone wurden jeweils zwei Pflanzen eines Zuchtklons mit einer Goldlösung ohne Viruspartikel beschossen, um mögliche Kontaminationen auszuschließen.

Die Pflanzen wurden nach der Inokulation auf frisches Medium gesetzt und für 21 Tage in der Klimakammer bei den üblichen Bedingungen (s. Seite 41) kultiviert. Nach den 21 Tagen wurden die Pflanzen umgesetzt und dabei einzelne Blätter sowie der Kallus, der sich an der basalen Schnittstelle der Sprosse bildete, zum Virusnachweis mittels ELISA (s. Absatz 3.2.4, Seite 46) abgenommen. Von den infizierten Pflanzen wurden außerdem zu verschiedenen Zeitpunkten einzelne Blätter abgenommen und auf GFP-Expriemierung untersucht (s. Absatz 3.2.5, Seite 47).

3.2.3.2. In-vitro-Veredlung

Zur In-vitro-Veredlung wurden durch biolistische Inokulation infizierte In-vitro-Pflanzen als Unterlage verwendet. Die Pflanzen wurden auf dem Medium BMV/2 kultiviert, da sie auf diesem Medium wenige Seitensprosse bildeten und die Sprossachse gestreckter war als auf dem Nährmedium C₂D. Bei ausreichender Stärke der Sprossachse wurde die Triebspitze abgeschnitten und mit einer Rasierklinge ein vertikaler Schnitt in den verbleibenden Spross eingefügt. Von der zu infizierenden Pflanze wurde eine Triebspitze abgenommen, das basale Ende mit einem V-Schnitt versehen und in die Unterlage geschoben. Die veredelte Pflanze wurde anschließend auf Medium P6 kultiviert, auf dem die Pflanzen nur wenige Seitensprosse bilden, der terminale Trieb aber weiterwächst. Nach ca. 6-8 Wochen wurde das Edelreis von der Unterlage abgenommen und auf Medium BM/V₂ gesetzt. Nachdem sich neue Blätter

gebildet hatten, konnten Proben für einen PPV-Test genommen werden. Die In-vitro-Veredlung sowie die Probennahme wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Veredlungsversuche wurden mit der anfälligen Sorte 'Weiwa[®]' als Unterlage und verschiedenen Genotypen von *Prunus domestica* als Edelsorten durchgeführt. Vorab wurden die hochvermehrten 'Weiwa[®]'-Unterlagen mittels ELISA auf PPV-Infektion getestet.

3.2.4. Virusnachweis mittels ELISA

Der Nachweis von PPV wurde mit *Double Antibody Sandwich* ELISA (DAS-ELISA) mit den inokulierten oder veredelten In-vitro-Pflanzen durchgeführt. Für den Test wurden Antikörper der Fa. AMR lab, Barcelona (Spanien), nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Probenmaterial wurden den In-vitro-Pflanzen einzelne Blätter, Triebe und basal gebildetes Kallusgewebe abgenommen. Die Auswertung der Tests wurde entsprechend den Nachweismethoden für Quarantäneschaderegner der *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO 2004) vorgenommen.

Tab. 3.2-3 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte zur Durchführung des DAS-ELISA

Name, Beschreibung	Firma, Ort
<i>Magic</i> DAS-ELISA 5B-IVIA <i>universal</i>	AMR lab consultants, Barcelona (ES)
Nunc-Immuno-Platte, F96 Maxisorp, zertifiziert	Thermo Fisher Scientific, Roskilde (DK)
Nunc-Deckel, universal, PS	Thermo Fisher Scientific, Roskilde (DK)
Wärmeschrank U27	Memmert, Schwabach (D)
Columbus <i>Washer</i>	Tecan, Salzburg (A)
<i>Sunrise Absorbance Reader</i>	Tecan, Salzburg (A)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃), wasserfrei, p. a.	Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃), p. a.	Merck, Darmstadt (D)
PBS-Puffer (1xDulbecco's)	Applichem, Darmstadt (D)
Tween 20, zur Synthese	Merck, Darmstadt (D)
Polyvinylpyrrolidon (K15)	Applichem, Darmstadt (D)
Albumin Fraktion V (pH 7,0)	Applichem, Darmstadt (D)
Natriumdiethyldithiocarbamat Trihydrat (DIECA)	Applichem, Darmstadt (D)
Diethanolamin, <i>Reagent grade >98%</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
p-Nitrophenylphosphat, Dinatriumsalz-Hexahydrat	Applichem, Darmstadt (D)

3.2.5. Virusnachweis mittels GFP-Expriemierung

Im Blattgewebe von Pflanzen, welche mit den oben genannten GFP-codierenden cDNA-Konstrukten infiziert wurden, konnte das *Plum pox virus* anhand der GFP-Expriemierung nachgewiesen werden. GFP gibt nach Anregung mit blauem Licht ($\lambda=395$ nm) grünes Licht mit einer Wellenlänge von 509 nm ab. Die grüne Fluoreszenz ist sowohl im konventionellen Fluoreszenzmikroskop als auch im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop detektierbar.

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem III RS Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Die verwendeten Filter in diesem System enthalten einen Anregungsfilter (436 nm), einen Farbteiler (510 nm) und einen Sperrfilter (520 nm). Für die photographische Dokumentation wurde eine Zeiss Axiocam MRc mit dem entsprechenden Programm AxioVision 4.8 genutzt.

Detailliertere Bilder konnten am Lehrstuhl für Phytopathologie (WZW, TUM) mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop DM 6000 B (Leica, Nussloch; Anregungs- und Sperrfilter: 488 nm und 510 nm) und dem AxioImager Z1M von Zeiss aufgenommen werden.

3.3. ERGEBNISSE

3.3.1. Biolistische Inokulation

21 Tage nach der biolistischen Inokulation wurden die In-vitro-Pflanzen mittels ELISA auf PPV-Infektion getestet. Die Infektionsrate von Inokulationen mit dem Viruskonstrukt pIC-PPV-5'BD-GFP betrug bei hypersensiblen Genotypen 10%, bei anfälligen Sorten 40-50%. Die Inokulation mit diesem Konstrukt führte bei jeder Sorte und bei dem Zuchtklon 'Wei 240' zu mindestens einer PPV-positiven Pflanze (s. Tab. 3.3-1). Inokulationen mit dem Viruskonstrukt pIC-PPV-NK-GFP, von welchem bekannt ist, dass es keine holzigen, sondern nur krautige Pflanzen infizieren kann, konnte durch biolistische Inokulation keine Pflanze infiziert werden.

Tab. 3.3-1 Anzahl der mit den cDNA-Konstrukten pIC-PPV-NK-GFP und pIC-PPV-5'BD-GFP infizierten In-vitro-Pflanzen

* PPV-positiv getestet mittels ELISA, 21 Tage nach Inokulation; Anzahl PPV-positiver Pflanzen rot geschrieben; gelb hinterlegt: anfällige Sorten, blau hinterlegt: hypersensible Sorte/Zuchtklon

cDNA-Konstrukt		Anzahl PPV-infizierter Pflanzen*/ Gesamtzahl inokulierter Pflanzen			
Schema (s. Abb. 3.2-1)	Name	Hauszwetsche	Weiwä®	Jojo	Wei 240
	pIC-PPV-5'BD-GFP	5/5	4/10	1/10	1/10
	pIC-PPV-NK-GFP	-	0/10	0/10	-

Die zwei hypersensiblen Pflanzen ('Jojo' und 'Wei 240') zeigten nach einigen Wochen Symptome wie Chlorosen an den Blattadern und Nekrosen (s. Abb. 3.3-1 C) und starben ca. drei Monate später ab. Die PPV-anfälligen Sorten und auch alle Negativkontrollen zeigten keine Symptome der PPV-Infektion.



Abb. 3.3-1 PPV-infizierte In-vitro-Pflanzen

A) 'Hauszwetsche, Typ Schüfer'; 70 Tage nach Inokulation; B) 'Jojo', 1 Tag nach Inokulation; C) 'Jojo', 40 Tage nach Inokulation

3.3.2. In-vitro-Veredlung

Als weitere Methode zur Infektion von hypersensiblen und anfälligen Genotypen wurde die In-vitro-Veredlung getestet. Zur Durchführung mussten bereits PPV-infizierte In-vitro-Pflanzen vorhanden sein, um so durch Veredlung die PPV-Infektion von einer Pflanze auf eine andere zu übertragen. Durch die Anwendung der biolistischen Inokulation mittels PDS-1000/He konnten bereits einige anfällige Pflanzen infiziert und in ausreichender Anzahl kultiviert werden. Eine bei der Veredlung technisch zu überwindende Schwierigkeit war, dass die ineinander veredelten Pflanzen anfangs sehr instabil waren, und sich die Edelsorten leicht aus den Unterlagen lösen konnten. In 60-100% aller mit infizierten Unterlagen veredelten Pflanzen verlief die Übertragung des Virus auf das Edelreis erfolgreich, und PPV konnte im Edelreisgewebe mittels DAS-ELISA nachgewiesen werden (s. Tab. 3.3-2). Beim anfälligen Zuchtklon 'Wei 247' starben sowohl PPV-infizierte, als auch PPV-negative Pflanzen ab. Ursache dafür waren jedoch Kontaminationen im Medium.

Tab. 3.3-2 Ergebnisse der In-vitro-Veredlung

Angabe der verschiedenen Sorten bzw. Zuchtklone von *Prunus domestica*, welche durch In-vitro-Veredlung erfolgreich veredelt wurden und in welchen PPV mittels ELISA nachgewiesen werden konnte (¹: hypersensibel resistent, ²: quantitativ resistent, ³: anfällig)

Sorte/ Zuchtklon	Gesamtzahl Pflanzen	Anzahl erfolg- reiche Vered- lung	Anzahl PPV- positiv	% PPV- positiv	Anzahl PPV- positiv und abgestorben	Anzahl PPV- negativ	% PPV- negativ	Anzahl PPV- negativ und abgestorben
Jojo ¹	10	10	9	90	9	1	10	0
Wei 243 ¹	8	6	6	100	5	0	0	0
Hoh 2043 ²	10	10	7	70	0	3	30	1
Hauszwetsche ³	10	10	6	60	0	4	40	0
Wei 247 ³	17	14	10	71	2	4	29	3

3.3.3. Virusnachweis mittels GFP-Expression

Bei Pflanzen, in deren Gewebe PPV mittels ELISA nachgewiesen werden konnte, wurde die GFP-Exprimierung mit dem Fluoreszenz-Mikroskop überprüft. Vergleichsweise wurden die beschossenen Negativkontrollen der jeweiligen Sorten betrachtet. Die Bilder, welche mit dem III RS Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop gemacht wurden, sind in Abb. 3.3-2 A und B dargestellt. In einzelnen Blättern der PPV-positiven Pflanzen konnte die GFP-Exprimierung festgestellt werden. Bei der Negativkontrolle konnte keine grüne Fluoreszenz gefunden werden, nur die rote Autofluoreszenz des Chlorophylls.

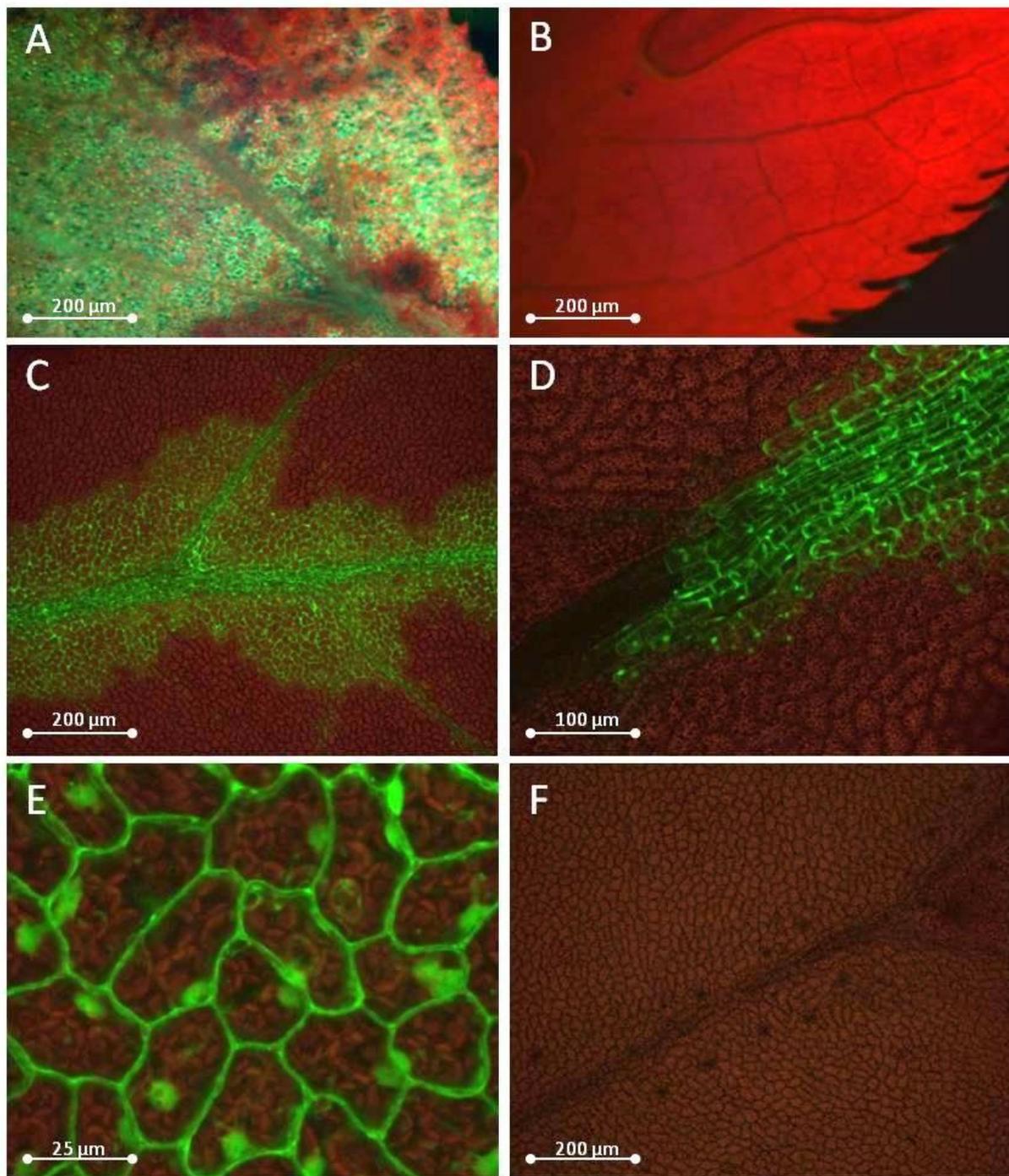


Abb. 3.3-2 GFP-Exprimierung in der anfälligen Sorte 'Hauszwetsche, Typ Schüfer'

A) PPV-infiziert, B) PPV-frei; beides Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop C)-E) PPV-infiziert, F) PPV-frei; C)-F) konfokales Laser-Scanning-Mikroskop

Zur genaueren Betrachtung der GFP-Exprimierung wurden diese Pflanzen im Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet und Aufnahmen gemacht. Hier konnte die Verteilung des Virus innerhalb der Pflanzenteile genauer und in höherer Auflösung betrachtet werden (s. Abb. 3.3-2 C-F). Die Virusverteilung zeigte sich in der anfälligen Sorte 'Weiwa[®]' gleichermaßen, wie in der Sorte 'Hauszwetsche, Typ Schüfer'. Das GFP-markierte Virus breitet sich von der Blattspreite in die kleineren Blattadern und in das umliegende Blatt-Gewebe aus. In der

PPV-freien Negativkontrolle ist wiederum nur die Autofluoreszenz des Chlorophylls zu sehen.

3.3.4. Inokulation von In-vitro-Pflanzen mit verschiedenen PPV-cDNA-Klonen

Die Inokulationsversuche mit den beiden cDNA-Klonen, welche von den PPV-Stämmen PPV-D und PPV-C abgeleitet sind, und deren Chimären, wurden nach der Methode zur biolistischen Inokulation (s. Kapitel 3.2.3.1 auf Seite 43) durchgeführt. Die *in vitro* kultivierten Pflanzen der Sorten 'Weiwa[®]', 'Hauszwetsche, Typ Schüfer' und 'Jojo' sowie des Zuchtklons 'Wei 235' wurden mittels PDS-1000/He mit den einzelnen cDNA-Klonen inokuliert und 21-60 Tage nach der Inokulation auf PPV mittels ELISA untersucht. Pro cDNA-Klon wurden mindestens zehn Pflanzen inokuliert (s. Tab. 3.3-3). Die verminderte Angabe der Gesamtzahl der inokulierten Pflanzen in Tab. 3.3-3, kommt dadurch zustande, dass zwischen Inokulation und PPV-Test Kontaminationen in den Kulturröhrchen gefunden wurden, und so diese Pflanzen verworfen wurden.

Tab. 3.3-3 Anzahl der mit den verschiedenen cDNA-Konstrukten infizierten In-vitro-Pflanzen

* PPV-positiv getestet mittels ELISA, 21-60 Tage nach Inokulation; Anzahl PPV-positiver Pflanzen rot geschrieben; gelb hinterlegt: anfällige Sorten, blau hinterlegt: hypersensible Sorte/Zuchtklon

cDNA-Konstrukt		Anzahl PPV-infizierter Pflanzen*/ Gesamtzahl inokulierter Pflanzen			
Schema (s. Abb. 3.2-1)	Name	Hauszwetsche	Weiwa [®]	Jojo	Wei 235
	pIC-PPV-Dc	1/10	1/20	0/10	0/20
	pIC-PPV-SwCM	0/10	1/9	1/10	0/9
	P1HCDc-SwCM	0/10	1/10	0/10	0/8
	P1HCSwC-Dc	0/9	1/8	0/6	1/8
	CPDc-SwCM	5/10	-	4/10	-
	CPSwC-Dc	1/10	-	0/10	-

Der PPV-Test aller Pflanzen wurde zwischen 21 und 30 Tagen nach der Inokulation durchgeführt. Die mit pIC-PPV-Dc inokulierten Pflanzen wurden 60 Tage nach der Inokulation wiederholt getestet, wonach bei einer weiteren Pflanze ('Hauszwetsche') PPV nachgewiesen werden konnte. Auffällig ist, dass bei Inokulation mit der Chimäre CPDc-SwCM, welche das Genom von PPV-SwC enthält und lediglich die Hüllprotein-Gensequenz durch die des D-Stammes ausgetauscht wurde, 40-50% der Pflanzen infiziert wurden, während mit allen anderen Klonen und Chimären maximal 10% der Pflanzen infiziert wurden.

Die PPV-infizierten Pflanzen wurden weiteren Tests unterzogen. Die Pflanzen wurden ca. alle vier Wochen auf neues Medium umgesetzt und dabei Proben zum PPV-Test genommen. 60-90 Tage nach der Inokulation konnte mittels ELISA in keiner der hypersensiblen

Pflanzen, welche 21-60 Tage nach Inokulation PPV-positiv waren, PPV nachgewiesen werden. Auch für die anfällige Pflanze 'Weiwa[®]', welche mit der Chimäre P1HCDc-SwCM inokuliert wurde, konnte keine PPV-Infektion bestätigt werden (s. Tab. 3.3-4).

Tab. 3.3-4 Anzahl der mit den verschiedenen cDNA-Konstrukten infizierten In-vitro-Pflanzen

* PPV-positiv getestet mittels ELISA, 60-90 Tage nach Inokulation; Anzahl PPV-positiver Pflanzen rot geschrieben; gelb hinterlegt: anfällige Sorten, blau hinterlegt: hypersensible Sorte/Zuchtklon

cDNA-Konstrukt		Anzahl PPV-infizierter Pflanzen*/ Gesamtzahl bisher infizierter Pflanzen			
Schema (s. Abb. 3.2-1)	Name	Hauszwetsche	Weiwa [®]	Jojo	Wei 235
	pIC-PPV-Dc	1/1	1/1	-	-
	pIC-PPV-SwCM	-	1/1	0/1	-
	P1HCDc-SwCM	-	0/1	-	-
	P1HCSwC-Dc	-	1/1	-	0/1
	CPDc-SwCM	5/5	-	0/4	-
	CPSwC-Dc	1/1	-	-	-

Weitere Tests wurden durchgeführt (80-90 dpi ELISA und 110-120 dpi ELISA), wobei sich das Ergebnis bestätigte, dass keine hypersensible Pflanze, allerdings die meisten anfälligen Pflanzen (bis auf 'Weiwa[®]' inokuliert mit P1HCDc-SwC) PPV-infiziert waren.

3.4. DISKUSSION

3.4.1. Entwicklung der Inokulationsmethode

Bei der Beschichtung der Goldpartikel mit den Viruskonstrukten kam es mit manchen Viruskonstrukten zur teilweisen Verklumpung der Gold-Virus-Lösung. Dadurch wurde die Viruskonzentration bei der Inokulation und somit die Infektionsrate vermindert. Die Verklumpungen fanden nicht bei allen, sondern nur bei einzelnen Viruskonstrukten statt, und in Vergleichsversuchen zeigte sich, dass die Verklumpungen ausschließlich auf einzelne Plasmid-Isolierungen zurückgeführt werden konnten und nicht abhängig vom Viruskonstrukt oder der Methodik der Beschichtung waren. Der Isolierungsschritt wurde am *Centro Nacional de Biotecnología*-CSIC in Madrid durchgeführt, wo diese Problematik ebenfalls bemerkt wurde. Vermutet wird, dass bei manchen Plasmid-Isolierungen Rückstände zurückbleiben, welche zur Konglomeration der Goldpartikel führen. Die Art der Rückstände ist derzeit noch nicht geklärt. Die biolistische Inokulation ist kein Standardverfahren und die Entwicklung der Methode für die vorliegende Arbeit zeigte sich sehr aufwendig; keines der Experimente konnte mit einer höheren PPV-Infektionsrate als 10% durchgeführt werden. So wurde die biolistische Inokulation mit der In-vitro-Veredlung ergänzt: Mit der biolistischen Inokulation musste mindestens eine Pflanze je cDNA-Klon infiziert werden, um diese vermehren zu können und anschließend mit der In-vitro-Veredlung eine größere Anzahl an Pflanzen infizieren zu können. Bei der In-vitro-Veredlung mit PPV-infizierten Unterlagen wurde eine 60-100%ige Infektionsrate der veredelten Edelreiser erhalten und erwies sich somit als geeignete Methode, den Versuch weiterzuführen.

Mit der biolistischen Inokulation mittels PDS-1000/He konnte bei der Inokulation von 10-20 Pflanzen pro Experiment, eine Infektionsrate von maximal 10% erreicht werden. Vergleichbare Untersuchungen, d. h. Verwendung des PDS-1000/He zur PPV-Inokulation von In-vitro-Pflanzen der Art *Prunus* sind nicht bekannt und somit stehen keine Vergleichswerte zur Verfügung. Es gibt zahlreiche Arbeiten zur PPV-Inokulation von *Nicotiana*-Arten (Calvo et al. 2010, Nagyová et al. 2012), bzw. von krautigen Pflanzen (Decroocq et al. 2009), aber wenige zur Inokulation von *Prunus*-Arten. Beispielsweise untersuchten Salvador et al. (2008) das PPV-Genom hinsichtlich der Lokalisierung der Gen-Region, welche die Infektion von krautigen und holzigen Pflanzen unterscheidet. Dabei wurden neben *Nicotiana benthamiana*, auch einige Pfirsich-Sämlinge mit PPV-Konstrukten mittels Helios *Gene Gun* (BIORAD) biolistisch inokuliert und infiziert. Durch die Verwendung von Sämlingspflanzen und der Helios *Gene Gun*, bei welcher die zu inokulierenden Pflanzen keinem Vakuum ausgesetzt werden, sondern, ähnlich wie mit einer Pistole, „beschossen“ werden, wird die Inokulation unter anderen

Bedingungen durchgeführt. So konnten die Parameter, welche bei Salvador et al. (2008) verwendet wurden, nicht auf die vorliegende Arbeit übertragen werden.

Die Inokulation von hypersensiblen In-vitro-Pflanzen stellte sich im Versuch schwieriger dar als die Inokulation von anfälligen In-vitro-Pflanzen. Bei den anfälligen Zuchtklonen konnte eine Infektionsrate von über 40% erreicht werden. Allerdings scheint die Infektion von *P. domestica* generell aufwendiger zu sein als die Infektion von krautigen Pflanzen (Martínez-Gómez et al. 2000). Lediglich auf sehr junge Sämlinge von *Prunus mahaleb* bzw. auf *in vitro* vermehrte Sämlinge von *Prunus avium* konnte PPV-C bisher übertragen werden (Boeglin et al. 2004, Fanigliulo et al. 2004). Dallot et al. (2001) konnten nur drei Sämlinge ('St. Julien Nr. 2') von insgesamt 23 Pflanzen mittels mechanischer Abreibung mit Pflanzensaft von PPV-infizierten *Nicotiana benthamiana* systemisch infizieren. Dagegen ist die mechanische Inokulation von krautigen Pflanzen vergleichsweise leicht mit hoher Infektionsrate durchzuführen (Decroocq et al. 2006, Salvador et al. 2008, Calvo et al. 2010). Predajňa et al. (2010) entwickelten eine einfache, effiziente Methode zur biologischen Infektion von *Nicotiana benthamiana* mittels einem Luftgewehr bzw. einer Druckluftpistole. Mit dieser Methode konnten sie *Nicotiana benthamiana* mit PPV-Vektoren infizieren und diese Art der Anwendung bzw. die Durchführung der Inokulation mit dem PDS/1000-He –System sollte auch auf *Prunus domestica* übertragen werden, es konnte jedoch bisher keine In-vitro-Pflanze von *P. domestica* mit PPV infiziert werden (mündliche Information, Glasa 2010).

3.4.2. Inokulation von hypersensiblen und anfälligen Genotypen mit Gensequenz-veränderten cDNA-Klonen

Viruskonstrukten mit veränderter Gensequenz für die Lokalisierung der HR im Genom des Scharkavirus zu verwenden, ist eine Vorgehensweise, welche auch bei ähnlichen Fragestellungen angewandt worden ist: Salvador et al. (2008) untersuchten die genetische Determinierung für die PPV-Infektion von holzigen und krautigen Pflanzen. Dazu konstruierten sie aus zwei PPV-Isolaten, eines, das nur krautige Pflanzen, und eines, das nur holzige Pflanzen infizieren kann, Chimären, bei denen verschiedene Genbereiche untereinander ausgetauscht wurden. Die Aufgabe, die HR auslösende, virale Genregion zu identifizieren, wäre idealerweise anhand eines PPV-Isolats zu lösen, von welchem bekannt ist, dass es eine HR nicht einleiten kann. Mithilfe eines solchen Isolats könnte durch den Abgleich der genetischen Sequenz mit der Sequenz eines Isolats, das die HR auslösen kann, festgestellt werden, wo die Auslösung der HR codiert sein muss. Da ein derartiges Isolat jedoch nicht bekannt ist, wurde das Isolat PPV-SwC (*SweetCherry*), welches hypersensible Genotypen von *Prunus domestica* nicht infizieren kann (Kegler et al. 1998), gewählt. Die Isolate SwC und

SoC (C-Stamm) unterscheiden sich am stärksten von den Isolaten der D- und M-Stämme (Fanigliulo et al. 2003). Kegler et al. (2001) infizierten Pflanzen der 'K4'-Hybride mit PPV-C. Diese reagierten bei Infektion mit einzelnen PPV-Rec-Isolaten hypersensibel und bei Infektion mit anderen Isolaten mit einer systemischen Infektion. Mit dem PPV-C-Isolat konnten sie keine Reaktion der Pflanzen feststellen und das Virus war in der Pflanze nicht detektierbar. Somit wurde vermutet, dass bei Infektion mit Chimären, welche aus einem nicht infektiösen C-Isolat und einem infektiösem Isolat (PPV-D) gebildet werden, möglicherweise Hinweise auf die Genregion, welche für die Auslösung einer Infektion verantwortlich ist, erhalten werden können, und so auch Rückschlüsse auf die Verankerung der Hypersensibilität gezogen werden können.

Bei den Chimären, welche aus den beiden Isolaten gebildet wurden, wurde zum einen die Sequenzbereich P1HCpro und zum anderen die CP-Region untereinander ausgetauscht. Es ist bekannt, dass die Proteine HCpro und CP u. a. bei der Blattlausübertragung eine Rolle spielen (Goytia et al. 2006) und somit für die Infektiosität des Virus ausschlaggebend sind. Desweiteren sind diese beiden Komponenten an der Ausbreitung des Virus in der Pflanze beteiligt (Ilardi & Di Nicola-Negri 2011). Da vor allem in diesen beiden Genbereichen (HCpro und CP) die unterschiedliche Infektiosität der beiden Isolate verankert sein sollte, wurde der Austausch dieser beiden Bereiche als Ausgangspunkt der Studien genommen.

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Versuche beruhen auf einer sehr geringen Anzahl an Pflanzen und für eine detaillierte Interpretierung sollten weitere Versuche durchgeführt werden. Aus den Ergebnissen konnten folgende Aussagen abgeleitet werden:

- 1) Die Infektion von anfälligen Genotypen mit der Kontrolle PPV-SwC war 60 Tage nach der Inokulation systemisch.

Bodin et al. (2003) untersuchten die Verbreitung des *SourCherry*-Isolats (PPV-SoC) in infizierten *Prunus*-Unterlagen über einen Zeitraum von drei Jahren und kamen zu dem Schluss, dass verschiedene Kirsch- und auch Pflaumenunterlagen systemisch mit dem Virus infiziert werden können. Sie beobachteten außerdem eine unregelmäßige Verteilung sowie ein verzögertes Auftreten der PPV-Symptome, wodurch eine Detektion des Virus erschwert werden kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ebenfalls, dass anfällige Genotypen von *P. domestica* 60 Tage nach der Inokulation noch infiziert waren. Die Infektionen sollten allerdings über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, da sich gezeigt hat, dass eine Infektion mit PPV-C nach einem geraumen Zeitraum (Monate bis Jahre) transient werden kann (mündliche Information, Ravelonandro 2011).

- 2) Eine PPV-Infektion der hypersensiblen Genotypen mit den zwei Chimären P1HCSwC-Dc und CPDc-SwC sowie der Kontrolle PPV-SwCM war 60 Tage nach der Inokulation nicht mehr nachweisbar, d. h. die Infektion war transient.

Bei den drei Konstrukten, bei denen transiente Infektionen auftraten, war die Gensequenz von P1HCpro des SwC-Isolats gemeinsam, was vermuten lässt, dass die P1HCpro-Sequenz des SwC-Isolats für die transiente Infektion mitverantwortlich ist. Gleicht man die Aussage 2 mit der der Aussage 1 ab, könnte man daraus schließen, dass die Ursache für die transiente Infektion der hypersensiblen Genotypen in der P1HCpro-Gensequenz des SwC-Isolats verankert sein muss, da die Infektionen der anfälligen Genotypen, die mit Isolaten, die diese Sequenz enthielten, systemisch infiziert waren. Allerdings konnten mit anderen Konstrukten keine hypersensiblen Genotypen infiziert werden, um sicherzustellen, dass diese Infektionen nicht transient wären, und es entweder zu einer systemischen Infektion oder zu einer hypersensiblen Reaktion kommen würde.

Hypersensible Pflanzen zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht systemisch infiziert werden können. PPV-Infektionen bleiben lokalisiert und es kommt zum Absterbeprozess der infizierten Bereiche. Die transienten Infektionen stehen nicht im Widerspruch dazu: Wenn die PPV-Infektion bei den hypersensiblen In-vitro-Pflanzen lokalisiert geblieben ist und die neugebildeten Triebe nicht infiziert gewesen wären, dann wäre der zweite PPV-Nachweis nach 60 Tagen negativ gewesen, da bei der ersten Probennahme für den PPV-Nachweis Kallusgewebe und ältere Blätter abgenommen und nur neugebildete Seitentriebe weiterkultiviert wurden.

- 3) Mit dem cDNA-Klon CPDc-SwC, welcher aus der vollständigen Sequenz des SwC-Isolats besteht und vom D-Isolat lediglich das Hüllprotein enthält, wird eine höhere Infektionsrate (40-50%) erreicht als mit allen anderen Konstrukten (jeweils nur 10%).

Die Inokulation mit dem cDNA-Klon CPDc-SwC bringt sowohl bei den anfälligen Genotypen, als auch bei den hypersensiblen Genotypen (hier nur transient) eine vergleichsweise höhere Infektionsrate hervor. Aus dem Vergleich der Nukleinsäuresequenzen der verwendeten cDNA-Klone lässt sich schließen, dass die Sequenz des Hüllproteins von PPV-D und der weiteren Sequenz des SwC-Isolats ausschlaggebend für die höhere Infektionsrate sein könnte. Es ist bekannt, dass *Prunus domestica* mit dem C-Isolat infiziert werden kann (Bodin et al. 2003), dass es allerdings für *P. domestica* nicht so infektiös wie das D-Isolat ist. Die Infektionsrate der Inokulationen mit den weiteren cDNA-Klonen, welche die CP-Sequenz des D-Isolats enthielten (pIC-PPV-Dc und P1HCSwC-Dc), war jedoch nicht höher als bei den Inokulationen mit cDNA-Klonen mit der CP-Sequenz des SwC-Isolats.

Es ist möglich, dass die höhere Anzahl infizierter Pflanzen durch eine besser aufgereinigte Viruslösung zustande kommt. Wie bereits beschrieben, wurde bei der Durchführung der Beschichtung der Goldpartikel mit der Viruslösung festgestellt, dass manche Viruslösungen Rückstände von der Aufreinigung enthielten, und dadurch zum Verklumpen der Lösung führten und somit eine niedrigere Infektionsrate zur Folge hatten.

3.4.3. Stabilität der Hypersensibilitätsresistenz

Die Stabilität einer Resistenz ist eine wichtige Eigenschaft, welche gegeben sein muss, um eine effektive und dauerhafte Art der Resistenz gewährleisten zu können. Bei Pflanzen des hypersensiblen Klons 'K4' kam es zum Durchbruch der Hypersensibilitätsresistenz, sie reagierten nur gegenüber bestimmten PPV-Isolaten hypersensibel. Die Reaktion von scharkato-leranten und quantitativ resistenten Sorten ist stark von den Umweltbedingungen und vom Virusisolat abhängig (Neumüller 2005), d. h. sie kann sich verändern und ist somit nicht stabil.

Lichtenegger (2012) untersuchte die Stabilität der Hypersensibilitätsresistenz der Europäischen Pflaume gegenüber abiotischen und biotischen Umweltfaktoren. In allen seinen Untersuchungen zeigte sich die Hypersensibilitätsresistenz als stabil. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dokumentieren, dass es in keinem Experiment zum Durchbruch der Hypersensibilitätsresistenz kam. Alle mit PPV infizierten In-vitro-Pflanzen starben entweder ab, oder die Infektion blieb lokalisiert und die Pflanzen waren nur transient infiziert.

3.5. ZUSAMMENFASSUNG UND WEITERE VORGEHENSWEISE

Verschiedene cDNA-Klone, welche chimärenartig aus den PPV-Isolaten PPV-D und PPV-SwC unter gegenseitigem Austausch der P1HCpro- bzw. der CP-Sequenz gebildet wurden, wurden zur Infektion von hypersensiblen und anfälligen In-vitro-Pflanzen von *Prunus domestica* verwendet. Die biolistische Inokulation mittels PDS-1000/He wurde mit der In-vitro-Veredlung ergänzt und so konnte eine Methodik mit einer hohen Infektionsrate entwickelt werden. Erste Ergebnisse scheinen vielversprechend für verschiedene Fragestellungen zur Ausprägung einer systemischen oder transienten Infektion bei hypersensiblen Genotypen. Die Versuchsdurchführung konnte nicht abgeschlossen werden und weitere Experimente sind notwendig, um eine abschließende Interpretation durchführen zu können.

Als weitere Infektionsmethode könnte die Agroinfiltration mittels *Agrobacterium tumefaciens* getestet werden. Der Aufwand dieser Methode sollte im Vergleich zu den beiden angewandten Methoden (biolistischen Inokulation und In-vitro-Veredlung) geringer sein. Petri et al. (2008) entwickelten ein optimiertes Verfahren, mit welchem die Transformation und Regeneration von *Prunus domestica* nach der Agroinfiltration im Vergleich zu bisherigen Methoden mit hoher Transformationsrate gelingen kann. Ein derartiger Ansatz könnte auch bei der Thematik dieser Arbeit hilfreich sein.

Weitergehende Untersuchungen zu diesem Arbeitspunkt werden am *Centro Nacional de Biotecnología*-CSIC, Madrid, in den Laboren von Juan-Antonio García vorgenommen. Dort werden sowohl *Prunus domestica* hinsichtlich der HR, als auch *P. persica* und *P. armeniaca* auf die Auslösung der Resistenz gegenüber PPV unter Verwendung von Gensequenzveränderten Viruskonstrukten analysiert.

4. Untersuchung der Einsatzmöglichkeiten von hypersensiblen Unterlagen

4.1. EINLEITUNG

Die Verbreitung des Scharkavirus konnte bisher trotz bestehender Quarantäne-Schutzbestimmungen und detailliertem Wissen über seine Ausbreitung nicht verhindert werden. Als bislang einziger Weg, die Ausbreitung der Virose bei der Europäischen Pflaume zu verhindern, gilt die Verwendung von Sorten mit Hypersensibilitätsresistenz gegen das Virus. Wird ein Edelreis eines hypersensiblen Genotyps auf eine PPV-infizierte Unterlage veredelt, stirbt der Austrieb des Edelreislers wenige Wochen nach der Verwachsung ab. So dient die Hypersensibilitätsresistenz als zuverlässiges Identifikationsmittel für infizierte Pflanzen.

Ziel war es, zu klären, ob PPV-infizierte Edelsorten nach Veredlung auf hypersensible Unterlagen ebenfalls absterben und eine Ausbreitung der Infektion durch eine Lokalisierung des Virus verhindert wird. In diesem Fall würde der Einsatz hypersensibler Unterlagen verhindern, dass sich bei Veredlung mit latent infizierten Edelreisern verkaufsfähige Bäume entwickeln können.

In verschiedenen Experimenten, welche sowohl im Gewächshaus als auch im Freiland unter natürlichem PPV-Befallsdruck durchgeführt wurden, wurden die Einsatzmöglichkeiten von hypersensiblen Pflanzen bei Verwendung als Unterlagen getestet. Dabei stand die Reaktion von auf hypersensiblen Unterlagen veredelten, PPV-infizierten Sorten im Mittelpunkt. Auch das Verhalten von mehrjährigen Pflanzen mit hypersensibler Unterlage wurde bei PPV-Infektion getestet. Es sollte festgestellt werden, wie sich eine mögliche PPV-Infektion bei bereits im Feld stehenden Bäumen mit hypersensibler Unterlage auswirkt.

4.2. MATERIAL UND METHODEN

4.2.1. Veredlungs- und Inokulationsversuche unter Gewächshausbedingungen

4.2.1.1. Verhalten von PPV-infizierten Sorten bei Veredlung auf hypersensible Unterlagen

Im Mittelpunkt dieser Untersuchung stand, die Reaktion von verschiedenen PPV-infizierten Edelsorten zu testen, wenn diese auf hypersensible Unterlagen veredelt werden. Als Unterlagen wurden verschiedene hypersensible Zuchtklone aus Kreuzungen von *Prunus domestica* × *Prunus cerasifera* ('Docera'-Zuchtklone) und *Prunus domestica* × *Prunus spinosa* ('Dospina'-Zuchtklone) verwendet. Eine Auflistung der genauen Kreuzungskombinationen, aus welchen die hypersensiblen Unterlagen stammen, findet sich in Tab. 4.2-1. Unterschiedliche Edelsorten der Europäischen Pflaume sowie je eine Aprikosen- und Pfirsichsorte kamen zum Einsatz. Desweiteren wurde der Einfluss des PPV-Stammes bzw. –Isolats, mit welchem die Edelsorte bei Veredlung mit einer hypersensiblen Unterlage infiziert war, untersucht. Alle Pflanzen wurden, nach einer anfänglichen Vergleichsinokulation von Kopulation und Rindenspanveredlung, mittels Rindenspanveredlung (*chip budding*) mit PPV-infizierten Rindenspänen mit oder ohne Augen verschiedener Edelsorten inokuliert.

Tab. 4.2-1 Abstammung der untersuchten hypersensiblen Zuchtklone

Zuchtklon	Kreuzung	
	Mutter	Vater
Docera 5	Hoh 6482	Späte Myrobalane
Docera 6	Hoh 6482	Späte Myrobalane
Docera 9	Hoh 6482	Späte Myrobalane
Docera 253	Jojo	<i>Prunus cerasifera</i>
Docera 254	Jojo	<i>Prunus cerasifera</i>
Docera 257	Jojo	<i>Prunus cerasifera</i>
Docera 259	Jojo	<i>Prunus cerasifera</i>
Docera 260	Jojo	<i>Prunus cerasifera</i>
Docera 262	Jojo	<i>Prunus cerasifera</i>
Docera 265	Jojo	<i>Prunus cerasifera</i>
Dospina 20	Hoh 5944	<i>Prunus spinosa</i>
Dospina 22	Hoh 5944	<i>Prunus spinosa</i>
Dospina 240	Jojo	<i>Prunus spinosa</i>

Die verwendeten, PPV-infizierten Edelreiser wurden, wenn nicht anders vermerkt, von PPV-infizierten (PPV-D) Bäumen aus der Scharkaversuchsanlage im Landwirtschaftlichen Technologiezentrum (LTZ) Augustenberg in Weil der Stadt (Petruschke) geschnitten. PPV-freie

Reiser waren in der Versuchsanlage des Fachgebiets Obstbau vorhanden. Die Versuche wurden in den Gewächshäusern des Fachgebiets Obstbau durchgeführt.

Beim standardmäßig verwendeten Virusisolat handelte es sich um ein Isolat von PPV-D. Dieses Isolat erreicht einen hohen Virustiter mit starker Symptomausprägung in der Pflanze und eignet sich demnach für Resistenztests (Neumüller 2005). Zudem wurde durch Versuche, in welchen die Reaktion von hypersensiblen Genotypen bei Infektion mit verschiedenen PPV-Stämmen und –Isolaten geprüft wurde, eine isolatspezifische Reaktion ausgeschlossen.

Der PPV-Nachweis mittels DAS-ELISA wurde mit Antikörpern der Firma AMR Lab nach Angaben des Herstellers (s. Kapitel 3.2.4 auf Seite 46) und die Auswertung gemäß der Richtlinien der *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO 2004) durchgeführt. Außerdem wurde zum Virusnachweis die Blue LAMP-Methode nach den Angaben von Hadersdorfer et al. (2011) durchgeführt.

Nachfolgend werden die einzelnen Experimente zur Untersuchung der Reaktion von PPV-infizierten Sorten bei Veredlung auf hypersensible Unterlagen detailliert beschrieben.

EXPERIMENT 1

Versuchsaufbau. Im Frühjahr 2008 wurden insgesamt 800 hypersensible Unterlagen der Zuchtklone 'Docera 5', 'Docera 6', 'Docera 9' und 'Dospina 22' mit PPV-infizierten Rindenspänen mit Augen mittels Rindenspanveredlung veredelt. Bei den Edelsorten von *Prunus domestica* handelt es sich um 'Katinka', 'Hauszwetsche, Typ Verexal', 'Cacaks Fruchtbare' und 'Hanita', welche als scharkaanfällige Sorten eingestuft werden und außerdem 'Cacaks Beste' und 'Hoh 2043' ('Hanita' × ('Tiroler' × 'Stanley 2')), welche beide quantitativ resistente Sorten sind (s. Tab. 4.2-2).

Tab. 4.2-2 Übersicht Experiment 1

Anzahl und Zuchtklon der veredelten Unterlagen je Edelsorte

PPV-infizierte Sorte	Zuchtklon Unterlage				Anzahl, gesamt
	Docera 5	Docera 6	Docera 9	Dospina 22	
Katinka (Chip)	50	50	27	52	179
Katinka (Kopulation)	50	50	33	48	181
Hauszwetsche, Typ Verexal	39	40	20	40	139
Cacaks Beste	20	20	15	20	75
Hoh 2043	20	21	15	20	76
Cacaks Fruchtbare	20	20	15	20	75
Hanita	20	20	15	20	75
Anzahl, gesamt	219	221	140	220	800

Kulturbedingungen. Jede der hypersensiblen Unterlagen wurde mit je einem PPV-infizierten Rindenspan mit Auge veredelt. Danach wurde die Unterlage in Torf-Ton-Substrat in Töpfen mit einem Fassungsvermögen von 1,9 l getopft und im beheizbaren, insektensicheren Gewächshaus aufgestellt (Frühjahr/Herbst: Heizungssollwert 10°C, Lüftungstemperatur 15°C; Sommer: Heizungssollwert 15°C, Lüftungstemperatur 19°C; Winter: Heizungssollwert 3°C, Lüftungstemperatur 6°C). Blattläuse, Spinnmilben und Mehltau wurden mit handelsüblichen Pflanzenschutzmitteln bekämpft. Düngung erfolgte praxisüblich. Entstandene Unterlagenaustriebe wurden entfernt bis die zu testenden Edelreiser ausgetrieben oder abgestorben waren.

Bonitur und Virusnachweis. Das Wachstum der Edelreisaustriebe und die Symptomentwicklung an Edelreis und Unterlage wurden jeweils dreimal in den Jahren 2008 und 2009 inspiziert. Bei visuell nicht eindeutig erkennbaren PPV-Symptomen wurden die Pflanzen mittels DAS-ELISA auf PPV-Befall untersucht. Pflanzen mit abgestorbenen Edelsortenaustrieben wurden verworfen. Die bis 2010 kultivierten Pflanzen standen weiterhin unter Beobachtung und wurden einmal pro Jahr visuell bonitiert und auf PPV-Befall getestet.

EXPERIMENT 2

Versuchsaufbau. Im Sommer 2008 wurden Unterlagen derselben Zuchtklone, wie bereits im Frühjahr 2008, einem weiteren Test unterzogen. Die Ergebnisse des Experiment 1 sollten überprüft werden und zudem wurde als Veredlungszeitpunkt der Sommer gewählt. Zum Versuch wurde der hypersensible Zuchtklon 'Dospina 20' und als Kontrolle die scharkaanfällige Unterlage 'Weito' (*Prunus tomentosa*) hinzugezogen. Insgesamt wurden 1473 Pflanzen als Unterlagen getestet. 1155 von diesen Unterlagen wurden mit Rindenspänen mit Augen von PPV-infizierten Bäumen und 318 Unterlagen wurden mit Rindenspänen von gesunden Bäumen veredelt. Als Edelsorten wurden, wie in Experiment 1, 'Katinka', 'Hauszwetsche, Typ Verexal', 'Cacaks Beste', 'Hoh 2043', 'Cacaks Fruchtbare' und 'Hanita' verwendet. Außerdem wurden einige Unterlagen mit PPV-D-infizierten Rindenspänen der Aprikosensorte 'Canino' (*Prunus armeniaca*) und der Pfirsichsorte 'Rubira' (*Prunus persica*) veredelt. Infizierte Edelreiser der Sorte 'Canino' wurden freundlicherweise vom *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias* (IVIA) in Valencia (M. Badenes), zur Verfügung gestellt. Die Edelreiser der Sorte 'Rubira' stammten aus Beständen des Fachgebiets Obstbau. Im Folgenden findet sich eine Übersicht aller veredelten Pflanzen (s. Tab. 4.2-3).

Tab. 4.2-3 Übersicht Experiment 2

Anzahl und Zuchtklon der veredelten Unterlagen je Edelsorte

PPV-infizierte Sorte	Zuchtklon Unterlage												Anzahl, gesamt	
	Docera 5		Docera 6		Docera 9		Dospina 20		Dospina 22		Weito®			
	inf. ¹	frei ²	inf. ¹	frei ²	inf. ¹	frei ²	inf. ¹	frei ²	inf. ¹	frei ²	inf. ¹	frei ²	inf. ¹	frei ²
Katinka	50	10	50	10	50	10	15	5	50	8	50	10	265	53
Hauszwetsche, Typ Verexal	50	10	50	10	50	10	15	5	40	8	50	10	255	53
Cacaks Beste	20	10	20	10	20	10	10	5	15	8	20	10	105	53
Hoh 2043	20	10	20	10	20	10	10	5	15	8	20	10	105	53
Cacaks Fruchtbare	20	10	20	10	20	10	10	5	15	8	20	10	105	53
Hanita	20	10	20	10	20	10	10	5	15	8	20	10	105	53
Aprikose 'Canino'	30	-	30	-	20	-	10	-	15	-	10	-	115	-
Pfirsich 'Rubira'	20	-	15	-	20	-	10	-	15	-	20	-	100	-
Anzahl, gesamt	230	60	225	60	220	60	90	30	180	48	210	60	1473	

inf.¹: PPV-infiziert, frei²: PPV-frei

Kulturbedingungen. Die Kulturbedingungen entsprachen denen in Experiment 1 (s. Seite 62).

Bonitur und Virusnachweis. Das Wachstum der Edelreisaustriebe und die Symptomentwicklung an Edelreis und Unterlage wurden 2009 viermal inspiziert. Bei visuell nicht eindeutig erkennbaren PPV-Symptomen wurden die Pflanzen mittels DAS-ELISA auf PPV-Befall untersucht. Pflanzen mit abgestorbenen Edelsortenaustrieben wurden verworfen. Die verbleibenden Pflanzen wurden in den Jahren 2010 und 2011 einmal visuell bonitiert und auf PPV getestet.

EXPERIMENT 3

Versuchsaufbau. Ein weiterer Versuch mit hypersensiblen Zuchtklonen wurde im April 2010 durchgeführt. Die verwendeten, hypersensiblen Zuchtklone 'Docera 253', 'Docera 257', 'Docera 259', 'Docera 260', 'Docera 262' und 'Docera 265' wurden als Unterlagen mit PPV-infizierten Rindenspänen mit Augen der anfälligen Edelsorte 'Elena' inokuliert. Außerdem wurden einige Pflanzen der Zuchtklone 'Docera 253' und 'Docera 262' mit PPV-freien Rindenspänen der Edelsorte 'Katinka' veredelt (s. Tab. 4.2-4).

Tab. 4.2-4 Übersicht Experiment 3
Anzahl und Zuchtklon der veredelten Unterlagen je Edelsorte

PPV-infizierte Sorte	Zuchtklon Unterlage								Anzahl, gesamt	
	Docera 253		Docera 257	Docera 259	Docera 260	Docera 262		Docera 265		
	inf. ¹	frei ²	inf. ¹	inf. ¹	inf. ¹	inf. ¹	frei ²	inf. ¹	inf. ¹	frei ²
Elena	40	-	19	16	14	44	10	12	145	10
Katinka	-	10	-	-	-	-	-	-	-	10
Anzahl, gesamt	40	10	19	16	14	44	10	12	165	

inf.¹: PPV-infiziert, frei²: PPV-frei

Kulturbedingungen. Die Kulturbedingungen entsprachen denen in Experiment 1 (s. Seite 62).

Bonitur und Virusnachweis. Das Wachstum der Edelreisaustriebe und die Symptomentwicklung an Edelreis und Unterlage wurden 2010 einmal inspiziert. Bei visuell nicht eindeutig erkennbaren PPV-Symptomen wurden die Pflanzen mittels DAS-ELISA auf PPV-Befall untersucht. Pflanzen mit abgestorbenen Edelsortenaustrieben wurden verworfen. Die verbleibenden Pflanzen wurden im Jahr 2011 auf Symptomentwicklung oder Absterben beobachtet.

EXPERIMENT 4

Versuchsaufbau. Im April 2011 wurden insgesamt 160 hypersensible Unterlagen ('Dospina 240', 'Docera 254', 'Docera 257', 'Docera 260', 'Docera 262' und 'Docera 265') mit PPV-infizierten (PPV-D) Rindenspänen mit Edelaugen der *Prunus domestica*-Sorte 'Katinka' veredelt (s. Tab. 4.2-5).

Tab. 4.2-5 Übersicht Experiment 4
Anzahl und Zuchtklon der veredelten Unterlagen

PPV-infizierte Sorte	Zuchtklon Unterlage						Anzahl, gesamt
	Dospina 240	Docera 254	Docera 257	Docera 260	Docera 262	Docera 265	
Katinka	30	30	16	29	30	25	160

Kulturbedingungen. Die Pflanzen wurden im beheizbaren, insektensicheren Gewächshaus in den gewachsenen Boden gepflanzt. Die Kulturbedingungen entsprachen denen in Experiment 1 (s. Seite 62).

Bonitur und Virusnachweis. Das Wachstum der Edelreisaustriebe und die Symptomentwicklung an Edelreis und Unterlage wurden 2011 dreimal inspiziert. Bei visuell nicht eindeutig erkennbaren PPV-Symptomen oder bei Austrieb des Edelreises ohne Symptome wurde die Pflanze mittels DAS-ELISA oder Blue LAMP auf PPV-Befall untersucht. Pflanzen mit abgestorbenen Edelsortenaustrieben wurden verworfen. Die verbleibenden Pflanzen wurden weiterhin auf Ausprägung von PPV-Symptomen bzw. Absterbeerscheinungen beobachtet.

EXPERIMENT 5

Versuchsaufbau. Im Frühjahr 2011 wurden zwei hypersensible Unterlagen, der Zuchtklon 'Docera 5' und die Sorte 'Jojo', mit verschiedenen PPV-Isolaten inokuliert. Der Test sollte eine Aussage darüber geben, wie stark die Hypersensibilitätsresistenz des Zuchtklons 'Docera 5' im Vergleich zur Sorte 'Jojo' ausgeprägt ist. Zur PPV-Inokulation wurden Rindenspäne mit Augen der Sorte 'Katinka', infizierte mit jeweils einem anderen PPV-Isolat (Virusgenbank in den Gewächshäusern des Fachgebiets Obstbau), verwendet (s. Tab. 4.2-6). Zudem wurden Untersuchungen mit einem sehr virulenten PPV-M-Isolat aus Bulgarien (PPV 56) unternommen, mit welchem, zusätzlich zu den Unterlagen 'Docera 5', 'Jojo', der hypersensible Zuchtklon 'Hoh 4517' (Nachkomme der Kreuzung 'Elena' × 'Hoh 512') inokuliert wurden.

Tab. 4.2-6 Übersicht Experiment 5

Anzahl und Zuchtklon/Sorte der veredelten Unterlagen je PPV-Stamm und –Isolat

PPV		Zuchtklon/Sorte Unterlage			Anzahl, gesamt
Stamm	Isolat	Docera 5	Jojo	Hoh 4517	
D	PPV 10	4	2	-	6
	PPV 17	4	2	-	6
	PPV 22	4	1	-	5
	PPV 30	5	1	-	6
	PPV 35	5	2	-	7
	PPV 39	5	2	-	7
	PPV 47	4	2	-	6
M	PPV 4	4	2	-	6
	PPV 14	5	2	-	7
	PPV 56	15	15	6	36
Rec/M	PPV 15	5	2	-	7
Anzahl, gesamt		60	33	6	99

In der folgenden Tab. 4.2-7 findet sich eine Übersicht aller verwendeten PPV-Isolate mit der genauen Beschreibung der Herkunft des Isolats.

Tab. 4.2-7 Liste aller verwendeten PPV-Stämme und –Isolate
Stammbezeichnung und Herkunft des Isolats

PPV		
Stamm	Isolat	Herkunft des Isolats (Ort/Herkunftsland; abgebende Stelle)
D	PPV 5	Rumänien; Petruschke, LfP-BW
	PPV 10	Tschechische Republik; Petruschke, LfP-BW
	PPV 17	Ortenberg, Deutschland; BBA
	PPV 22	Herrenberg, Deutschland; BBA
	PPV 30	Aschersleben, Deutschland; BBA
	PPV 35	Engelstadt, Deutschland; RLP
	PPV 39	Jork, Deutschland
	PPV 47	Freising, Deutschland; Neumüller, TUM
M	PPV 4	Tschechische Republik; Department of Virology, Research Institute
	PPV 8	Cacak, Serbien; Petruschke, LfP-BW
	PPV 14	Aschersleben, Deutschland; BBA
	PPV 19	Marbach, Deutschland; BBA
	PPV 56	Bulgarien; Bozkova, FGI
Rec	PPV 3	Cacak, Serbien; Petruschke, LfP-BW
Rec oder M	PPV 15	Linkenheim/Hochstetten, Deutschland; BBA
EA	PPV 11	El Amar, Ägypten; INRA Bordeaux

Kulturbedingungen. Die Pflanzen wurden im beheizbaren, insektensicheren Gewächshaus in den gewachsenen Boden gepflanzt. Die Kulturbedingungen entsprachen denen in Experiment 1 (s. Seite 62).

Bonitur und Virusnachweis. Das Wachstum der Edelreisaustriebe und die Symptomentwicklung an Edelreis und Unterlage wurden im Jahr 2011 zweimal inspiziert. Bei visuell nicht eindeutig erkennbaren PPV-Symptomen oder bei Austrieb des Edelreises ohne Symptome wurde die Pflanze mittels DAS-ELISA oder Blue LAMP auf PPV-Befall untersucht.

4.2.1.2. Verhalten von mehrjährigen, hypersensiblen Pflanzen bei Inokulation mit PPV

Verschiedene mehrjährige, hypersensible Pflanzen wurden mit PPV-infizierten Rindenspänen inokuliert und deren Verhalten dokumentiert. Dabei wurde insbesondere die Reaktion auf die Inokulation mit verschiedenen PPV-Stämmen bzw. -Isolaten getestet und die Auswirkungen der Inokulationsstelle, sowie die Virusausbreitung bei Pflanzen mit Zwischenveredlung (entweder mit hypersensibler Zwischenveredlung oder hypersensiblen Edelreis) geprüft. Der PPV-Nachweis wurde mittels DAS-ELISA oder Blue LAMP, wie auf Seite 61 beschrieben, durchgeführt.

EXPERIMENT 6

Versuchsaufbau. Im Sommer 2010 wurden 19 zweijährige Pflanzen des Zuchtklons 'Docera 6' über die Einveredlung von Rindenspänen der Sorte 'Katinka', welche mit den jeweiligen PPV-Isolaten infiziert waren, inokuliert. Pro Baum wurden zwei infizierte Späne gesetzt. Die Edelreiser, welche mit den verschiedenen PPV-Isolaten infiziert waren, stammten aus der Virusgenbank in den Gewächshäusern des Fachgebiets Obstbau. Eine Auflistung der verwendeten Isolate sowie der Anzahl der inokulierten Pflanzen findet sich in Tab. 4.2-8.

Tab. 4.2-8 Übersicht Experiment 6

Anzahl und Zuchtklon der PPV-inokulierten Pflanzen je PPV-Stamm und -Isolat

PPV		Zuchtklon
Stamm	Isolat	Docera 6
M	PPV 4	4
	PPV 8	4
	PPV 14	1
	PPV 19	1
	PPV 56	5
Rec	PPV 3	2
EA	PPV 11	2
Anzahl, gesamt		19

Kulturbedingungen. Die Pflanzen waren bei Inokulation mit den PPV-infizierten Rindenspänen in Torf-Ton-Substrat in Töpfen mit einem Fassungsvermögen von 5 l getopft und wurden im beheizbaren, insektensicheren Gewächshaus aufgestellt (Frühjahr/Herbst: Heizungssollwert 10°C, Lüftungstemperatur 15°C; Sommer: Heizungssollwert 15°C, Lüftungstemperatur 19°C; Winter: Heizungssollwert 3°C, Lüftungstemperatur 6°C). Blattläuse, Spinnmilben und Mehltau wurden mit handelsüblichen Pflanzenschutzmitteln bekämpft. Düngung erfolgte praxisüblich.

Bonitur und Virusnachweis. Das Wachstum und die Symptomentwicklung der Pflanzen wurden 2011 viermal inspiziert. Bei jeder Bonitur wurden Blatt-, Blüten- und/oder Rindenproben genommen und mittels DAS-ELISA oder Blue LAMP auf PPV-Befall untersucht. Für die Probennahme wurden in erster Linie Blätter mit möglichen PPV-Symptomen verwendet, waren solche nicht vorhanden, wurden mittlerer Größe nahe der Inokulationsstelle Blätter genommen.

EXPERIMENT 7

Versuchsaufbau. Im Frühjahr 2009 wurde bei 15 zweijährigen, veredelten Pflanzen, auf hypersensibler Unterlage ('Hoh 4571' ('Hoh 512' × 'Hanita') oder 'Jojo'), die Edelsorte mit PPV-infizierten Rindenspänen der Sorte 'Katinka' inokuliert. Die Edelsorten waren 'Hauszwetsche, Typ Schüfer', 'Haganta', 'Katinka' und der hypersensible Zuchtklon 'Hoh 4571'. Pro Baum wurden zwei infizierte Rindenspäne eingesetzt (s. Tab. 4.2-9).

Tab. 4.2-9 Übersicht Experiment 7
Anzahl und Zuchtklon/Sorte der PPV-inokulierten Edelsorten je Unterlage

Edelsorte	Zuchtklon/Sorte		Anzahl, gesamt
	Hoh 4571	Jojo	
Hauszwetsche, Typ Schüfer	3	2	5
Haganta	6	-	6
Katinka	2	-	2
Hoh 4571	2	-	2
Anzahl, gesamt	13	2	15

Kulturbedingungen. Die Pflanzen waren bei Inokulation mit den PPV-infizierten Rindenspänen in Torf-Ton-Substrat in Töpfen mit einem Fassungsvermögen von 5 l getopft. 2010 wurden die Pflanzen im Gewächshaus in den gewachsenen Boden gepflanzt. Die weiteren Kulturmaßnahmen entsprachen denen in Experiment 6 (s. Seite 67).

Bonitur und Virusnachweis. Das Wachstum und die Symptomentwicklung der Pflanzen wurden 2009 zweimal inspiziert. Eine weitere Bonitur fand 2011 statt. Bei jeder Bonitur wurden Blatt-, Blüten- und/oder Rindenproben genommen und mittels DAS-ELISA oder Blue LAMP auf PPV-Befall untersucht. Für die Probennahme wurden in erster Linie Blätter mit möglichen PPV-Symptomen verwendet, waren solche nicht vorhanden, wurden Blätter mittlerer Größe nahe der Inokulationsstelle genommen.

EXPERIMENT 8

Versuchsaufbau. Im Frühjahr 2009 wurden bei einjährigen Bäumen der Europäischen Pflaume mit Zwischenveredlung PPV-infizierte Rindenspäne der Sorte 'Katinka' an verschiedenen Stellen (Edelreis, Zwischenveredlung oder Unterlage) inokuliert (s. Abb. 4.2-1). Die Veredlungsvarianten mit einer hypersensiblen Zwischenveredlung oder einem hypersensiblen Edelreis kamen zum Einsatz. Pro Baum wurden entweder in das Edelreis, in die Zwischenveredlung oder die Unterlage je zwei infizierte Rindenspäne gesetzt (s. Tab. 4.2-10). Die Reaktion der einzelnen Veredlungspartner und die Ausbreitung des Virus wurden durch gezielte Tests überprüft.

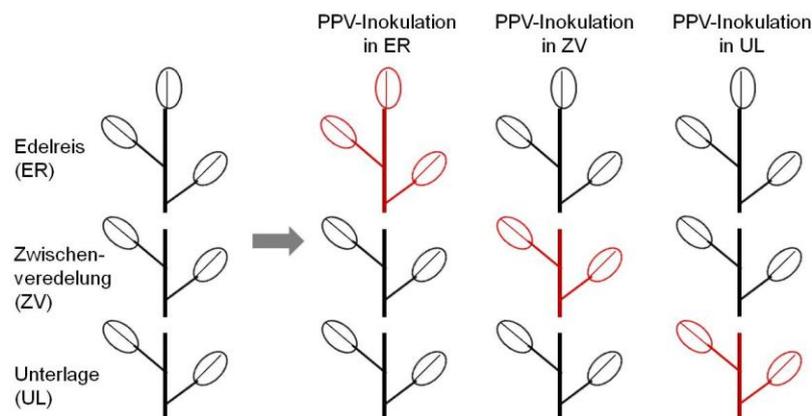


Abb. 4.2-1 Übersicht über die vorgenommenen PPV-Inokulationen
(Inokulationsbereich rot markiert)

Kulturbedingungen. Die Kulturbedingungen entsprachen denen in Experiment 6 (s. Seite 67).

Bonitur und Virusnachweis. Das Wachstum und die Symptomentwicklung der Pflanzen wurden je einmal 2009, 2010 und 2011 inspiziert. Bei jeder Bonitur wurden Blatt-, oder Rindenproben genommen und mittels DAS-ELISA oder Blue LAMP auf PPV-Befall untersucht. Für die Probennahme wurden in erster Linie Blätter mit möglichen PPV-Symptomen verwendet, waren solche nicht vorhanden, wurden Blätter mittlerer Größe nahe der Inokulationsstelle genommen.

Tab. 4.2-10 Übersicht Experiment 8

Anzahl und Veredlungskombination der PPV-inokulierten Pflanzen mit Angabe der Inokulationsstelle

Edelsorte	Zwischenveredlung	Unterlage	PPV-Inokulation			Anzahl, gesamt
			Edelsorte	Zwischenveredlung	Unterlage	
Hauszwetsche, Typ Schüfer	Jojo	Myrobalane	5	4	1	10
Hauszwetsche, Typ Schüfer	Hoh 4517	Myrobalane	5	6	4	15
Cacaks Beste	Jojo	GF 655/2	5	5	1	11
Jojo	Hauszwetsche, Typ Wolff	Myrobalane	7	4	1	12
Jojo	Katinka	Myrobalane	4	3	1	8
Jojo	Hauszwetsche, Typ Wolff	GF 655/2	3	2	-	5
Anzahl, gesamt			29	24	8	61

4.2.2. Versuche im Freiland unter natürlichem PPV-Infektionsdruck

Zwei Experimente wurden unter Freilandbedingungen durchgeführt. Das Verhalten PPV-anfälliger Sorten auf hypersensiblen Unterlagen sollte unter natürlichem PPV-Infektionsdruck getestet werden. Für die Durchführung der Experimente wurde zwei Scharkaversuchsanlagen ausgewählt: Zum einen die Versuchsanlage des Landwirtschaftlichen Technologiezentrums (LTZ) Augustenberg, Außenstelle Stuttgart, in Weil der Stadt, wo künstlich infizierte Zwetschenbäume (PPV-D) gepflanzt sind, und zum anderen eine Anlage in Oppenheim, die Versuchsanlage des Dienstleistungszentrums Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, in der einzelne Reihen zehnjähriger, stark PPV-befallener Bäume (*Prunus domestica*) stehen. Der PPV-Nachweis bei diesen Experimenten wurde mittels DAS-ELISA oder Blue LAMP, wie auf Seite 61 beschrieben, durchgeführt.

EXPERIMENT 9

Versuchsaufbau. Im Frühjahr 2009 wurden verschiedene anfällige und hypersensible Genotypen, veredelt auf hypersensiblen Unterlagen, in der Scharkaversuchsanlage in Weil der Stadt (Baden-Württemberg, LTZ Augustenberg, Außenstelle Stuttgart, M. Petruschke) ausgepflanzt. Dort sind künstlich infizierte Zwetschenbäume (PPV-D) gepflanzt und so natürliche Infektionsbedingungen für die Versuchspflanzen geschaffen. So sollte die Reaktion der Edelsorten auf den hypersensiblen Unterlagen in der Anlage mit Blattläusen als natürlichen PPV-Übertragungsvektor getestet werden (s. Tab. 4.2-11).

Tab. 4.2-11 Übersicht Experiment 9
Anzahl der einzelnen Unterlagen mit Angabe der aufveredelten Sorten

Edelsorte	Unterlage	Anzahl der Pflanzen
Cacaks Beste	Docera 5	3
Jojo	Docera 5	1
Katinka	Docera 5	11
Hauszwetsche, Typ Schüfer	Docera 5	5
Hauszwetsche, Typ Schüfer	Docera 6	5
Cacaks Beste	Docera 9	2
Hauszwetsche, Typ Schüfer	Dospina 22	3
Anzahl, gesamt		30

Bonitur und Virusnachweis. Die Bäume wurden im Sommer 2009, 2010 und 2011 gesichtet, jeweils Blattproben genommen und auf PPV-Befall mittels DAS-ELISA getestet.

EXPERIMENT 10

Versuchsaufbau. Dieser Versuch wurde in einer Scharkaversuchsanlage in Oppenheim, die vom Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinlandpfalz (DLR, Betreuung durch P. Hilsendegen, Obstbauberatungs- und Versuchswesen Abteilung Gartenbau) unterhalten wird, durchgeführt. Im Frühjahr 2010 wurden insgesamt 1200 Unterlagen, fünf hypersensible ('Docera 5', 'Docera 6', 'Docera 9', 'Dospina 20' und 'Dospina 22') und eine sensible Unterlage ('Weiwa[®]' = 'Wangenheims', *in vitro* vermehrt), in der Versuchsanlage gepflanzt. In dieser Anlage standen mehrere Reihen von zehnjährigen, stark PPV-infizierten Zwetschenbäumen. Die Unterlagen wurden randomisiert in Blöcken von 40 Pflanzen zwischen den Reihen der infizierten Bäume verteilt. So wurden eine gruppenweise Durchmischung der verschiedenen Unterlagen erreicht und für alle Versuchsbäume vergleichbare Entfernungen zur PPV-Infektionsquelle hergestellt (s. Abb. 4.2-2). Im Sommer 2010 wurden die zu diesem Zeitpunkt veredlungsfähigen Unterlagen mit scharkaanfälligen Sorten ('Katinka', 'Hauszwetsche, Typ Schüfer'), hypersensibel resistenten ('Hoh 4517') oder quantitativ resistenten ('Hoh 2043') Zuchtklonen veredelt. Diejenigen Unterlagen, die 2010 noch nicht Veredlungsstärke erreicht hatten, wurden im Sommer 2011 veredelt.

	Reihe 1		Reihe 3		Reihe 5		Reihe 7		Reihe 9
gepflanzte Unterlagen [Anzahl der Pflanzen]	Dospina 22 [22]	PPV-infizierte Bäume der Europäischen Pflaume	Weiwa [®] [34]	PPV-infizierte Bäume der Europäischen Pflaume	Docera 5 [39]	PPV-infizierte Bäume der Europäischen Pflaume	Docera 6 [26]	PPV-infizierte Bäume der Europäischen Pflaume	Docera 9 [40]
	Dospina 20 [10]		Dospina 22 [18]		Weiwa [®] [26]		Docera 5 [35]		Docera 6 [37]
	Docera 9 [31]		Dospina 20 [15]		Dospina 22 [18]		Weiwa [®] [29]		Docera 5 [40]
	Docera 6 [35]		Docera 9 [31]		Dospina 20 [12]		Dospina 22 [40]		Weiwa [®] [35]
	Docera 5 [40]		Docera 6 [23]		Docera 9 [31]		Dospina 20 [8]		Dospina 22 [22]
	Weiwa [®] [29]		Docera 5 [40]		Docera 6 [36]		Docera 9 [26]		Dospina 20 [9]
Veredlung mit den Sorten je Reihe									
	Katinka		Hoh 2043		Hoh 4517		Katinka		Hauszwetsche, Typ Schüfer

Abb. 4.2-2 Pflanzplan der verschiedenen Unterlagen mit Angabe der Pflanzenanzahl der 2010 veredelten Unterlagen und der Edelsorten

Die Pflanzposition der anfälligen Unterlagensorte 'Weiwa[®]' ist grau hinterlegt.

Bonitur und Virusnachweis. Im August 2011 wurden junge Austriebe der 2010 veredelten Sorten und Blätter der Unterlagen auf PPV-Befall mittels Blue LAMP getestet. Pro Pflanze wurden drei Blätter genommen und die Blattproben von jeweils 10 gleichartigen Pflanzen in einer homogenen Mischproben getestet.

4.2.3. Histologische Untersuchung der Veredlungsstelle

Bei diesem Experiment wurden histologische Untersuchungen über den Vorgang des Abstoßens der PPV-infizierten Edelsorten bei Veredlung auf eine hypersensible Unterlage vorgenommen. Ausgangspunkt der Überlegung war, dass die Absterbeerscheinungen des PPV-infizierten Edelreisaustriebs mit histologischen Veränderungen an der Veredlungsstelle einhergehen könnten, wie sie bei Neumüller (2005) beschrieben sind. Dazu wurden mikroskopische Schnitte durch die Veredlungsstelle von einer hypersensiblen Unterlage mit einer PPV-infizierten Edelsorte angefertigt.

Pflanzenanzucht. Im Sommer 2009 wurden PPV-infizierte (PPV-D), und im Vergleich PPV-freie, Edelreiser der *Prunus domestica*-Sorte 'Katinka' auf verschiedene Unterlagen von *Prunus domestica* veredelt. Als Unterlagen wurden die hypersensible Sorte 'Jojo' und der hypersensible Zuchtklon 'Docera 5' und außerdem die anfällige Unterlage 'Weiwa[®]' (= 'Wangenheims'), verwendet. Die Veredlung wurde in zwei Varianten durchgeführt, nämlich mittels Rindenspanveredlung und mittels Spaltpfropfung. Pro Pflanze wurden je drei Rindenspäne und eine Spaltpfropfung gesetzt.

Probennahme und Fixierung. Proben wurden jede Woche (beginnend zwei Wochen nach Veredlung) genommen, insgesamt fünfmal. Dazu wurde die komplette Veredlungsstelle herausgeschnitten, in kleinere, max. 5 mm² große Stücke, quer geschnitten und in 70%igem FPA (5 Vol.-% Formaldehyd, 5 Vol.-% Propionsäure, 90 Vol.-% Ethanol), als Fixierlösung, eingelegt. Die Lufteinschlüsse im Spross wurden entfernt, indem die Proben in der Fixierlösung im Vakuumexsikkator infiltriert wurden, bis keine Luftblasen mehr aus dem Gewebe entwichen. Anschließend wurden sie unter Wipp-Bewegungen (Mini Rocker MR-1, peqlab Biotechnologie, Erlangen) bei Raumtemperatur für 24 Stunden inkubiert. Die Proben wurden in aufsteigender Ethanolreihe (70/90/96 Vol.-%) jeweils für eine Stunde im Exsikkator und eine Stunde auf der Wippe entwässert. Nach zwei Stunden (1h Exsikkator, 1h Wippe) Vorinfiltration in einer 1:1-Mischung aus aktiviertem (Aktivator: Benzoylperoxid) Glycomethacrylat (HistoResin, Leica, Bensheim) und Ethanol (99 Vol.-%), wurden die Proben mindestens zwei Tage auf der Wippe mit reinem aktiviertem Glycomethacrylat infiltriert.

Einbettung. Die Proben wurden in aktiviertem Glycomethacrylat, das im Verhältnis 15:1 mit einem Härter (Barbitursäure-Derivat; HistoResin-Härter, Leica, Nussloch) versetzt wurde, eingebettet. Zum Sauerstoffausschluss während der Aushärtephase wurden die verwendeten Förmchen mit einer Folie luftdicht abgeschlossen. Die Polymerisation dauerte ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach der Aushärtung wurden die Acrylatharzblöcke aus den Förmchen genommen und auf Holzblöcken mit HistoResin *mounting medium* (Leica,

Nussloch) befestigt. Die Verwendung der Holzblöcke erleichterte das Einspannen in das Mikrotom.

Herstellen der mikroskopischen Präparate. Mit dem Rotationsmikrotom RM 2255 (Leica, Nussloch) wurden Semidünnschnitte (8 μm) angefertigt und auf Objektträger überführt. Anschließend wurden die Präparate erst einige Stunden bei Raumtemperatur und dann für zwölf Stunden bei 40°C im Trockenschrank (Memmert, Schwabach) getrocknet. Die Schnitte wurden mit Astrablau-Chrysoidin-Neufuchsin (ACN)-Lösung (Etzold 2002, modifiziert nach Neumüller 2005) gefärbt. Verholzte Zellwände werden dadurch rot, unverholzte blau und lipophile Cutin- und Suberinstrukturen gelb-orange gefärbt. Dazu wurden die Objektträger in der ACN-Lösung für fünf Minuten inkubiert und anschließend in destilliertem Wasser eben solange differenziert. Die Präparate wurden bei 40°C über Nacht getrocknet und mit Eukitt® (Sigma-Aldrich, Steinheim) als Einschlussmittel zu Dauerpräparaten verarbeitet.

Lichtmikroskopie. Die Präparate wurden mit einem Durchlicht-Mikroskop des Typs Axioskop (Zeiss, Oberkochen) untersucht. Für die Bildaufnahme wurde eine Zeiss AxioCam mit dem Programm AxioVision 4.8 genutzt.

4.3. ERGEBNISSE

4.3.1. Veredlungs- und Inokulationsversuche unter Gewächshausbedingungen

4.3.1.1. Verhalten von PPV-infizierten Sorten bei Veredlung auf hypersensible Unterlagen

EXPERIMENT 1

Insgesamt wurden in diesem Experiment 800 hypersensible Unterlagen ('Docera 5', 'Docera 6', 'Docera 9', 'Dospina 22') mit 6 verschiedenen Sorten ('Katinka', 'Hauszwetsche, Typ Verexal', 'Cacaks Fruchtbare', 'Hanita', 'Cacaks Beste', 'Hoh 2043') veredelt und die Reaktion der PPV-infizierten Edelsorten dokumentiert. Nach der Veredlung im Februar 2008 wurden drei Bonituren (Juni, August und Oktober) durchgeführt, wobei jede einzelne Pflanze gesichtet und die Reaktion des Edelreises bewertet wurde. Der PPV-Nachweis wurde mittels DAS-ELISA nach jeder Bonitur bei den Pflanzen durchgeführt, welche keine eindeutigen PPV-Symptome aufwiesen.

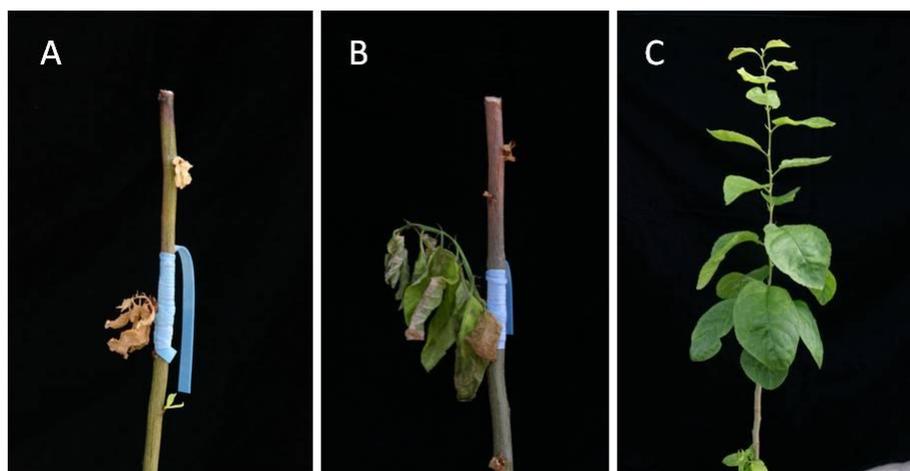


Abb. 4.3-1 Reaktionen des PPV-infizierten Edelsortenaustriebs

A) sofortiges Absterben nach dem Austrieb; B) Absterben nach 3-wöchiger Wachstumsphase; C) längere Wachstumsperiode vor dem Absterben (jeweils 'Katinka' auf 'Docera 5')

Folgende Reaktionen ließen sich bei den aufveredelten Sorten beobachten:

- kurzes Antreiben des Edelauges, gefolgt vom kompletten Absterben des Edelauges (s. Abb. 4.3-1 A)
- Austrieb der Edelsorte mit oder ohne PPV-Symptomen (je nach Sorte), Absterbereaktion nach unterschiedlich langer Wachstumsphase (s. Abb. 4.3-1 B und C)
- kein Austrieb der Edelsorte, sondern Abstoßungsreaktion des Rindenspanns mit starken Rindennekrosen im benachbarten Holz

Haupteinflussfaktor für die Schnelligkeit des Absterbens scheint die Menge des PPV-Inokulums in der Edelsorte zu sein.

Die beiden unterschiedlichen Veredlungsmethoden (Rindenspanveredlung und Kopulation), welche bei Veredlung von den vier Unterlagen mit der Sorte 'Katinka' angewandt wurden, ergaben vergleichbare Ergebnisse: im Juni 2008, vier Monate nach Veredlung, waren jeweils ca. 80% der Edelsortenaustriebe abgestorben; die Schwankungen der Absterberate bei Veredlung mit den unterschiedlichen Methoden betragen max. 7%.

Im Juni 2008 waren bei allen vier Unterlagen je über 80% der Edelsorten abgestorben. Teilweise starb auch die Unterlage komplett ab, und teilweise blieb die Unterlage erhalten. In den überlebenden, hypersensiblen Unterlagen konnte in keinem Fall PPV nachgewiesen

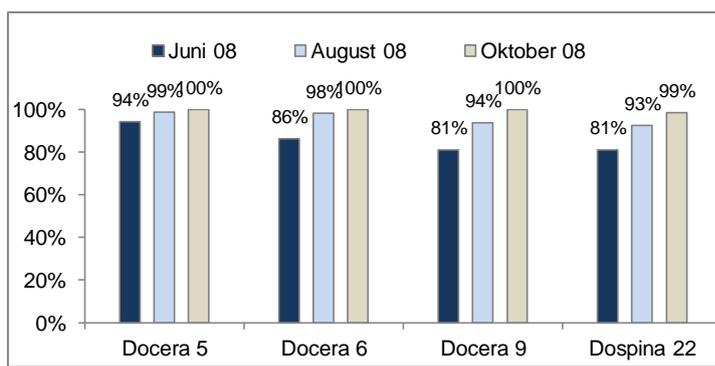


Abb. 4.3-2 Ergebnisübersicht Experiment 1

Anteil der im Laufe der Vegetationsperiode 2008 abgestorbenen, PPV-infizierten Edelsorten je Unterlage

werden. Zeigte eine Edelsorte eine Austriebs- und Wachstumsphase vor dem Absterben, war in den Edelsortenaustrieben teilweise PPV nachweisbar: Bei den Sorten 'Katinka', 'Hauszwetsche, Klon Verexal' und 'Cacaks Fruchtbare' waren in den meisten Fällen PPV-Symptome auf den Blättern sichtbar und PPV konnte mittels ELISA detektiert werden, in den quantitativ resistenten

Sorten ('Cacaks Beste' und 'Hoh 2043') dagegen sowie der Sorte 'Hanita' konnte meist kein PPV-Befall nachgewiesen werden. Am Ende der Vegetationsperiode 2008 waren 747 (93,4%) der Edelsorten abgestorben (s. Abb. 4.3-2).

Bei den 53 verbleibenden Pflanzen konnte bei nur drei Pflanzen (eine Katinka/Dospina 22, zwei Cacaks Beste/Dospina 22) PPV mittels ELISA nachgewiesen werden. Eine der 2008 PPV-positiv getesteten Pflanzen (Katinka/Dospina 22), starb im Sommer in der Vegetationsperiode 2009 ab, die zwei anderen trieben 2009 nicht aus.

In der Vegetationsperiode 2009 trieben einige der 50 erhaltenen Pflanzen, bei



Abb. 4.3-3 Reaktion der Sorte 'Hoh 2043' veredelt auf 'Docera' 5

A) Welkeerscheinungen (Aufnahme am 18.03.2009);
B) abgestorbenes Edelreis (Aufnahme am 30.03.2009)

denen 2008 PPV nicht nachgewiesen werden konnte, nicht aus, andere starben nach einer kurzen Wachstumsperiode ab. Bei mehreren dieser Pflanzen wurden in der kurzen Wachstumsphase vor dem Absterben Proben für den PPV-Nachweis genommen. Mittels ELISA konnte in diesen Proben PPV detektiert werden. Abb. 4.3-3 zeigt den Austrieb des Zuchtklons 'Hoh 2043' veredelt auf die Unterlage 'Docera 5' im Zeitverlauf im März 2009. Bei dieser Pflanze konnte 2008 PPV nicht detektiert werden. Als sich 2009 erste Welkeerscheinungen zeigten (s. Abb. 4.3-3 A), wurden Blattproben genommen, worin PPV nachgewiesen werden konnte. Ca. zwei Wochen nach der Probennahme war das Edelreis abgestorben (s. Abb. 4.3-3 B).

Betrachtet man die Sorten der Pflanzen, bei denen die Testergebnisse des PPV-Nachweises im Zeitverlauf unterschiedlich ausfielen, d. h. teils negativ und teils positiv waren, und auch die Sorten der Pflanzen, bei denen PPV nicht nachweisbar war, ergibt sich, dass ein Großteil dieser Pflanzen mit quantitativ resistenten Sorten ('Hoh 2043' oder 'Cacaks Beste') oder mit der Sorte 'Hanita' veredelt waren (s. Abb. 4.3-4). Die Unterlage 'Dospina 22' stellt eine Ausnahme dar: auf dieser Unterlage wuchs die anfällige Edelsorte 'Katinka', ohne dass in den Edelsortenaustrieben PPV detektierbar war.

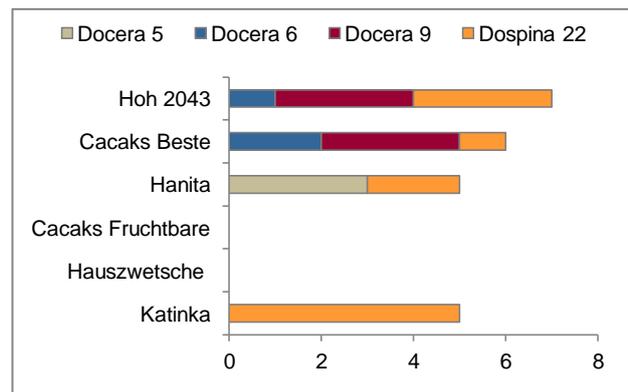


Abb. 4.3-4 Anzahl der PPV-negativen Edelsorten mit Angabe der Unterlage
PPV-Nachweis negativ (ELISA, April 2009)

Bis 2010 blieben von ursprünglich 800 Pflanzen acht Pflanzen erhalten, bei welchen Edelreis und Unterlage wachsend waren und bei welchen in mehrfachen Tests PPV nicht detektiert werden konnte.

EXPERIMENT 2

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus Experiment 1 wurde im Sommer 2008 ein weiteres Experiment begonnen, bei dem Unterlagen und Edelsorten derselben Sorten wie im Frühjahr verwendet wurden. Außerdem wurden weitere Unterlagen (hypersensibel resistent: 'Dospina 20', scharkaanfällig: 'Weito') und als Edelsorten zusätzlich je eine Pfirsich- und eine Aprikosensorte ('Rubira' und 'Canino') dem Test hinzugezogen. In diesem Experiment wurden auch Unterlagen mit nicht PPV-infizierten Rindenspänen veredelt. Die insgesamt 1473 Pflanzen wurden Ende August bis Anfang September 2008 veredelt. In der Vegetationsperiode 2009 wurden die Pflanzen viermal bonitiert. Im April und Juni wurde bei den Pflanzen, welche keine eindeutigen PPV-Symptome aufwiesen oder welche kurz vor dem Absterben waren, ein PPV-Test mittels ELISA durchgeführt.

Die möglichen Reaktionstypen der PPV-infizierten Sorten, die im Experiment 1 beobachtet wurden, waren auch in diesem Versuch sichtbar: über 80% der PPV-infizierten Sorten starben unabhängig von der hypersensiblen Unterlagen bereits vor dem Austrieb im Frühjahr 2009 ab. Vor allem die scharkaanfälligen Sorten 'Katinka', 'Hauszwetsche, Klon Verexal' und 'Cacaks Fruchtbare' starben sofort oder nach einer kurzen Wachstumsperiode mit starken PPV-Symptomen auf den Blättern ab. Die meisten Austriebe der quantitativ resistenten Sorten, 'Hoh 2043' und 'Cacaks Beste', wuchsen mit schlecht erkennbaren Symptomen oder ohne Symptome. Bei diesen Sorten blieben auch jeweils ca. 50% der Pflanzen, die auf die anfällige Unterlage 'Weito' veredelt waren, symptomlos. Dieses Verhalten zeigte auch die Sorte 'Hanita', wie bereits in Experiment 1 beschrieben.

Die Sorten 'Canino', bzw. 'Rubira', wurden erstmals auf den hypersensiblen Unterlagen getestet. Im Laufe der Vegetationsperiode 2009 starben alle PPV-infizierten Austriebe der Sorte 'Canino', die auf die hypersensiblen Unterlagen veredelt waren, ab, meist nach einer Wachstumsperiode mit starken PPV-Symptomen (s. Abb. 4.3-5). Die PPV-infizierten Austriebe von 'Rubira' veredelt auf den Unterlagen 'Docera 5' und 'Dospina 20' starben ebenfalls ab, auf den Unterlagen 'Docera 6' und 'Dospina 22' wuchs ein Teil der PPV-infizierten Sorten bis in die nächste Vegetationsperiode. Insgesamt starben in der Vegetationsperiode 2009 über 70% der Edelsortenaustriebe auf allen hypersensiblen Unterlagen ab (s. Abb. 4.3-6).

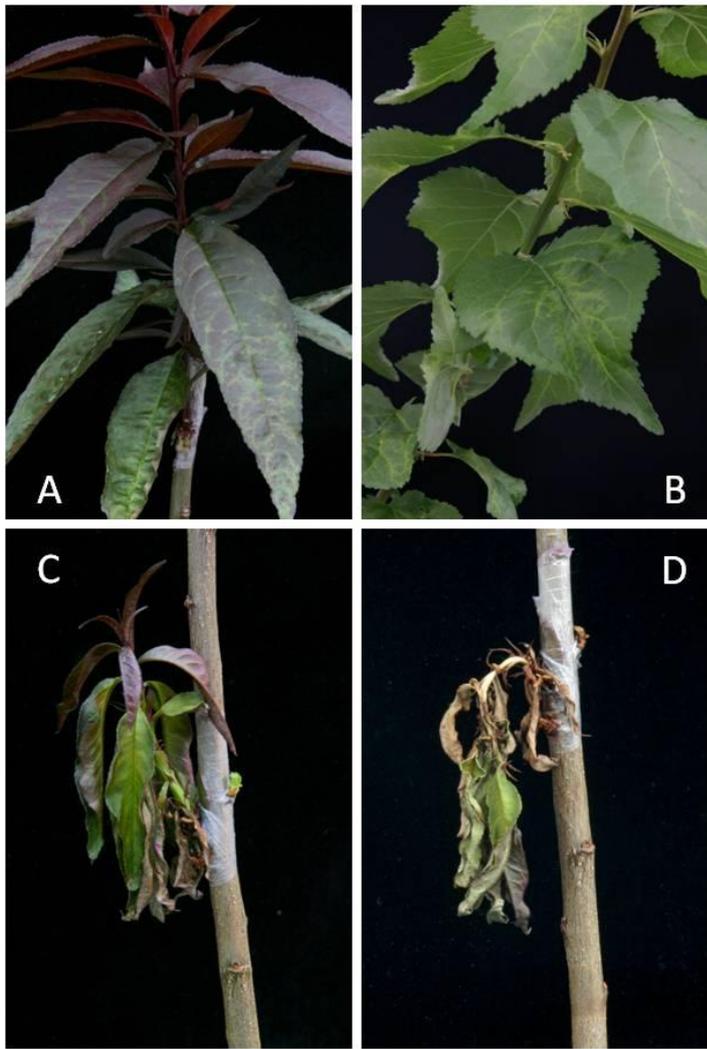


Abb. 4.3-5 Reaktion der PPV-infizierten Sorten 'Rubira' (Pfirsich) und 'Canino' (Aprikose) veredelt auf 'Docera 6'
 A) PPV-Symptome bei 'Rubira': Chlorosen auf der Blattspreite und Blattkräuselungen; B) PPV-Symptome bei 'Canino': Chlorosen entlang der Blattadern; C) Sortenaustrieb von 'Rubira' mit ersten Absterbeerscheinungen (Aufnahme am 25.03.2009); D) abgestorbener Sortenaustrieb (Aufnahme am 30.03.2009)

Bei der Vergleichsgruppe, bei der die Sorten auf die anfällige Unterlage 'Weito' veredelt wurden, starben 5% der Pflanzen ab, was als natürliche Mortalitätsrate unter Gewächshausbedingungen interpretiert werden kann.

In Abb. 4.3-6 sind alle im Oktober 2009 noch wachsenden Pflanzen dargestellt, aufgeteilt in PPV-positive oder PPV-negative Pflanzen. Der PPV-Nachweis wurde mittels DAS-ELISA erbracht oder war zudem an den deutlich ausgeprägten PPV-Symptomen zu erkennen. Bei den meisten dieser Pflanzen konnte PPV nicht nachgewiesen werden. Drei der 2010 wachsenden Pflanzen (Rubira/Docera 6) waren im Test PPV-positiv. Die Viruskonzentration in diesen Pflanzen war den ELISA-Werten entsprechend sehr gering. 2009 konnte PPV nicht nachgewiesen werden. Eine dieser Pflanzen starb in der Vegetationsperiode 2011 ab, die beiden anderen wachsen (Stand März 2012). Es ist davon auszugehen, dass diese Pflanzen frei von PPV sind, da in wiederholten Tests (ELISA, Blue LAMP) PPV nicht detektiert werden konnte.

Bei einem Teil der Pflanzen konnte PPV nicht nachgewiesen werden. Bei Betrachtung dieser Pflanzen nach den verschiedenen Sorten, ergibt sich das gleiche Bild wie bei Experiment 1: Der Großteil dieser Pflanzen sind quantitativ resistente Sorten, wie 'Hoh 2043' und 'Cacaks Beste', außerdem 'Hanita' und 'Rubira'. Bei den Sorten 'Katinka', 'Hauszwetsche, Klon Vexal' und 'Canino' überlebte keine Pflanze die erste Vegetationsperiode. 5% der Versuchspflanzen der Sorte 'Cacaks Fruchtbare' trieben in der Vegetationsperiode 2010 aus und starben daraufhin im Sommer 2010 ab.

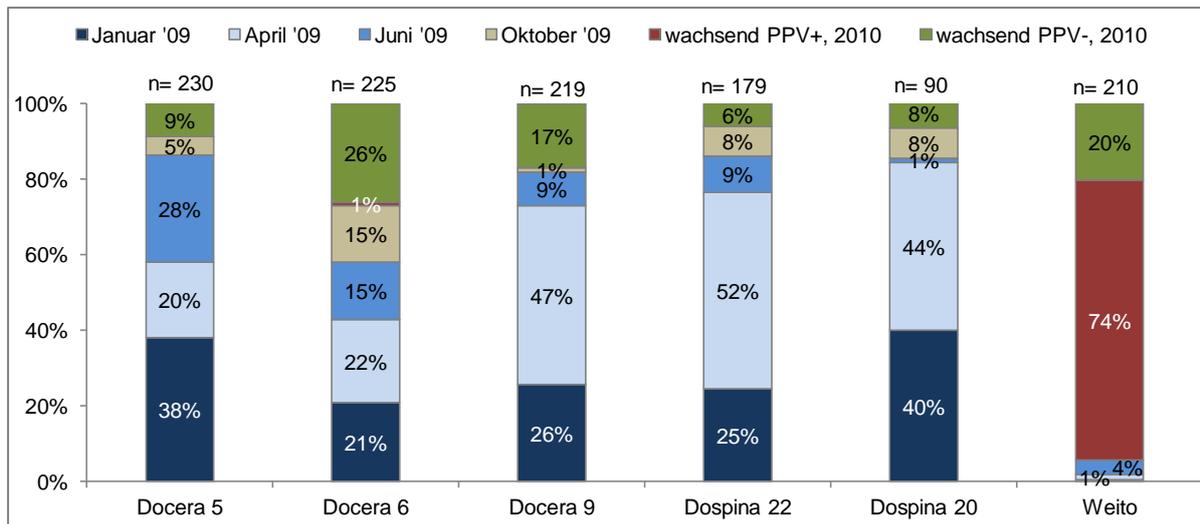


Abb. 4.3-6 Ergebnisübersicht Experiment 2

Anteil der im Laufe der Vegetationsperiode 2009 abgestorbenen, PPV-infizierten Edelsorten sowie der 2010 wachsenden Edelsorten, in Abhängigkeit von der Unterlage; n = Anzahl der Pflanzen

EXPERIMENT 3

Im April 2010 wurde ein Experiment mit weiteren, hypersensiblen Unterlagen ('Docera 253', 'Docera 257', 'Docera 259', 'Docera 260', 'Docera 262' und 'Docera 265') durchgeführt. Da sich die Reaktion der verschiedenen Edelsorten in den vorangegangenen Experimenten bestätigt hatte, wurde hier nur die Sorte 'Elena' verwendet. Bei zwei Unterlagen ('Docera 253' und 'Docera 262') wurde außerdem ein Teil der Pflanzen mit der PPV-freien Edelsorte 'Katinka' veredelt.

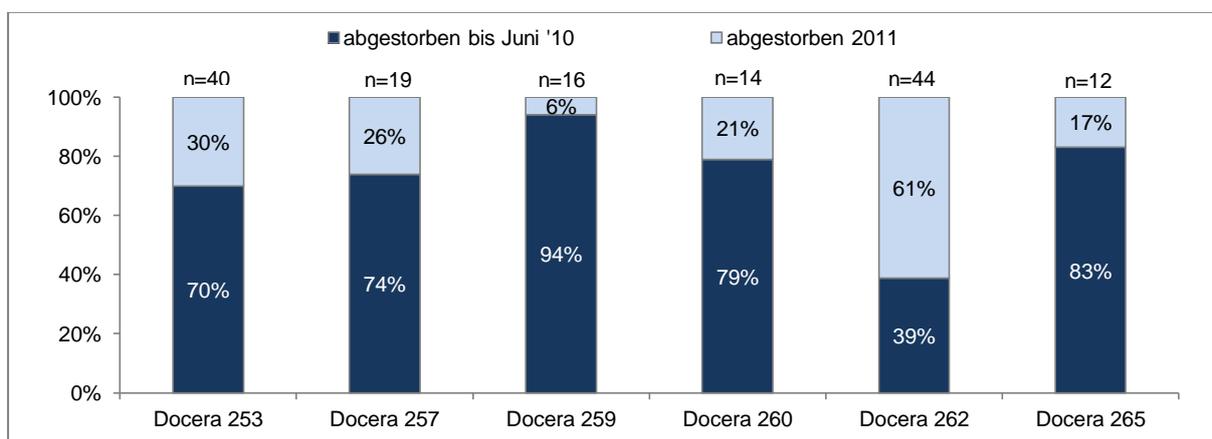


Abb. 4.3-7 Ergebnisübersicht Experiment 3

Anteil der PPV-infizierten, abgestorbenen Austriebe der Sorte 'Elena', in Abhängigkeit von der Unterlage; n = Anzahl der Pflanzen

Bei fünf Unterlagen waren in der ersten Vegetationsperiode bis Juni 2010 über 70% der Edelsortenaustriebe abgestorben. Auffällig war, dass bei der Unterlage 'Docera 262', im Vergleich mit den anderen Unterlagen, ein Großteil der PPV-infizierten Sortenaustriebe (43%) mit starken PPV-Symptomen ohne Absterbereaktion wuchs (s. Abb. 4.3-7). In der Ve-

getationsperiode 2011 waren jedoch alle auf hypersensiblen Unterlagen wachsenden, PPV-infizierten Edelsorten abgestorben. Bei den PPV-freien Pflanzen der Sorte 'Katinka', welche auf zwei verschiedene hypersensible Unterlagen veredelt wurden, blieben 80% (Unterlage 'Docera 253') bzw. 70% (Unterlage 'Docera 262') der Pflanzen erhalten.

EXPERIMENT 4

Im April 2011 wurde ein weiteres Experiment mit den Unterlagen, welche zum Teil bereits in Experiment 3 verwendet wurden ('Docera 257', 'Docera 260', 'Docera 262' und 'Docera 265'), durchgeführt. Zudem kamen die hypersensiblen Unterlagen 'Dospina 240' und 'Dospina 254' zum Einsatz. Als Edelsorte wurde die PPV-infizierte Sorte 'Katinka' verwendet.

Ein Großteil der Augen, über 50% je Unterlage, war bereits im Mai abgestorben und trieb nicht aus. Bei der Unterlage 'Docera 257' waren 100% der veredelten Augen im Mai abgestorben. Wiederum zeigte sich bei 'Docera 262', dass, im Vergleich zu den anderen Unterlagen viele Austriebe von 'Katinka' mit deutlich sichtbaren Symptomen wuchsen und die hypersensible Reaktion verzögert eintrat. Bis Oktober 2011 waren die Edelreisaustriebe auf allen Unterlagen zu 100% abgestorben (s. Abb. 4.3-8).

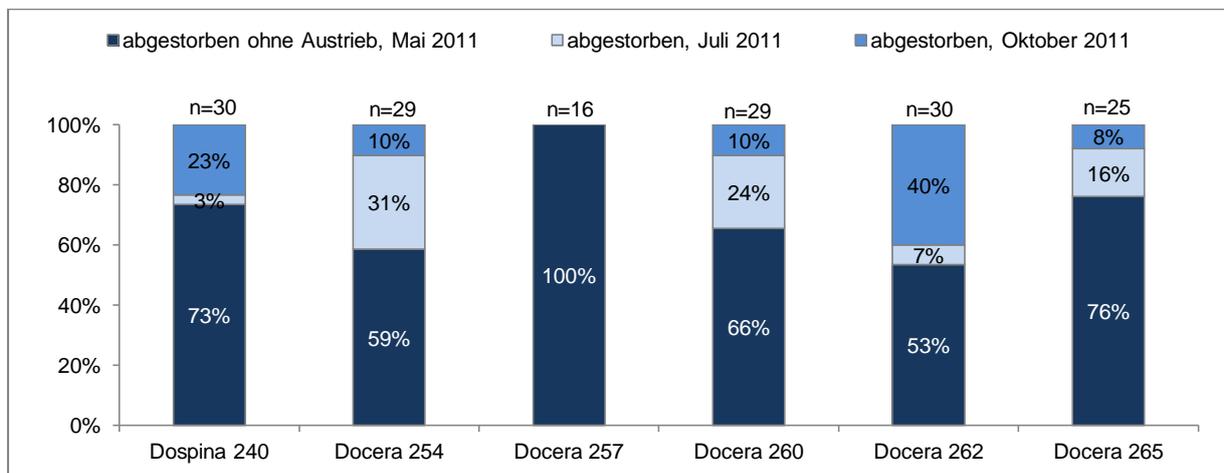


Abb. 4.3-8 Ergebnisübersicht Experiment 4

Anteil der in Vegetationsperiode 2011 abgestorbenen Austriebe der Sorte 'Katinka' in Abhängigkeit von der Unterlage; n = Anzahl der Pflanzen

EXPERIMENT 5

Zur Untersuchung der hypersensiblen Reaktion von 'Docera 5' wurden im Frühjahr 2011 jeweils vier bis fünf Unterlagen mit Rindenspänen der Edelsorte 'Katinka', welche mit verschiedenen PPV-Isolaten infiziert waren, veredelt. Zusätzlich wurde die hypersensible 'Jojo' als Unterlage entsprechend veredelt. Zur genauen Sicherstellung der Reaktion von hypersensiblen Pflanzen bei Infektion mit dem Isolat des M-Stammes aus Bulgarien (PPV 56),

wurden mit diesem Isolat jeweils 15 Unterlagen von 'Docera 5' und 'Jojo' sowie sechs Zuchtklone 'Hoh 4517' als Unterlagen infiziert.

Die Pflanzen wurden jeweils im Mai und im Oktober 2011 bonitiert: Es wurde auf die erfolgreiche Verwachsung des eingesetzten Rindenspars und das Wachstum des Edelsortenaustriebs geachtet. Zeigte ein Sortenaustrieb keine visuell eindeutig erkennbaren PPV-Symptome, wurde dieser mittels ELISA oder Blue LAMP auf PPV-Befall getestet. Die Rate der bis Mai 2011 abgestorbenen Sortenaustriebe ist in Abb. 4.3-9 für die Unterlagen 'Docera 5' und 'Jojo' dargestellt.

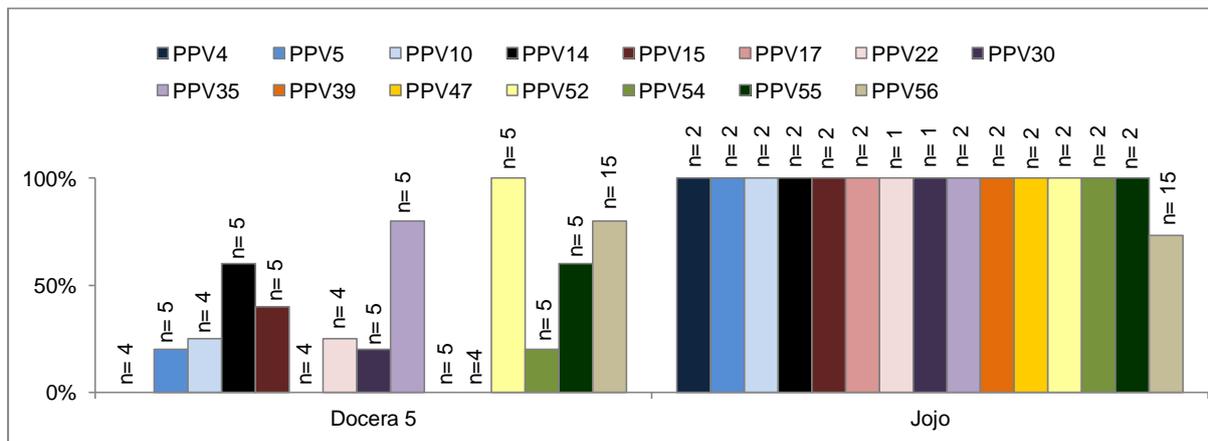


Abb. 4.3-9 Ergebnisse Experiment 5

Anteil der abgestorbenen Edelsortenaustriebe von 'Katinka' auf 'Docera 5' oder 'Jojo' in Abhängigkeit der verwendeten PPV-Isolate (3 Monate nach Veredlung); n = Anzahl der Pflanzen

Bis Oktober 2011 wuchs noch eine PPV-infizierte Pflanze Katinka/Docera 5, welche erste hypersensible Reaktionen zeigte und innerhalb eines weiteren Monats starb. Alle weiteren Edelsortenaustriebe waren bis Oktober 2011 bereits abgestorben. Die Edelsortenaustriebe von 'Katinka', infiziert mit dem M-Isolat aus Bulgarien, veredelt auf 'Hoh 4517' waren bis Mai 2011 abgestorben.

4.3.1.2. Verhalten von mehrjährigen, hypersensiblen Pflanzen bei Inokulation mit PPV

EXPERIMENT 6

Im Sommer 2010 wurden 19 zweijährige, hypersensible Pflanzen des Zuchtklons 'Docera 6' mit Rindenspänen der Sorte 'Katinka', welche jeweils mit unterschiedlichen PPV-Isolaten infiziert waren, inokuliert. Dabei wurden Edelreiser der Sorte 'Katinka' verwendet, welche jeweils mit Isolaten des M-Stamms oder mit je einem Isolat von PPV-Rec oder PPV-EA infiziert waren, verwendet. Pro Baum wurden 2 infizierte Rindenspäne gesetzt.

Folgende Reaktion auf die Inokulation mit den PPV-infizierten Rindenspänen zeigte sich bei allen Pflanzen, unabhängig vom Isolat: Kurze Zeit nach Einsetzen des Rindenspans kam es zur Abstoßungsreaktion mit starken Nekrosen rund um die Inokulationsstelle; ausgehend von der Inokulationsstelle bildeten sich Rindennekrosen an kleineren Trieben, und es kam zum Absterben einzelner Äste oder kleinerer Triebe. Die restlichen Teile der Pflanze wurden nicht beeinträchtigt (s. Abb. 4.3-10).

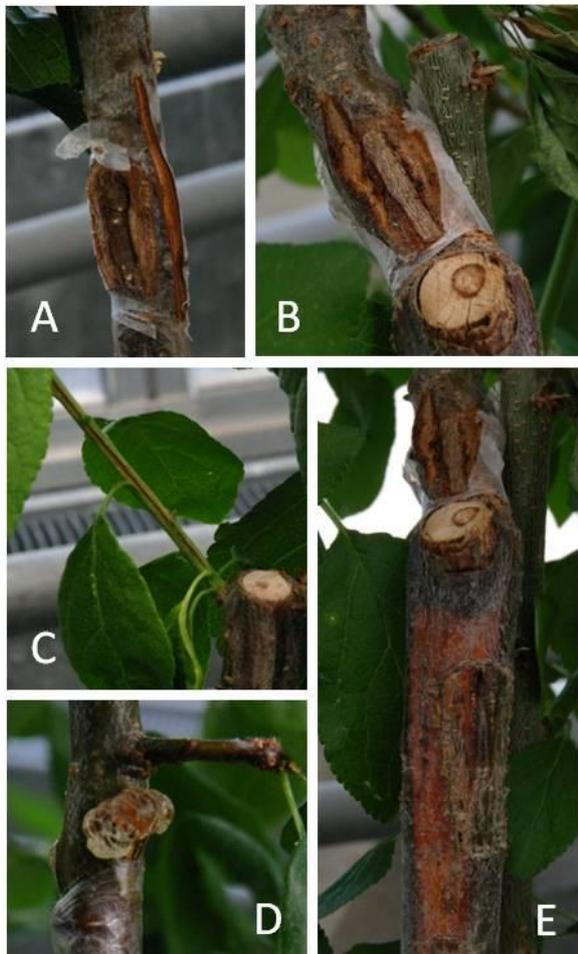


Abb. 4.3-10 Reaktionen von 'Docera 6' auf PPV-Inokulation

A) und B) Abstoßung des PPV-infizierten Rindenspans mit Nekrosenbildung; C) Rindennekrose; D) starker Gummifluss; E) Absterben des Stammes unterhalb der Inokulationsstelle

Im März 2011 wurden die Pflanzen bonitiert und Blüten zum PPV-Nachweis mittels Blue LAMP verwendet. PPV-positiv befunden wurden 2 Pflanzen, eine davon mit PPV-M (PPV14), die andere mit PPV-Rec (PPV 3) infiziert. Bei allen anderen Pflanzen konnte PPV nicht nachgewiesen werden. Bei den Tests im April und im Oktober, bei welchen Blattproben und/oder Rindenproben verwendet wurden, konnte PPV nicht nachgewiesen werden.

Im Juli 2011 wurden drei Pflanzen, die mit Isolaten des M-Stamms (PPV 4, PPV 8 und PPV 56) inokuliert waren, PPV-positiv getestet (s. Tab. 4.3-1). Bei diesen drei und bei vier weiteren Pflanzen waren undeutliche Blattsymptome zu erkennen, während bei den restlichen 12 Pflanzen die Blattsymptome ausblieben. Für den PPV-Nachweis wurden im Fall von keinen erkennbaren Symptomen, Proben nahe der Inokulationsstelle genommen. Außerdem wurden Proben von

abgestorbenen Pflanzenteilen genommen und diese im Vergleich zu wachsendem Pflanzenmaterial aus unmittelbarer Nähe getestet. Dabei zeigte sich, dass in abgestorbenen Trieben PPV oft nachweisbar war, im in unmittelbarer Nähe wachsenden Pflanzenmaterial allerdings nicht. Von den 19 Pflanzen starb in der Vegetationsperiode 2011 eine Pflanze ab (infiziert mit PPV 8, im Juli PPV-positiv getestet).

Tab. 4.3-1 Ergebnisübersicht Experiment 6

Anzahl der in Vegetationsperiode 2011 PPV-positiv getesteten Pflanzen des Zuchtklons 'Docera 6', inokuliert mit verschiedenen PPV-Isolaten

PPV		Zuchtklon	Anzahl PPV-positiv getesteter Pflanzen 2011			
Stamm	Isolat		Blue LAMP 2011			ELISA 2011
		Docera 6	März - Blüten	April - Blätter	Juli - Blätter	Oktober - Blätter/Rinde
M	PPV 4	4	0	0	1	0
	PPV 8	4	0	0	1	0
	PPV 14	1	1	0	0	0
	PPV 19	1	0	0	0	0
	PPV 56	5	0	0	1	0
Rec	PPV 3	2	1	0	0	0
EA	PPV 11	2	0	0	0	0
Anzahl, gesamt		19	2	0	3	0

EXPERIMENT 7

Im Frühjahr 2009 wurden Sorten, welche auf zweijährigen, hypersensiblen Unterlagen, 'Hoh 4571' oder 'Jojo', veredelt waren, mit Rindenspänen der Sorte 'Katinka' (PPV-D) inokuliert. Bei den Sorten handelte es sich um 'Hauszwetsche, Typ Schüfer', 'Haganta' und 'Katinka' und um den hypersensiblen Zuchtklon 'Hoh 4517'. Pro Baum wurden zwei infizierte Rindenspäne gesetzt.

Bei den scharkaanfälligen Edelsorten waren kurze Zeit nach der Inokulation PPV-Symptome auf den Blättern sichtbar. Bei allen Pflanzen konnte beobachtet werden, dass ausgehend von der Inokulationsstelle kleinere Triebe abstarben, die Pflanzen sonst aber keine hypersensible Reaktion zeigten. Die Auswertung der Testergebnisse des PPV-Nachweis mittels Blue LAMP zeigte, dass in allen Edelsorten PPV nachgewiesen werden konnte, außer in den Pflanzen mit 'Jojo' als Unterlage (2 Pflanzen, davon starb eine 2009, die zweite 2010 ab) und in den Pflanzen, bei welchen sowohl als Unterlage, als auch als veredelte Sorte hypersensible Zuchtklone (2 Pflanzen, eine starb 2010 ab, in der zweiten konnte PPV nicht nachgewiesen werden) verwendet wurden (s. Tab. 4.3-2).

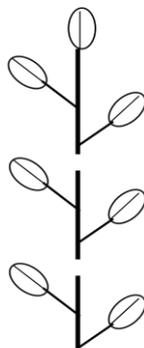
Tab. 4.3-2 Ergebnisübersicht Experiment 7

Anzahl der in Vegetationsperiode 2011 PPV-positiv bzw. PPV-negativ getesteten Sorten sowie die Anzahl der bis 2011 abgestorbenen Pflanzen (PPV-Nachweis mittels Blue LAMP)

Sorte	Unterlage	Anzahl der Pflanzen	Anzahl der abgestorbenen Pflanzen	Anzahl PPV-positiver Pflanzen 2011	Anzahl PPV-negativer Pflanzen 2011
Hauszwetsche, Typ Schüfer	Hoh 4571	3	-	3	-
Hauszwetsche, Typ Schüfer	Jojo	2	2	-	-
Haganta	Hoh 4571	6	-	6	-
Katinka	Hoh 4571	2	-	2	-
Hoh 4517	Hoh 4571	2	1	-	1
Anzahl, gesamt		15	3	11	1

EXPERIMENT 8

Im Frühjahr 2009 wurden bei einjährigen Bäumen der Europäischen Pflaume mit Zwischenveredlung PPV-infizierte Rindenspäne der Sorte 'Katinka' an verschiedenen Stellen (Edelreis, Zwischenveredlung oder Unterlage) eingesetzt. Die Pflanzen waren entweder mit einer hypersensiblen Zwischenveredlung ('Jojo' oder 'Hoh 4517'), einem hypersensiblen Edelreis ('Jojo') oder einem quantitativ resistenten Edelreis ('Cacaks Beste') mit hypersensibler Zwischenveredlung ('Jojo') veredelt (s. Tab. 4.3-3). Als anfällige Edelsorte wurde 'Hauszwetsche, Typ Schüfer', als anfällige Zwischenveredlungen 'Hauszwetsche, Typ Wolff' oder 'Katinka' und als Unterlagen 'GF 655/2' oder Myrobalanen-Sämlinge verwendet. Pro Pflanze wurden jeweils zwei PPV-infizierte Rindenspäne in Edelsorte, Zwischenveredlung oder Unterlage gesetzt.

Tab. 4.3-3 Übersicht der Veredlungsvarianten


	Variante 1	Variante 2	Variante 3
Edelreis (ER)	anfällig	hypersensibel resistent	quantitativ resistent
Zwischenveredlung (ZV)	hypersensibel resistent	anfällig	hypersensibel resistent
Unterlage (UL)	anfällig	anfällig	anfällig
Anzahl Pflanzen	25	25	11

Die erste Bonitur fand ein Monat nach der PPV-Inokulation statt. Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich erste schwache Reaktionen auf die Infektion: Bei PPV-Inokulation von einem anfälli-

gen Edelreis waren erste PPV-Symptome sichtbar und bei PPV-Inokulation von einem hypersensiblen Edelreis bzw. einer hypersensiblen Zwischenveredlung begannen kleinere Triebe abzusterben. Die Quantitativ resistente Edelsorte oder die Unterlagen zeigten zu diesem Zeitpunkt keine Reaktion auf die PPV-Inokulation. Bei der zweiten und dritten Bonitur, ein Jahr bzw. zweieinhalb Jahre nach der Inokulation, wurde zusätzlich zur visuellen Bonitur, ein PPV-Nachweis mittels DAS-ELISA bzw. Blue LAMP vorgenommen. Eine Übersicht zu den jeweiligen Reaktionen der Pflanze und den Ergebnissen der PPV-Nachweise findet sich in Tab. 4.3-4.

Wurde das PPV-infizierte Rindenstück in die hypersensible Zwischenveredlung einer Pflanze mit anfälliger Sorte und Unterlage veredelt (Veredlungsvariante 1), konnte ein Jahr nach Inokulation sowohl im Edelreisaustrieb, als auch im Gewebe der Unterlage PPV mittels Blue LAMP nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Virusverbreitung ausgehend von einer hypersensiblen Pflanze möglich ist. Analog verhielt es sich bei Pflanzen, bei denen das Inokulationschip in den anfälligen Edelsortenaustrieb veredelt wurde: Bei der hypersensiblen Zwischenveredlung konnten Symptome einer hypersensiblen Reaktion beobachtet werden und in den Austrieben der anfälligen Unterlage waren PPV-Symptome zu erkennen sowie PPV mittels Blue LAMP detektierbar. Im Pflanzengewebe von hypersensiblen Sorten war PPV nicht nachweisbar, nur in abgestorbenem Gewebe konnte vereinzelt mittels Blue LAMP PPV detektiert werden.

Im Fall einer hypersensiblen Sorte ist zu unterscheiden zwischen 'Jojo' und 'Hoh 4517', welche beide als hypersensible Zwischenveredlung verwendet wurden. In Pflanzenteilen der Sorte 'Jojo' konnte nur in abgestorbenem oder stark nekrotischem Pflanzenmaterial PPV nachgewiesen werden (mittels Blue LAMP), in Pflanzenteilen des Zuchtklons 'Hoh 4517' wurde dagegen auch vereinzelt in unauffällig wachsendem Pflanzenmaterial PPV nachgewiesen. Nach zweieinhalb Jahren waren die



Abb. 4.3-11 Reaktion der hypersensiblen Sorte 'Jojo' drei Monate nach der PPV-Inokulation mittels infizierter Rindenspäne ('Katinka', PPV-D)

Einzelne Triebe sterben, beginnend an der Spitze, ab, nächstgelegene Triebe zur Inokulationsstelle sterben in Folge.

A) Jojo/Katinka/Myrobalane, Inokulation in 'Jojo', B) Jojo/HZ Wolff/GF 655/2, Inokulation in 'Jojo', C) Nekrotisierung von Borkengewebe der hypersensiblen Sorte nahe der Inokulationsstelle

hypersensiblen Zwischenveredlungen und die darauf veredelten, anfälligen Edelsorten meistens abgestorben, wohingegen die Unterlagen, in denen PPV nachgewiesen wurde, meist wuchsen.

Bei PPV-Inokulation in die Unterlage zeigten sich ähnliche Reaktionen, jedoch war die Symptomausprägung bei der anfälligen Sorte ('Hauszwetsche, Typ Schüfer') und den hypersensiblen Sorten verzögert. Ein Jahr nach Inokulation war eine beginnende hypersensible



Abb. 4.3-12 Reaktion der hypersensiblen Sorte 'Jojo' drei Monate nach der PPV-Inokulation mittels infizierter Rindenspäne

Der Inokulationsstelle nächstgelegene Triebe sterben ab, aber auch einzelne Triebe entfernt von der Inokulationsstelle (Jojo/HZ Wolff/GF 655/2, Inokulation in 'Jojo', Rindenspäne von 'Katinka', PPV-D)

Reaktion in den hypersensiblen Zwischenveredlungen und Edelsorten durch Rindennekrosen und Absterben kleiner Zweige sichtbar. In der anfälligen Edelsorte war PPV nachweisbar.

Bei Veredlungsvariante 2 (hypersensibles Edelreis, anfällige Zwischenveredlung und anfällige Unterlage) zeigten die hypersensiblen und anfälligen Veredlungspartner ähnliche Reaktionen wie bei Variante 1. Hier war die Verbreitung des Virus von der Inokulationsstelle aus gut sichtbar, da als erstes Triebe und kleine Zweige abstarben, welche oberhalb und auf der Seite der Inokulationsstelle lagen (s. Abb. 4.3-11). Es konnte allerdings auch beobachtet werden, dass neben Trieben, welche nahe der Inokulationsstelle lagen, auch vereinzelte Triebe, die entfernter vom Inokulationschip wuchsen, abstarben, ohne sichtbare Reaktionen der darunterliegenden Triebe (s. Abb. 4.3-12).

Bei Veredlungsvariante 3 (quantitativ resistente Edelsorte, hypersensible Zwischenveredlung und anfällige Unterlage) war erst zweieinhalb Jahre nach der PPV-Inokulation in das Edelreis eine hypersensible Reaktion bei der hypersensiblen Zwischenveredlung sichtbar, PPV-Symptome bei der Unterlage erkennbar und in Austrieben der Unterlage

PPV nachweisbar. In der quantitativ resistenten Edelsorte war bereits nach einem Jahr PPV nachweisbar, jedoch auch nach zweieinhalb Jahren waren keine PPV-Symptome sichtbar.

Die Inokulation in die hypersensible Zwischenveredlung führte zur beginnenden HR und schließlich zum Absterben der Zwischenveredlung und somit auch zum Absterben der Edelsorte. Ein PPV-Nachweis war nach 2,5 Jahren ausschließlich in der Unterlage möglich.

Tab. 4.3-4 Übersicht über die Reaktionen der einzelnen Veredlungspartner nach PPV-Inokulation

Angaben für jeweils 1 Monat, 1 Jahr und 2,5 Jahre nach der PPV-Inokulation (beige hinterlegt ist jeweils der Veredlungspartner, an dem die PPV-Inokulation vorgenommen wurde, gekennzeichnet in blauer Schrift sind die Reaktionen der hypersensiblen Sorten/Zuchtklone)

Veredlungspartner	Variante 1 (ZV hypersensibel)			Variante 2 (ER hypersensibel)			Variante 3 (ER quantitativ resistent, ZV hypersensibel)		
	1 Monat nach Inokulation	1 Jahr nach Inokulation	2,5 Jahre nach Inokulation	1 Monat nach Inokulation	1 Jahr nach Inokulation	2,5 Jahre nach Inokulation	1 Monat nach Inokulation	1 Jahr nach Inokulation	2,5 Jahre nach Inokulation
Anzahl Pflanzen	10			15			5		
ER	PPV Blattsymptome	PPV Blattsymptome, PPV-Nachweis +	abgestorben	beginnende HR	HR, PPV-Nachweis -	abgestorben	unauffällig	unauffällig, PPV-Nachweis teilweise +	unauffällig, PPV-Nachweis meist +
ZV	beginnende HR oder unauffällig	stärkere HR	abgestorben	unauffällig	meist keine Symptome, PPV-Nachweis meist -	PPV-Nachweis +	unauffällig	unauffällig, PPV-Nachweis -	meist abgestorben, Nachweis PPV-
UL	unauffällig	meist PPV-Blattsymptome, PPV-Nachweis +	PPV-Blattsymptome, PPV-Nachweis +	unauffällig	unauffällig, PPV-Nachweis -	teilweise Symptome, PPV-Nachweis meist -	unauffällig	unauffällig	teilweise Symptome, PPV-Nachweis +
Anzahl Pflanzen	10			9			5		
ER	unauffällig	teilweise PPV-Symptome, PPV-Nachweis teilweise +	meist abgestorben	beginnende HR oder unauffällig	HR, PPV-Nachweis -	meist abgestorben	unauffällig	unauffällig, PPV-Nachweis -	abgestorben
ZV	beginnende HR oder unauffällig	beginnende HR oder HR, PPV-Nachweis -	meist abgestorben	unauffällig	teilweise Symptome, PPV-Nachweis +	teilweise Symptome, PPV-Nachweis +	unauffällig	beginnende HR	abgestorben oder PPV-Nachweis -
UL	unauffällig	meist unauffällig, PPV-Nachweis teilweise +	teilweise Symptome, PPV-Nachweis +	unauffällig	teilweise Symptome, PPV-Nachweis +	teilweise Symptome, PPV-Nachweis +	unauffällig	unauffällig	teilweise Symptome, PPV-Nachweis +
Anzahl Pflanzen	5			1			1		
ER	unauffällig	meist keine Symptome, PPV-Nachweis -	teilweise Symptome, PPV-Nachweis +	unauffällig	HR, PPV-Nachweis -	abgestorben	unauffällig	unauffällig, PPV-Nachweis -	PPV-Nachweis +
ZV	unauffällig	beginnende HR, PPV-Nachweis -	teilweise HR, PPV-Nachweis -	unauffällig	PPV-Symptome, PPV-Nachweis +	-	unauffällig	unauffällig, PPV-Nachweis -	PPV-Nachweis -
UL	unauffällig	teilweise PPV-Symptome, PPV-Nachweis +	teilweise PPV-Symptome, PPV-Nachweis +	unauffällig	PPV-Symptome, PPV-Nachweis +	PPV-Nachweis +	unauffällig	unauffällig	-

4.3.2. Versuche im Freiland unter natürlichem PPV-Infektionsdruck

EXPERIMENT 9

12 verschiedene Sorten-Unterlagenkombinationen mit jeweils einer hypersensiblen Unterlage wurden im Frühjahr 2009 in der Scharkaversuchsanlage in Weil der Stadt (LTZ) ausgepflanzt. In der Versuchsanlage stehen PPV-infizierte Bäume, die als Infektionsquellen für natürliche Übertragung durch Blattläuse dienen.

Die Pflanzen wurden, beginnend 2009, jedes Jahr einmal beprobt (Blattproben der Edelsorten) und mittels DAS-ELISA auf PPV-Befall getestet (s. Tab. 4.3-5).

Tab. 4.3-5 Ergebnisse Experiment 9

Anzahl der Sorten-Unterlagen-Kombinationen und Ergebnisse des PPV-Nachweises (DAS-ELISA 2011)

Sorte/Unterlage	Anzahl Pflanzen	Anzahl PPV-positiver Pflanzen 2011
Cacaks Beste/Docera 5	3	-
Cacaks Fruchtbare/Docera 5	2	-
Jojo/Docera 5	1	-
Katinka/Docera 5	11	-
Hauszwetsche, Typ Schüfer/Docera 5	5	-
Hauszwetsche, Typ Schüfer/Docera 6	5	-
Cacaks Beste/Docera 9	2	-
Hauszwetsche, Typ Schüfer/Dospina 22	3	-

Alle durchgeführten PPV-Tests (2009, 2010 und 2011) der Edelsorten der 2009 gepflanzten Bäume waren negativ, es konnte keine Infektion der Pflanzen festgestellt werden.

EXPERIMENT 10

In der Scharkaversuchsanlage in Oppenheim (DLR) wurden im Frühjahr 2010 insgesamt 1200 Unterlagen von vier hypersensiblen und einem anfälligen Unterlagenzuchtklon zwischen Reihen zehnjähriger, scharkainfizierter Bäume gepflanzt. Im Sommer 2010 wurden die zu diesem Zeitpunkt veredlungsfähigen Unterlagen mit den PPV-anfälligen Sorten 'Katinka' und 'Hauszwetsche, Typ Schüfer', dem quantitativ resistenten Zuchtklon 'Hoh 2043' und dem hypersensiblen Zuchtklon 'Hoh 4517' veredelt. Im August 2011 wurden sowohl die Edelreis-austriebe, als auch die Unterlagen beprobt und Mischproben (*bulks*) von jeweils maximal zehn aufeinanderfolgenden Pflanzen der gleichen Sorten-Unterlagen-Kombination mittels Blue LAMP auf PPV-Befall getestet (s. Tab. 4.3-6).

Tab. 4.3-6 Ergebnisse Experiment 10

Anzahl der PPV-positiven *bulks* der Edelsortenaustriebe nach Edelsorte und nach Unterlage (PPV-Nachweis mittels Blue LAMP 2011)

nach Edelsorte	Gesamtzahl <i>bulks</i> der Sorten pro Sorte	Anzahl PPV-positiver <i>bulks</i>	nach Unterlage	Gesamtzahl <i>bulks</i> der Sorten pro Unterlage	Anzahl PPV-positiver <i>bulks</i>
Katinka	48	6	Wangenheims	20	10
Hoh 2043	24	5	Docera 5	20	3
Hoh 4517	24	1	Docera 6	20	1
Hauszwetsche, Typ Schüfer	24	6	Docera 9	20	1
			Dospina 20	20	1
			Dospina 22	20	2

In einer Mischprobe der Edelsorten, nämlich in einem *bulk* des hypersensiblen Zuchtklons 'Hoh 4517', konnte PPV mittels Blue LAMP detektiert werden. Bei den Mischproben der anfälligen Sorten, bzw. des quantitativ resistenten Zuchtklons 'Hoh 2043', waren jeweils fünf bis sechs Proben PPV-positiv. Bei der Aufteilung der infizierten Edelsorten auf die verschiedenen Unterlagen ergibt sich, dass die Hälfte der Mischproben der Edelsorten, veredelt auf die anfällige Unterlage 'Wangenheims' ('Weiwa[®]'), PPV-infiziert ist. Bei den hypersensiblen Unterlagen sind maximal 15% der Mischproben infiziert.

In Abb. 4.3-13 sind die PPV-infizierten *bulks* der einzelnen Sorten und Unterlagen je Sorten-Unterlagen-Kombination und die Position der PPV-Infektionsquelle sowie die Pflanzposition der anfälligen Unterlagen 'Weiwa[®]' angegeben.

	Reihe 1		Reihe 3		Reihe 5		Reihe 7		Reihe 9
Sorten-Unterlagen-Kombination [infizierte <i>bulks</i> der Sorte/infizierte <i>bulks</i> der Unterlage]	Katinka/ Dospina 22 [0/0]	PPV-Infektionsquelle	Hoh 2043/ Weiwa [®] [2/3]	PPV-Infektionsquelle	Hoh 4517/ Docera 5 [0/0]	PPV-Infektionsquelle	Katinka/ Docera 6 [0/0]	PPV-Infektionsquelle	Hauszwetsche/ Docera 9 [0/0]
	Katinka/ Dospina 20 [1/3]		Hoh 2043/ Dospina 22 [0/3]		Hoh 4517/ Weiwa [®] [1/3]		Katinka/ Docera 5 [1/0]		Hauszwetsche/ Docera 6 [0/0]
	Katinka/ Docera 9 [0/0]		Hoh 2043/ Dospina 20 [0/2]		Hoh 4517/ Dospina 22 [0/1]		Katinka/ Weiwa [®] [1/3]		Hauszwetsche/ Docera 5 [0/0]
	Katinka/ Docera 6 [0/0]		Hoh 2043/ Docera 9 [1/0]		Hoh 4517/ Dospina 20 [0/1]		Katinka/ Dospina 22 [1/0]		Hauszwetsche/ Weiwa [®] [4/1]
	Katinka/ Docera 5 [0/0]		Hoh 2043/ Docera 6 [1/0]		Hoh 4517/ Docera 9 [0/1]		Katinka/ Dospina 20 [0/2]		Hauszwetsche/ Dospina 22 [1/0]
	Katinka/ Weiwa [®] [2/1]		Hoh 2043/ Docera 5 [1/2]		Hoh 4517/ Docera 6 [0/1]		Katinka/ Docera 9 [0/0]		Hauszwetsche/ Dospina 20 [0/1]

Abb. 4.3-13 Pflanzplan der Sorten-Unterlagen-Kombinationen mit Angabe der Anzahl der infizierten *bulks* der Sorten und Unterlagen

Die Anzahl der infizierten *bulks* je Sorte/Unterlage ist rot markiert. Die Pflanzposition der anfälligen Unterlagensorte 'Weiwa[®]' ist grau hinterlegt.

Auch in Mischproben der Unterlagen war PPV nachweisbar. Die höchste Infektionsrate konnte bei der hypersensiblen Unterlage 'Dospina 20' (17%) festgestellt werden. Die Infektionsrate der Mischproben der Unterlage 'Weiwa[®]' betrug 7% und für alle weiteren hypersensiblen Unterlagen max. 3%. Teilweise war in Mischproben der Unterlagen sowohl von anfälligen (3%), aus auch von hypersensiblen Pflanzen (2%), PPV detektierbar, obwohl die Mischproben der Edelsorten befallsfrei waren.

4.3.3. Histologische Untersuchung der Veredlungsstelle

Die Proben für die Untersuchung der histologischen Veränderungen an der Veredlungsstelle zwischen dem Gewebe einer hypersensiblen Pflanze und demjenigen einer PPV-infizierten, anfälligen Veredlungssorte wurden

Vorab wurde untersucht, ob der Parafilm, welcher für die Veredlung verwendet wurde, hinderlich beim Schneiden der Dauerpräparate mit dem Mikrotom ist. Es stellte sich heraus, dass das Schneiden der Präparate mit Parafilm nicht möglich ist, da sich dieser in seiner Konsistenz nicht verändert, sich mit dem Acrylharz nicht verbindet und so keine sauberen Schnitte möglich sind und zum Teil auch Lufteinschlüsse entstehen. So wurde der Parafilm von allen Proben spätestens kurz vor dem Einbetten abgenommen. Viele Proben, welche bereits 2 Wochen nach Veredlung genommen wurden, konnten daher nicht verwendet werden, da diese noch nicht verwachsen und somit nicht stabil genug waren, um zu Schnittpräparaten verarbeitet zu werden. Vor allem bei den Proben, welche von spaltpropfveredelten Pflanzen genommen wurden, traf dies zu (auch bei späteren Probennahmeterminen).

Die Präparate wurden mit ACN-Lösung gefärbt (s. Seite 73). Phenylpropanoide, welche bei einer HR entstehen, werden durch die ACN-Lösung orange gefärbt. Bei der mikroskopischen Untersuchung der gefärbten Dünnschnitte ergaben sich folgende Ergebnisse: Bei allen Proben, welche mit nicht infizierten Rindenspänen veredelt wurden, konnte spätestens drei Wochen nach der Veredlung eine beginnende Verwachsung des Rindenspans mit der Unterlage beobachtet werden. Beim ersten Probennahmetermin, zwei Wochen nach Veredlung, zeigte sich meistens noch keine Reaktion.

In Abb. 4.3-14 ist ein histologischer Schnitt durch die Veredlungsstelle von der hypersensiblen Unterlage 'Docera 5' mit einem PPV-freien Rindenspan ('Katinka') sechs Wochen nach Veredlung dargestellt. Die nekrotische Linie im Veredlungsspalt wurde abgebaut, Zellteilungen setzten ein und Kallusgewebe wurde gebildet. Der Veredlungsspalt ist gefüllt mit undifferenziertem Gewebe.

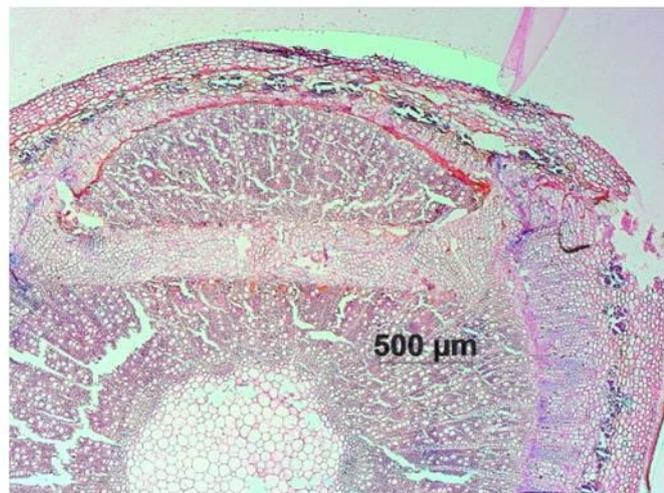


Abb. 4.3-14 Schnitt durch die Veredlungsstelle zwischen der hypersensiblen Unterlage 'Docera 5' und einem PPV-freien Rindenspan ('Katinka')
Sechs Wochen nach Veredlung zeigt sich die Verwachsung der beiden Gewebe.

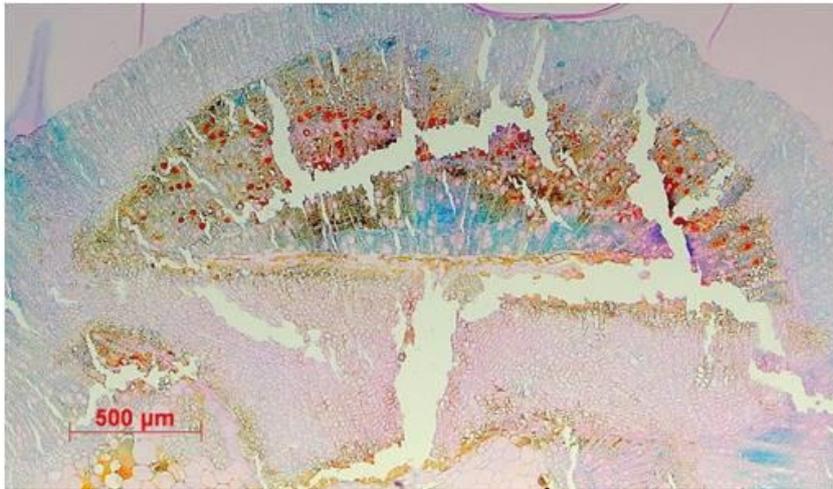


Abb. 4.3-15 Schnitt durch die Veredlungsstelle zwischen der hypersensiblen Unterlage 'Docera 5' und einem PPV-infizierten Rindenspan ('Katinka')

Sechs Wochen nach der Veredlung, bildet sich nekrotisches Gewebe innerhalb des Veredlungsspalts, es kommt zur Abstoßung des Spans.

Bei Veredlung mit PPV-infizierten Rindenspänen zeigte sich bei der anfälligen Sorte 'Weiwa[®]' ebenfalls eine gute Verwachsung der Veredlungsstelle. Bei den beiden hypersensiblen Unterlagen 'Jojo' und 'Docera 5' konnte teils schon nach wenigen Wochen, teils erst nach sechs Wochen die Nekrotisierung des Gewebes

entlang des Veredlungsspalts oder des Absterben des Rindenspans festgestellt werden. In Abb. 4.3-15 ist der Querschnitt durch die Veredlungsstelle von 'Docera 5' mit einem PPV-infizierten Rindenspan zu sehen. Nach anfänglicher Bildung von undifferenziertem Gewebe wird der Rindenspan abgestoßen. Die Nekrotisierung und das Absterben des Rindenspans zeigen sich v. a. durch die Dekompartimentierung der Zellen und die Formveränderung durch Auflösen des Plasmalemmas.

Die mittels Spaltpfropfung veredelten Pflanzen zeigten eine ähnliche Reaktion. Die PPV-freien Edelsorten verwuchsen mit der Unterlage (s. Abb. 4.3-16 A) und bei der Veredlung mit PPV-infizierten Edelsorten zeigte sich vor allem in den hypersensiblen Unterlagen nekrotisierte Zellen (s. Abb. 4.3-16 B).

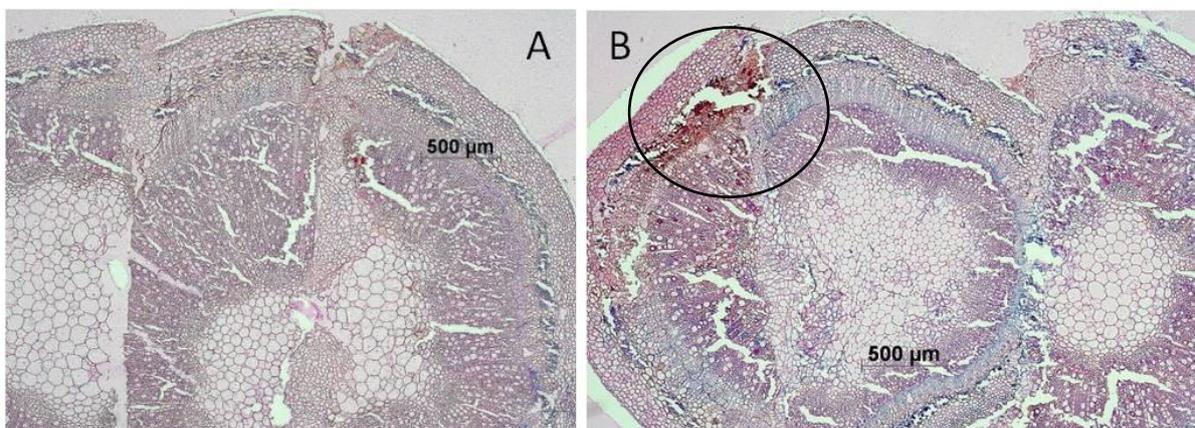


Abb. 4.3-16 Schnitt durch die Veredlungsstelle zwischen der hypersensiblen Unterlage 'Jojo' und einer PPV-freien (A) oder einer PPV-infizierten (B) Sorte ('Katinka') mittels Spaltpfropfung
Aufnahmen vier bzw. fünf Wochen nach Veredlung

4.4. DISKUSSION

4.4.1. Veredlungsversuche unter Gewächshaubedingungen (Experimente 1 bis 4)

In den Experimenten 1 bis 4 wurden verschiedene einjährige, hypersensible Pflanzen als Unterlagen getestet. Die Reaktion der PPV-infizierten Edelsorten veredelt auf hypersensible Unterlagen sowie die Reaktion der hypersensiblen Unterlagen wurde untersucht. Nachfolgend werden erst die Durchführung der Experimente und im Anschluss daran das Verhalten der Edelsorten sowie das Verhalten der hypersensiblen Unterlagen diskutiert.

4.4.1.1. Durchführung der Experimente im Gewächshaus

PFLANZENANZAHL

Bei der Prüfung von Pflanzen auf ihr Resistenzverhalten findet man meist Untersuchungen, in welchen drei bis maximal zehn Wiederholungen durchgeführt werden. So z. B. untersuchten Zagrai et al. (2009) verschiedene Sorten auf ihr Resistenzverhalten gegenüber PPV, wobei sieben Wiederholungen pro Sorte und Variante zum Einsatz kamen. Kegler et al. (1991) prüften drei Bäume, um die Resistenz der Hybride 'K4' gegenüber dem Scharkavirus zu charakterisieren. Beim Einsatz von wenigen Individuen ist das Ergebnis, vor allem, wenn es zum Ausfall von Pflanzen kommt (kulturbedingt, umweltbedingt), nicht aussagekräftig. In der vorliegenden Arbeit wurde in den Experimenten 1 und 2 jeweils eine größere Anzahl an Pflanzen verwendet, um ein repräsentatives, aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. So wurden diese Experimente zum Teil mit 50 Pflanzen pro Veredlungsvariante vorgenommen. Die Untersuchung von solch einer großen Anzahl von Pflanzen ist allerdings mit höherem Aufwand verbunden. Es müssen sowohl die entsprechenden Kapazitäten vorhanden sein (Pflanzenmaterial, Platz), als auch die Versorgung der Pflanzen, welche auf gleichbleibende Weise stattzufinden hat, muss sichergestellt sein, damit nicht durch ungleiche Haltungsbedingungen, die Reaktion der Pflanzen beeinflusst wird. Vor allem wurde auf gleichartige Kulturbedingungen der Pflanzen bei der Durchführung der Versuche geachtet und beim Erkennen von negativen, äußeren Einflüssen auf die Pflanzen (z. B. Überwässerung), wurden entsprechende Pflanzen für die Ergebnisauswertung nicht verwendet.

FESTSTELLUNG DES VIRUSSTATUS

Auch aufgrund der großen Anzahl der Pflanzen, wurde bei manchen Pflanzen kein Virusnachweis durchgeführt, sondern nach sichtbaren PPV-Symptomen bewertet, ob eine Pflanze infiziert war oder nicht. Die Feststellung der PPV-Infektion an nur einem Kriterium, nämlich der sichtbaren Symptomausprägung, birgt die Gefahr der Fehleinschätzung der Symptome. Versuche dieser Größenordnung sind jedoch schwierig anders durchzuführen. Allerdings erfolgte nur im Fall von eindeutig sichtbaren PPV-Symptomen kein weiterer PPV-Nachweis, womit die Möglichkeit einer Fehleinschätzung relativiert wurde.

Der PPV-Nachweis erfolgte entweder mittels DAS-ELISA oder Blue LAMP. Die Blue LAMP ist gegenüber der RT-PCR eine vereinfachte Methode, da sie mit geringerem Arbeitsaufwand kostengünstiger durchgeführt werden kann. Die Sensitivität und Spezifität der Blue LAMP ist verglichen mit der RT-PCR sehr hoch (Hadersdorfer et al. 2011). Der Nachweis von PPV mittels DAS-ELISA ist bei geringen Viruskonzentrationen weniger sensitiv als die Blue LAMP (ebda.) aber weniger anfällig für ein falsch-positives Ergebnis (Capote et al. 2009).

KONTROLLGRUPPEN

Durch eine Kontrollgruppe kann ausgeschlossen werden, dass das Absterben der hypersensiblen Pflanze durch andere Ursachen bedingt ist, als aufgrund der hypersensiblen Reaktion gegenüber PPV, da im Vergleich dazu unter denselben Bedingungen eine nicht infizierte Pflanze symptomlos wächst oder eine infizierte, anfällige Pflanze symptomtragend wächst. Bei vielen der bekannten Untersuchungen der Scharkaresistenz wurde ebenfalls eine solche Kontrollgruppe mitgeführt. So z. B. untersuchten Grüntzig et al. mehrere Pflaumensorten nach PPV-Inokulation anhand verschiedener Inokulationsmethoden, wobei jeweils die anfällige Sorte 'Hauszwetsche' als anfällige Sorte einbezogen wurde (Grüntzig et al. 2001).

Bei den meisten Experimenten in der vorliegenden Arbeit wurde eine Vergleichsgruppe, entweder in Form von nicht infizierten, gleichartig veredelten Pflanzen oder auch als Kontrollveredlungen mit einer anfälligen Sorte, mitgeführt.

VEREDLUNGSZEITPUNKT

Als Zeitpunkt für die Veredlungen der Unterlagen wurde entweder das Frühjahr, oder auch der Sommer gewählt. In der Praxis werden die Veredlungen meist im August durchgeführt. Zu klären war, ob sich die Pflanzen zu beiden Veredlungszeitpunkten gleichförmig verhalten. Unterschiede aufgrund des Veredlungszeitpunkts gab es nur in der Hinsicht, dass bei Veredlungen im Sommer die hypersensible Reaktion meist in die nächste Vegetationsperiode verschoben war. Bei den im Frühjahr veredelten Pflanzen war innerhalb einer Vegetationsperiode der Großteil der Pflanzen aufgrund der hypersensiblen Reaktion abgestorben.

4.4.1.2. Verhalten von PPV-infizierten Sorten bei Veredlung auf hypersensible Unterlagen (Experimente 1 und 2)

Zur Untersuchung der Reaktion PPV-infizierter Sorten bei Veredlung auf hypersensible Unterlagen wurden Sorten unter folgenden Gesichtspunkten ausgewählt: anfällige, empfindliche Sorten wie 'Hauszwetsche' und 'Cacaks Fruchtbare' sowie anfällige, fruchttolerante Sorten wie 'Katinka' und 'Hanita' und außerdem die quantitativ resistente Sorte 'Cacaks Beste' und der quantitativ resistente Zuchtklon 'Hoh 2043'. Diese breit angelegte Untersuchung sollte zum einen ausschließen, dass die hypersensible Reaktion sortenabhängig ist, und zum anderen mögliche Unterschiede im Verhalten der Sortentypen dokumentieren.

Die PPV-infizierten, anfälligen Sorten zeigten bei Veredlung auf die hypersensiblen Unterlagen meistens eine gleichartige Reaktion: Es kam bei einem Teil der Pflanzen zu einer sofortigen Abstoßungsreaktion der hypersensiblen Unterlage gegenüber dem veredelten, PPV-infizierten Rindenspan (Experiment 1: 25%, Experiment 2: 67%) oder zu einem kurzen Austreiben der Edelsorte vor der Absterbereaktion (Experiment 1: 67 %, Experiment 2: 34%). Die unterschiedlichen Prozentzahlen für Experiment 1 und 2 ergeben sich dadurch, dass der Veredlungszeitpunkt von Experiment 1 im Frühjahr (Februar) war und die erste Bonitur in derselben Vegetationsperiode im Juni durchgeführt wurde. Die Veredlung von Experiment 2 wurde im Sommer (August/September) durchgeführt und die erste Bonitur fand erst in der darauffolgenden Vegetationsperiode im Januar bzw. März statt. Ein kleinerer Teil der Sortenaustriebe starb erst nach einer Wachstumsperiode mit starker Symptomausprägung ab (Experiment 1: 9%, Experiment 2: 7%). Bei den anfälligen, PPV-infizierten Sorten, veredelt auf den hypersensiblen Unterlagen, konnten alle möglichen Symptome einer HR, wie es von Neumüller (2005) bei hypersensiblen Sorten nach Veredlung auf PPV-infizierte Unterlagen beschrieben wurde, beobachtet werden. Diese schnell eintretende Reaktion lässt sich durch die hohe Viruskonzentration in den anfälligen Sorten (Hartmann 2001) begründen.

Eine Ausnahme stellt die anfällige Sorte 'Hanita' dar, bei der die Edelsortenaustriebe durchschnittlich deutlich später abstarben als bei den anfälligen Sorten 'Hauszwetsche', 'Cacaks Fruchtbare' sowie 'Katinka', und außerdem wenige bis keine PPV-Symptome hatte. Hartmann et al. (2006) stufen diese Sorte als „tolerant“ ein, mit wenig Blatt- und keinen Fruchtsymptomen, womit die vorliegenden Ergebnisse in der Reaktion der Sorte übereinstimmen. Jedoch entspricht die verzögerte Absterbereaktion, im Vergleich mit den anderen anfälligen Sorten, eher der Reaktion der quantitativ resistenten Sorten ('Cacaks Beste' und Zuchtklon 'Hoh 2043'). Quantitativ resistente Sorten zeigen meist keine ausgeprägte Symptomausprägung, die Viruskonzentration in den Pflanzen ist geringer und außerdem ist das Virus ungleich in der Pflanze verteilt (Kegler 1992, Hartmann 2006). Bei diesen kam die hypersensible Absterbereaktion, im Vergleich mit den anfälligen Sorten, verzögert zur Ausprägung, und sie zeigten schwache bis keine Symptome. Die Virusverbreitung in der Pflanze erfolgt nach

einer Replikationsphase von Zelle zu Zelle über Plasmodesmata und über längere Distanzen über das Phloem (Lucas 2006). Die verzögerte Reaktion der quantitativ resistenten Sorten kann dadurch erklärt werden, dass bei quantitativer Resistenz die Virusreplikation und -verbreitung vermindert ist (Kegler et al. 1998), und so die Viruskonzentration im veredelten Rindenspan zu gering war, um eine sofortige hypersensible Reaktion auszulösen, wie es bei den anfälligen Sorten passierte. Beim Nachweis des Virus in den Pflanzen stellte sich heraus, dass es bei einem Teil der quantitativ resistenten Sorten nicht nachgewiesen werden konnte (Experiment 1: 10%, Experiment 2: 15%). Manche der Pflanzen zeigten auch bei wiederholten Tests keinen Hinweis auf eine PPV-Infektion. Bei diesen muss angenommen werden, dass aufgrund der Ungleichverteilung des Virus in der Pflanze, Rindenspäne veredelt wurden, welche das Scharkavirus nicht enthielten. Kegler et al. (1991) beschrieben, dass der Anteil von PPV-freien Knospen, um so größer ist, je stärker die quantitative Resistenz einer Pflanze ist. Unter diesem Gesichtspunkt wäre es hilfreich gewesen, keine Rindenspäne, sondern ganze Edelreiser zu veredeln. Anfänglich wurde eine Vergleichsveredlung gemacht von Spanveredlung und Kopulation. Allerdings wurden die beiden Methoden nur bei der anfälligen Sorte 'Katinka' untersucht, wobei es keine Unterschiede hinsichtlich der Reaktion der Pflanzen gab. Bei den quantitativ resistenten Sorten, könnte der Einsatz einer Veredlungsmethode, bei der ein größeres Inokulum gesetzt wird, verhindern, dass sich kein Virus im Inokulum befindet. Da aber in der Praxis fast nur Rindenspäne verwendet werden, wurden die Versuche mit dieser Veredlungsmethode durchgeführt.

Die Pflanzen aus Experiment 1, bei welchen der Edelsortenaustrieb nicht abstarb, wurden über drei Vegetationsperioden beobachtet. Bei einigen der quantitativ resistenten Edelsortenaustriebe ergab der PPV-Nachweis zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Ergebnisse. Durch das Fehlen von Symptomen ist die Probennahme bei diesen Sorten schwierig, und es kann nicht immer gewährleistet werden, dass Proben genommen werden, in welchen sich Viruspartikel befinden. Generell ist die Bewertung von quantitativ resistenten Sorten schwierig, da sich die Ausprägung der hypersensiblen Reaktion innerhalb der Sorte je nach Standort oder Vegetationsperiode unterscheiden kann (Hartmann 1998).

In allen Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass die PPV-infizierten Sorten bei Veredlung auf hypersensible Unterlagen eine hypersensible Reaktion einleiten. Der Unterschied in der Reaktion bestand lediglich in der Schnelligkeit der Ausprägung der hypersensiblen Reaktion.

Neben den Sorten von *Prunus domestica* wurde in Experiment 2 auch jeweils eine Pfirsichsorte ('Rubira') und eine Aprikosensorte ('Canino') getestet. Dabei wurden diese beiden PPV-infizierten Sorten ebenfalls auf die hypersensiblen Unterlagen veredelt und geprüft, ob die hypersensible Absterbereaktion von der Unterlage ausgehend stattfindet. An den Aus-

trieben der Aprikosensorte 'Canino' war, ähnlich den PPV-anfälligen, empfindlichen Sorten, eine Absterbereaktion durch Abstoßung der Rindenspäne oder nach kurzer Wachstumsperiode mit starker Symptomausprägung sichtbar. Die Edelsortenaustriebe von 'Rubira' reagierten ähnlich, mit einer meist sehr schnellen Absterbereaktion und starker Symptomausprägung. Bei einigen der veredelten 'Rubira' zeigte sich keine hypersensible Reaktion. Bei diesen Pflanzen konnte in der ersten Vegetationsperiode PPV nicht nachgewiesen werden und in der zweiten Vegetationsperiode nur in sehr geringer Konzentration. Ab der 3. Vegetationsperiode war in wiederholten Tests und mit unterschiedlichen Nachweismethoden kein mehr PPV detektierbar. Bei diesen Pflanzen war möglicherweise die Viruskonzentration zu gering um eine hypersensible Reaktion hervorzurufen. Dieser Test zeigt, dass grundsätzlich die Verwendung der hypersensiblen Unterlagen auch für andere *Prunus*-Arten möglich ist. Um allerdings genauere Aussagen dazu treffen zu können, müssen weitere derartige Experimente mit verschiedenen in der Praxis eingesetzten Sorten unternommen werden.

4.4.1.3. Verhalten von hypersensiblen Unterlagen bei Inokulation mit PPV (Experimente 1 bis 4)

Die Reaktion der hypersensiblen Unterlagen bei Veredlung mit PPV-infizierten Sorten zeigte sich auf zwei verschiedene Arten: entweder starb die Unterlage zeitgleich bzw. meistens zeitlich etwas verzögert zur Edelsorte ab oder die Unterlage wuchs ohne nachweisbare PPV-Infektion nach Absterben der Edelsorte weiter. PPV konnte in hypersensiblen Pflanzen nur in der Absterbephase nachgewiesen werden. Die Auswirkung einer PPV-Infektion auf den hypersensiblen Genotyp und die Ausprägungsstärke der HR hängt von der Infektionsdosis, aber vor allem auch von der Größe der Pflanze bzw. des Baumes ab (Hartmann 2002). So zeigte sich in Experiment 1, dass in der 3. Vegetationsperiode nach Absterben der PPV-infizierten Edelsorte ausschließlich Unterlagen unbeschädigt weiterwuchsen, welche mit quantitativ resistenten Sorten oder der Sorte 'Hanita' veredelt waren ('Cacaks Beste': 6%, 'Hoh 2043': 3% und 'Hanita': 11%). In diesem Fall reagierte die hypersensible Unterlage nach Veredlung der PPV-infizierten Sorte, in welcher das Virus nur in geringer Konzentration vorherrscht, mit einzelnen hypersensiblen Reaktionen um die Veredlungsstelle. Nach Lokalisierung der Infektion und Absterben der Edelsorte wuchs die Unterlage ungehindert weiter.

Die verschiedenen, hypersensiblen 'Docera'- und 'Dospina'-Zuchtklone zeigten im Einsatz als Unterlagen größtenteils keine Unterschiede. Außer der Zuchtklon 'Docera 262', bei welchem im Vergleich zu den anderen Unterlagen viele Austriebe der anfälligen Sorten ('Katinaka' oder 'Elena') mit deutlich sichtbaren Symptomen wuchsen und die hypersensible Reaktion verzögert eintrat. In Experiment 3 starben 61% der Edelsortenaustriebe veredelt auf 'Docera 262' erst im Laufe der zweiten Vegetationsperiode ab. Bei keiner der Pflanzen kam es zur Durchbrechung der Hypersensibilitätsresistenz.

4.4.2. Verhalten von hypersensiblen Pflanzen bei Inokulation mit verschiedenen PPV-Stämmen und –Isolaten (Experimente 5 und 6)

In Experiment 5 wurden ‘Docera 5’ und ‘Jojo’ mit der Edelsorte ‘Katinka’, welche mit unterschiedlichen Virusisolaten der PPV-Stämme D und M infiziert waren, veredelt. Sowohl die auf ‘Jojo’, als auch auf ‘Docera 5’ veredelten Sorten reagierten mit einer hypersensiblen Reaktion unabhängig vom Virusisolat. Für die Sorte ‘Jojo’ konnte bisher mehrfach bestätigt werden, dass die HR durch verschiedene Isolate ausgelöst wird (Petruschke et al. 1999, Grüntzig et al. 2001, Neumüller 2005). Unterschiedliche Reaktionen gab es bezüglich der Schnelligkeit des Eintretens der HR. Allgemein reagierten die auf ‘Jojo’ veredelten Sorten schneller und stärker mit Absterbeerscheinungen, als die auf ‘Docera 5’ veredelten Sorten. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Hypersensibilitätsresistenz bei ‘Jojo’ stärker ausgeprägt ist, als bei ‘Docera 5’.

Zudem wurde das Verhalten von zweijährigen, hypersensiblen Pflanzen (‘Docera 6’) bei Inokulation mit unterschiedlichen PPV-Isolaten untersucht (Experiment 6). Gegenüber allen Virusisolaten (sieben Isolate der Stämme M, Rec und EA) reagierten die Pflanze mit einer hypersensiblen Reaktion. Auch hier zeigten sich keine auffälligen Unterschiede in der Reaktion auf die verschiedenen Virusisolate, was die Ergebnisse des Experiments 5 bestätigt. Die Ausprägung der hypersensiblen Reaktion war gegenüber allen verwendeten PPV-Stämmen und –Isolaten stabil.

4.4.3. Verhalten von mehrjährigen, hypersensiblen Pflanzen bei Inokulation mit PPV (Experimente 6 und 7)

Zweijährige, hypersensiblen ‘Docera 6’ wurden mit verschiedenen PPV-Isolaten inokuliert (Experiment 6). Die Inokulation wurde im Sommer 2010 durchgeführt und in der darauffolgenden Vegetationsperiode zeigte sich, dass es zur Abstoßungsreaktion der eingesetzten Rindenspäne kam und sich zum Teil starke Rindennekrosen um die Infektionsstelle bildeten. Nur vereinzelt fanden in Pflanzenteilen nahe der Inokulationsstelle Absterbereaktionen statt. Bei einigen der Pflanzen konnte bei jeweils einem von mehreren Tests in der Vegetationsperiode PPV nachgewiesen werden. Dies war ausschließlich in Pflanzenteilen nahe der Inokulationsstelle möglich. Bei keiner der Pflanzen konnte der PPV-Nachweis wiederholt erbracht werden. Das Virus blieb in den Pflanzen lokalisiert und führte zu keiner weiteren Beeinträchtigung der Pflanze. Lediglich eine der Pflanzen, bei welcher auch PPV detektiert werden konnte, starb komplett ab.

Der hypersensible Zuchtklon 'Hoh 4571', welcher bei Neumüller (2005) als hypersensibel eingestuft wird (Hypersensibilitätsklasse 3) generierte bei der Verwendung als Unterlage in den veredelten Sorten keine hypersensible Reaktion (Experiment 7). Keine der veredelten, anfälligen Sorten reagierte bei PPV-Inokulation hypersensibel. Es kam zur Ausprägung von PPV-Symptomen, und PPV konnte in allen Edelsorten nachgewiesen werden. Nur bei Kombination des hypersensiblen Zuchtklons 'Hoh 4571' mit einem hypersensiblen Zuchtklon ('Hoh 4517') blieben die Pflanzen befallsfrei, die Infektion blieb entweder lokalisiert oder es kam zum Absterben der kompletten Pflanze. In diesem Experiment wurde außerdem die hypersensible Sorte 'Jojo' als Unterlage veredelt mit der anfälligen Edelsorte 'Hauszwetsche, Typ Schüfer' untersucht. Nach PPV-Inokulation der Edelsorten starben die Pflanzen komplett ab. Erklärt werden kann dies dadurch, dass die Scharkaresistenz des Zuchtklons 'Hoh 4571' nicht so stark ausgeprägt ist, wie es bei der Sorte 'Jojo' der Fall ist, und somit kam bei PPV-Inokulation der anfälligen Edelsorten veredelt auf 'Hoh 4571' nicht zur Ausprägung einer hypersensiblen Reaktion.

4.4.1. Virusverbreitung in Pflanzen mit hypersensiblen Veredlungspartner (Experiment 8)

Zur Untersuchung der Virusverbreitung wurden doppelveredelte Pflanzen mit jeweils einem hypersensiblen Veredlungspartner (Zwischenveredlung oder Edelsorte) an verschiedenen Stellen (Edelsorte, Zwischenveredlung oder Unterlage) mit PPV mittels Rindenspänen inokuliert. Als Unterlagen wurden anfällige Sorten und als weitere Veredlungspartner anfällige oder quantitativ resistente Sorten verwendet.

Die PPV-Infektion einer anfälligen Sorte (unabhängig ob Edelsorte oder Zwischenveredlung) hatte zur Folge, dass der hypersensible Veredlungspartner nach anfänglichem, vereinzeltem Triebabsterben, komplett abstarb. Das Virus konnte sich bei Erstinfektion der anfälligen Sorte schnell vermehren, um das komplette Absterben des hypersensiblen Teils der Pflanze zu verursachen. Bei Infektion des hypersensiblen Veredlungspartners dagegen starben nur vereinzelte Pflanzen komplett ab, meistens zeigte sich nach anfänglichem Absterben von einzelnen Trieben, dass der hypersensible Teil neue Austriebe zeigte ohne erkennbare Absterbereaktionen. In diesen Fällen blieb die PPV-Infektion lokalisiert und es fand kein Virustransport in die anfälligen Veredlungspartner statt.

Unabhängig von der Veredlungsvariante war der Virustransport ausgehend von der Edelsorte in die Unterlage möglich und auch umgekehrt, von der Unterlage in die Edelsorte. Das Virus wurde auch ausgehend von der Zwischenveredlung in die Edelsorte und in die Unterlage transportiert. Das Vorhandensein eines hypersensiblen Teils spielte dabei keine Rolle.

Auch Neumüller (2005) berichtete davon, dass bei PPV-Inokulation von 'Jojo' an den Unterlagen PPV-Symptome beobachtet werden konnten. Der hypersensible Genotyp reagierte anfangs mit dem Absterben vereinzelter Triebe bis zum kompletten Absterben des hypersensiblen Pflanzenteils. Das anfängliche Triebsterben war in diesen Fällen nicht auf Triebe nahe der Inokulationsstelle begrenzt, sondern zeigte sich auch an entfernter liegenden Sprossen. Sofern die hypersensible Zwischenveredlung abgestorben war, starb auch die Edelsorte ab.

Sowohl bei PPV-Inokulation der Unterlage, als auch bei Inokulation der Zwischenveredlung oder des Edelreises war das Virus in allen anfälligen Veredlungspartnern nachweisbar. Bei Inokulation einer anfälligen Edelsorte war zeigten sich an den Austrieben der anfälligen Unterlage schneller PPV-Symptome (nach ca. einem Jahr), als in der anfälligen Edelsorte bei Inokulation der Unterlage (erst nach ca. 2,5 Jahren). Der Virustransport vom Edelreis in die Unterlage geschieht über das Phloem, umgekehrt von der Unterlage in das Edelreis über das Xylem. Auch Rubio et al. (2008) zeigten, dass der PPV-Transport in *Prunus*-Pflanzen sowohl über das Xylem, als auch über das Phloem passieren kann. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene verzögerte Virusausbreitung bei PPV-Inokulation des Edelreises basiert auf dem Verhalten von wenigen Pflanzen und muss durch weitere Untersuchungen überprüft werden.

Der Einsatz einer quantitativ resistenten Edelsorte zeigt im Vergleich zu einer anfälligen Edelsorte bei Inokulation in die Edelsorte eine verzögerte Symptomausprägung bei der hypersensiblen Zwischenveredlung und der Unterlage. Ähnlich wie in den Experimenten, in welchen das Verhalten von PPV-infizierten, quantitativ resistenten Edelsorten bei Veredlung auf hypersensible Unterlagen untersucht wurde (Experiment 1 und 2), trat die Absterbereaktion der quantitativ resistenten Sorten, welche auf eine hypersensible Zwischenveredlung veredelt waren, später ein als bei den anfälligen Sorten, und es kam zu keiner oder einer nur schwachen Symptomentwicklung. Begründet werden kann dies dadurch, dass die Virusvermehrung in der quantitativ resistenten Sorte vermindert ist und so die Viruskonzentration und auch die Virusausbreitung geringer sind. PPV konnte in den symptomfreien Blättern der quantitativ resistenten Sorte nachgewiesen werden. Bei allen Veredlungsvarianten konnte jeweils im hypersensiblen Teil der Pflanze kein PPV detektiert werden. Teilweise wurde in abgestorbenem Pflanzenmaterial (Blätter oder Rinde) mittels Blue LAMP PPV nachgewiesen.

4.4.2. Versuche im Freiland unter natürlichem PPV-Infektionsdruck (Experimente 9 und 10)

In zwei Feldversuchen wurden hypersensible Unterlagen unter natürlichem PPV-Infektionsdruck getestet. Durchgeführt wurden die Experimente in den Scharkaversuchsanlagen in der Weil der Stadt (LTZ Augustenberg) und in Oppenheim (DLR). In Weil der Stadt war der PPV-Infektionsdruck durch künstlich infizierte Zwetschenbäume, welche in der Anlage gepflanzt waren, gegeben. Ebenso in Oppenheim, hier waren zehnjährige, PPV-infizierte Zwetschenbäume direkt neben den Versuchspflanzen gepflanzt. Zudem wurde das Experiment in Oppenheim mit einer sehr großen Anzahl an Pflanzen und verschiedenen Sorte-Unterlagenkombinationen durchgeführt. In Weil der Stadt wurden die Pflanzen über zwei Jahre beobachtet und jährlich auf PPV getestet. Es konnte keine Scharkainfektion der Bäume festgestellt werden.

In der Scharkaversuchsanlage in Oppenheim (DLR) wurde neben den hypersensiblen Unterlagen auch die anfällige Unterlage 'Weiwa[®]' ausgepflanzt, welche entweder mit anfälligen, mit hypersensiblen oder mit quantitativ resistenten Sorten veredelt wurde. Die randomisierte Pflanzung der Bäume stellte sicher, dass für die verschiedenen Unterlagen vergleichbare Entfernungen zur PPV-Infektionsquelle vorhanden waren. In allen Mischproben der verschiedenen Sorten-Unterlagen-Kombinationen fanden sich entweder bei den Edelsorten oder bei den Unterlagen PPV-positive Proben. Die Infektionsrate der Sorten, war bei Pflanzen mit der PPV anfälligen Unterlage 'Weiwa[®]' jedoch deutlich höher (50% der *bulks* PPV-infiziert), als bei Pflanzen mit einer hypersensiblen Unterlage (max. 15% der *bulks* PPV-infiziert).

Auch in einigen der Unterlagen konnte PPV nachgewiesen werden. Die Infektionsrate war auch hier am höchsten bei der hypersensiblen Unterlage 'Dospina 20' (17%), gefolgt von der anfälligen Unterlage 'Weiwa[®]' (7%). Die hypersensiblen Unterlagen der 'Docera'-Gruppe zeigten eine niedrigere Infektionsrate als die der 'Dospina'-Gruppe. Von 'Dospina 22' waren vier Mischproben (3%), von 'Dospina 20' neun Mischproben (17%) der Unterlagen infiziert. Von den getesteten 'Docera'-Unterlagen waren jeweils nur eine oder zwei Mischproben infiziert (max. 1%). In einzelnen Mischproben der hypersensiblen Unterlagenaustriebe (2%) war PPV nachweisbar ohne Infektion der zugehörigen Mischproben der Edelsorten. Es ist wahrscheinlich, dass die Probennahme kurz vor dem Absterben der einzelnen Pflanzenteile der hypersensiblen Unterlagen stattgefunden hat. Zu diesem Zeitpunkt war es -wie auch in den bereits beschriebenen Experimenten dargestellt- möglich, in den hypersensiblen Genotypen PPV nachzuweisen. Solche Infektionen blieben allerdings lokalisiert und beeinträchtigten die Entwicklung der Edelsorte nicht. In folgenden Tests werden diese Infektionen nicht mehr nachweisbar sein.

Die hypersensible Unterlage 'Docera 6' wurde im Rahmen des von der EU finanzierten Forschungsprojektes SharCo in Freilandversuchen in sechs verschiedenen Ländern untersucht. Dabei blieb sie über vier Jahre lang befallsfrei, was zeigt, dass eine systemische Infektion der Unterlage unter natürlichen Bedingungen nicht möglich zu sein scheint.

Für eine umfassendere Bewertung dieses Versuches bedarf es einer längeren Beobachtung und Testung der Pflanzen. Die beiden Versuche in Weil der Stadt und in Oppenheim werden weiterhin beobachtet und geprüft.

4.4.3. Histologische Untersuchung der Veredlungsstelle

Gemäß der makroskopisch festgestellten Ereignisse bei PPV-Infektion eines hypersensiblen Genotypen mittels Rindenspaninokulation, wie Nekrotisierung des infizierten Gewebes und Abstoßung von PPV-infizierten Rindenspänen, konnten diese Reaktionen auch bei der mikroskopischen Untersuchung von Veredlungsstellen gemacht werden. Die Veredlungsstelle zwischen einer hypersensiblen Unterlage und einer anfälligen, PPV-infizierten Sorte wurde bei Veredlung mittels Rindenspänen und mittels Spaltpropfung mikroskopisch untersucht. Es zeigte sich nach anfänglicher Verwachsung mit Ausbildung von undifferenziertem Gewebe im Veredlungsspalt, eine beginnende Nekrotisierung des Gewebes bis hin zur Abstoßung des Rindenspans. Das in den weiteren Versuchen oft festgestellte sofortige Absterben des infizierten Rindenspans, konnte nicht gezeigt werden. Dazu können zwei mögliche Begründungen angeführt werden:

1. Proben mit einer unmittelbaren, hypersensiblen Reaktion auf die PPV-Infektion führten zu keiner stabilen Verwachsung des Rindenspans, und somit kann keine stabile Einheit zwischen den Veredlungspartnern gebildet werden, um zu histologischen Präparaten verarbeitet werden zu können. Wie beschrieben wurden einige der Proben nicht zu Präparaten weiterverarbeitet, da die Rindenspäne nicht stabil verwachsen waren. Dies zeigte sich vor allem bei Proben, welche kurz nach Veredlung genommen wurden, aber auch zu späteren Zeitpunkten.
2. Neumüller beschreibt bei einer ähnlichen Untersuchung, dass er die Beobachtung der hypersensiblen Reaktion durch die Ansammlung von Phenylpropanoiden erst einige Wochen nach der Verwachsung der Veredlungsstelle machen konnte. Er begründet dies damit, dass zuerst eine Verbindung über Plasmodesmata zwischen den Zellen gebildet werden muss, um das Eindringen von Viren in das neu gebildete Gewebe und in den hypersensiblen Genotypen zu gewährleisten. Erst dann kann es zur Ausprägung der hypersensiblen Reaktion kommen (Neumüller 2005).

Vermutlich treffen beide Begründungen zu, da es ohne eine Verbindung zwischen den Veredlungspartnern zu keiner gegenseitigen Reaktion kommen kann, und so erst eine initiale Verwachsung stattfinden muss, um einen Austausch zu gewährleisten.

4.5. ZUSAMMENFASSUNG

Es konnte gezeigt werden, dass hypersensible Unterlagen, welche aus Artkreuzungen zwischen *P. domestica* und *P. cerasifera* ('Docera') oder *P. domestica* und *P. spinosa* ('Dospina') hervorgingen, resistent gegenüber dem Scharkavirus sind. Dies wurde bei künstlicher Infektion und auch in Felduntersuchungen bei natürlichem Infektionsdruck getestet. Bei Veredlung von PPV-infizierten Sorten auf hypersensiblen Unterlagen, starb die Sorte je nach ihrer Anfälligkeit gegenüber dem Virus entweder sofort oder nach kurzer Wachstumsphase ab. Die hypersensible Reaktion zeigte sich unabhängig vom Virusstamm (PPV-M, PPV-D oder PPV-Rec).

Quantitativ resistente Sorten bedingten mit ihrer Eigenschaft der Ungleichverteilung des Virus in der Pflanze und auch der geringeren Viruskonzentration eine verzögerte HR und erschwerten damit und mit einer schwachen Symptomausprägung die frühzeitige Erkennung der Infektion.

Erste Veredlungen von Aprikose und Pfirsich mit hypersensiblen Unterlagen deuteten darauf hin, dass diese ebenfalls bei PPV-Infektion eine Absterbereaktion zeigen, und somit die Einsatzmöglichkeit der hypersensiblen Unterlagen auf weitere *Prunus*-Arten ausgedehnt werden könnte.

In den Felduntersuchungen zeigte der Einsatz von 'Docera'-Zuchtklone ('Docera 5', 'Docera 6' und 'Docera 9') eine deutlich reduzierte Infektionsrate bei den aufveredelten Sorten sowie den Unterlagen gegenüber der Verwendung von anfälligen Unterlagen. Die Versuchspflanzen der Feldtests sind weiterhin unter Beobachtung, um genauere Erkenntnisse zu erhalten, und um die vereinzelt Infektionen an Pflanzen mit hypersensiblen Unterlagen besser deuten zu können.

Die Virusausbreitung in mehrjährigen, veredelten Pflanzen mit einem hypersensiblen Veredlungspartner erfolgte unabhängig von der Inokulationsstelle in allen Pflanzenteilen. In hypersensiblen Pflanzen konnte PPV nicht detektiert werden.

Mittels histologischer Dünnschnittpräparate durch die Veredlungsstelle konnte nach ACN-Färbung die Reaktion zwischen einer hypersensiblen Unterlage und einer PPV-infizierten, veredelten Sorte mikroskopisch betrachtet werden. Dabei wurde nach anfänglicher Bildung von undifferenziertem Gewebe im Veredlungsspalt die Nekrotisierung des Gewebes entlang des Veredlungsspalts bis hin zum Absterben des Rindenspans beobachtet.

5. Zusammenfassung

Die Scharkakrankheit ist die bedeutendste Virose des Steinobsts, durch welche große Schäden beim Anbau der Europäischen Pflaume entstehen. Quarantänemaßnahmen und die Verwendung von zertifiziertem, gesundem Pflanzmaterial helfen Anlagen befallsfrei zu halten bzw. die Verbreitung der Virose einzuschränken. Diese Maßnahmen können die Krankheit allerdings nicht vollständig beseitigen. Der Einsatz von vollständig resistenten Sorten und Unterlagen ist eine effiziente Maßnahme der Virose entgegenzuwirken, da sich nur bei dieser Art der Resistenz das Virus nicht in der Pflanze vermehren kann und so keine latent infizierten Pflanzen entstehen können. Die Hypersensibilitätsresistenz der Europäischen Pflaume gegenüber dem Scharkavirus ist derzeit die einzig vorhandene Art der Resistenz, welche sich in bisherigen Untersuchungen stabil gezeigt hat und mit welcher Sorten entwickelt werden können, die den Anforderungen der obstbaulichen Praxis entsprechen. Für die Nutzung der Hypersensibilitätsresistenz in der Sortenzüchtung ist es wichtig, resistente Zuchtklone effizient zu selektieren, die Stabilität der Resistenz sicherzustellen und außer Sorte auch Unterlage mit Hypersensibilitätsresistenz nutzbar zu machen.

Um die Selektion von hypersensibel resistenten Zuchtklonen für die Sortenzüchtung bei der Europäischen Pflaume zu optimieren und zu beschleunigen, sollten molekulare Marker gefunden werden, welche mit der Hypersensibilitätsresistenz gegenüber PPV eindeutig korrelieren, um diese zur markergestützten Selektion einsetzen zu können. Der Ursprung der Hypersensibilitätsresistenz wurde in der Sorte 'Ortenauer' nachgewiesen. So wurde mit der Nachkommenschaft der Kreuzungskombination 'Ortenauer' × 'Stanley', welche in hypersensibel resistente und anfällige Nachkommen aufspaltet, eine SSR Marker-Analyse durchgeführt. Dazu wurden 127 bereits bekannte SSRs aus verwandten *Prunus*-Arten ausgewählt und darauf geachtet, dass diese verteilt über das *Prunus* Referenz-Genom liegen. Es zeigte sich, dass die Verwendung von in verschiedenen *Prunus*-Spezies generierten SSR Markern in der Europäischen Pflaume problemlos möglich ist. 69% der getesteten SSRs waren polymorph, es konnte keine Marker identifiziert werden, welche hinreichend mit der Hypersensibilitätsresistenz korrelierten.

Über den Resistenzmechanismus, der der Hypersensibilitätsreaktion bei der Europäischen Pflaume gegenüber dem Scharkavirus zugrunde liegt, ist wenig bekannt. Eine eingehendere Untersuchung dieses Mechanismus kann durch die Identifizierung der Resistenz-auslösenden Proteine des Scharkavirus geschehen. Bei Kenntnis des Auslösers der Hypersensiblen Reaktion können Rückschlüsse auf die korrespondierenden Gensequenzen in der Pflanze gezogen werden. Verschiedene cDNA-Konstrukte, welche chimärenartig aus einem infektiösen und einem nicht infektiösen PPV-Isolat unter gegenseitigem Austausch der P1HCpro- bzw. der CP-Sequenz gebildet wurden, wurden zur Inokulation von hypersensiblen und anfälligen In-vitro-Pflanzen der Europäischen Pflaume verwendet. Dazu wurde eine Infektionsmethodik mit einer ausreichend hohen Infektionsrate entwickelt, bei welcher die biolistische Inokulation mit der In-vitro-Veredlung kombiniert wurde. Erste Ergebnisse scheinen vielversprechend für verschiedene Fragestellungen zur Ausprägung einer systemischen oder transienten Infektion bei hypersensiblen Genotypen. Weitergehende Untersuchungen dazu werden am *Centro Nacional de Biotecnología-CSIC* in Madrid, in den Laboren von Juan-Antonio García vorgenommen.

Alle derzeit erhältlichen Unterlagen, welche für die Europäische Pflaume verwendet werden, sind anfällig gegenüber dem Scharkavirus. Auch Unterlagen können von Blattläusen oder bei der Vermehrung aus latent infiziertem Pflanzmaterial infiziert werden. So ist die Züchtung von scharkaresistenten Unterlagen ebenso wichtig, wie die Züchtung von resistenten Edelsorten. Bei Veredlung eines hypersensibel resistenten Edelreises auf eine scharkainfizierte Unterlage, wird das Edelreis abgestoßen und es stirbt ab. Die Überlegung war, ob ein PPV-infiziertes Edelreis bei Veredlung auf eine hypersensibel resistente Unterlage ebenfalls durch die hypersensible Reaktion der Unterlage abgestoßen wird und abstirbt. In Hinblick darauf wurden verschiedene hypersensibel resistente Unterlagen, welche aus Artkreuzungen zwischen *Prunus domestica* und *Prunus cerasifera* ('Docera') oder *Prunus domestica* und *Prunus spinosa* ('Dospina') hervorgingen, bei künstlicher PPV-Inokulation durch Veredlung und auch in Felduntersuchungen unter natürlichem Infektionsdruck getestet. Bei Veredlung von PPV-infizierten Sorten auf hypersensiblen Unterlagen, starb die Sorte je nach ihrer Anfälligkeit gegenüber dem Virus entweder sofort oder nach kurzer Wachstumsphase ab. Die hypersensible Reaktion zeigte sich unabhängig vom Virusstamm (PPV-M, PPV-D oder PPV-Rec). Erste Veredlungen von Aprikose und Pfirsich mit hypersensiblen Unterlagen deuteten darauf hin, dass diese ebenfalls bei PPV-Infektion eine Absterbereaktion zeigen, und somit die Einsatzmöglichkeit der hypersensiblen Unterlagen auf weitere *Prunus*-Arten ausgedehnt werden könnte. Quantitativ resistenten Edelsorten veredelt auf hypersensibel resistente Unterlagen reagierten mit einer verzögerten HR, und erschwerten damit und mit einer schwachen Symptomausprägung die frühzeitige Erkennung der Infektion. Die Veredlung von einer

hypersensiblen Unterlage mit einem hypersensiblen Edelreis zeigte sich als sicherste Kombination um der Virusausbreitung entgegenzuwirken.

6. Summary

The sharka disease is the most significant virosis of stone fruits which causes severe damages in the cultivation of the European plum. Quarantine procedures and the utilization of certified, healthy plant material help to keep nurseries free from parasites and to restrict the distribution of the virus. Unfortunately, these procedures cannot completely eliminate the disease. The use of totally resistant cultivars and rootstocks is an efficient method to antagonize the sharka disease: in plants with this kind of resistance the virus is not able to replicate and therefore latent infections do not occur. Currently, the hypersensitivity resistance of the European plum against the Plum pox virus is the only existing resistance which seems to be stable and can be used for developing cultivars conforming to the demands of fruit-growing practice. In order to use hypersensitivity resistance in breeding, it is important that resistant cultivars can be selected more effectively and that this resistance is stable. In addition to resistant cultivars, hypersensitive resistant rootstocks should be developed.

To optimize and accelerate the selection of hypersensitive resistant cultivars for the breeding of European plum, molecular markers which definitely correlate with the hypersensitivity resistance against PPV should be found in order to enable marker assisted selection. The origin of the hypersensitivity resistance was demonstrated in the cultivar 'Ortenauer'. The progeny of the crossing combination of 'Ortenauer' × 'Stanley', which segregates in hypersensitive resistant and susceptible descendants, was put for a SSR analysis. 127 SSRs segregating in related *Prunus* species were chosen and during this selection special attention was paid to a regular distribution of the SSRs over the *Prunus* reference genome. The use of SSRs generated in different *Prunus* species was possible without any difficulties. 69% of all tested SSRs were polymorphic. There was no marker which correlated with the hypersensitivity resistance.

The hypersensitive response mechanism of the European plum against the Plum pox virus is little-known. An intense investigation of this mechanism can be performed by the identification of resistance-activating proteins from the Plum pox virus. Knowing the elicitor of the hypersensitive response can facilitate making conclusions about the corresponding gene sequences in the plant. Different cDNA constructs, which were made up of an infectious and a

non infectious PPV-isolate (exchange of the sequences P1HCpro or CP) in a chimera-like fashion, were used for inoculation of hypersensitive and susceptible in vitro plants of the European plum. A methodology of infection with a high infection rate was developed: the biolistic inoculation was combined with in-vitro grafting. The first results seem to be promising for varying questions of the development of a systemic or transient infection in hypersensitive genotypes. Further experiments were carried out in the laboratories of Juan-Antonio García at the *Centro Nacional de Biotecnología-CSIC* in Madrid.

All currently available rootstocks, which are used for European plum are susceptible against the Plum pox virus. Rootstocks can also get infected by aphids or by propagation from latent infected plant material. Therefore, not only is the breeding of sharka resistant rootstocks important but also that of resistant cultivars. By grafting of a hypersensitive scion on a sharka infected rootstock, the scion is rejected and it dies off. It has to be settled whether or not a PPV infected scion would also be rejected and die off, if it were grafted on a hypersensitive resistant rootstock. In this aspect, the reaction of different hypersensitive resistant rootstocks (crossing combinations *Prunus domestica* x *Prunus cersifera* ('Docera') or *Prunus domestica* x *Prunus spinosa* ('Dospina')) was tested with PPV inoculation by grafting and also in field conditions with natural PPV infection pressure. If grafting a PPV infected cultivar on a hypersensitive resistant rootstock, the cultivar dies off immediately or after a short growing period, which was dependent on its susceptibility to PPV. The hypersensitive reaction was independent of the virus strain (PPV-M, PPV-D or PPV-Rec). First graftings of apricot (*Prunus armeniaca*) and peach (*Prunus persica*) on hypersensitive resistant rootstocks indicate that these species also show reactions of dying off, and therefore, hypersensitive resistant rootstocks could also be used for further *Prunus* species. Quantitatively resistant cultivars grafted on hypersensitive resistant rootstocks showed a delayed Hypersensitivity Response, and in combination with weak symptoms they complicated the early detection of an infection. The grafting of a hypersensitive resistant rootstock with a hypersensitive resistant scion seemed to be the best combination to avoid the distribution of PPV.

QUELLENVERZEICHNIS

- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell reports*, 27(4), 617–631.
- Aranzana, M. J., García-Mas, J., Carbó, J., & Arús, P. (2002). Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding*, 121(2), 184–184.
- Atanasoff, D. (1935). Mosaik of stone fruits. *Phytopathologische Zeitschrift*, 8, 259–284.
- Badenes, M. L., Hurtado, M. A., Sanz, F., Archelos, D. M., Burgos, L., Egea, J., & Llácer, G. (2000). Searching for molecular markers linked to male sterility and self-compatibility in apricot. *Plant Breeding*, 119, 157–160.
- Becker, H. (2011). *Pflanzenzüchtung* (2. Auflage., pp. 88–89). Stuttgart: Eugen Ulmer.
- Bodin, M., Glasa, M., Verger, D., Costes, E., & Dosba, F. (2003). Distribution of the Sour Cherry isolate of Plum pox virus in infected Prunus rootstocks. *Journal of Phytopathology*, 151(11-12), 625–630.
- Boeglin, M., Quiot, J. B., & Labonne, G. (2004). Risk assessment of contamination of cherry trees by Plum pox virus in France. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 657, 221–224.
- Calvo, M., Dujovny, G., Lucini, C., Ortuño, J., Alamillo, J. M., Simón-Mateo, C., López-Moya, J. J., et al. (2010). Constraints to virus infection in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a potyvirus amplicon. *BMC plant biology*, 10, 139–149.
- Cambra, M., Capote, N., Cambra, M. A., Llácer, G., Botella, P., & López-Quílez, A. (2006). Epidemiology of sharka disease in Spain. *EPPO Bulletin*, 36(2), 271–275.
- Cambra, M., Capote, N., Myrta, A., & Llácer, G. (2006). Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. *EPPO Bulletin*, 36, 202–204.
- Cambra, M., Olmos, A., Capote, N., Africander, N. L., Levy, L., Lenardon, S. L., Clover, G., et al. (2012). International standards for phytosanitary measures - ISPM 27 Diagnostic protocols. *Seventh Session of the Commission on Phytosanitary Measures* (pp. 1–16).
- Cantini, C., Iezzoni, A. F., Lamboy, W. F., Boritzki, M., & Struss, D. (2001). DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(2), 205–209.
- Capote, N., Bertolini, E., Olmos, A., Vidal, E., Martínez, M. C., & Cambra, M. (2009). Direct sample preparation methods for the detection of Plum pox virus by real-time RT-PCR. *International Microbiology*, 12, 1–6.
- Capote, N., Cambra, M. A., Botella, P., Gorris, M. T., Martínez, M. C., López-Quílez, A., & Cambra, M. (2010). Detection, characterization, epidemiology and eradication of Plum pox virus Marcus type in Spain. *Journal of Plant Pathology*, 92(3), 619–628.
- Cipriani, G., Lot, G., Huang, W.-G., Marrazzo, M. T., Peterlunger, E., & Testolin, R. (1999). AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation,

- characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99, 65–72.
- Claverie, M., Bosselut, N., Lecouls, A. C., Voisin, R., Lafargue, B., Poizat, C., Kleinhentz, M., et al. (2004). Location of independent root-knot nematode resistance genes in plum and peach. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(4), 765–773.
- Cooper, J. I., & Jones, A. T. (1983). Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms. *Phytopathology*, 73(2), 127–128.
- Dallot, S., Quiot-Douine, L., Sáenz, P., Cervera, M. T., García, J. A., & Quiot, J.-B. (2001). Identification of Plum pox virus determinants implicated in specific interactions with different *Prunus* spp. *Phytopathology*, 91(2), 159–164.
- Decroocq, V., Favé, M. G., Hagen, L., Bordenave, L., & Decroocq, S. (2003). Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(5), 912–922.
- Decroocq, V., Hagen, L. S., Favé, M.-G., Eyquard, J.-P., & Pierronnet, A. (2004). Microsatellite markers in the hexaploid *Prunus domestica* species and parentage lineage of three European plum cultivars using nuclear and chloroplast simple-sequence repeats. *Molecular Breeding*, 13, 135–142.
- Decroocq, V., Salvador, B., Sicard, O., Glasa, M., Cosson, P., Svanella-Dumas, L., Revers, F., et al. (2009). The determinant of potyvirus ability to overcome the RTM resistance of *Arabidopsis thaliana* maps to the N-terminal region of the coat protein. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 22(10), 1302–1311.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Howad, W., Capdeville, G., Bosselut, N., Claverie, M., Voisin, R., et al. (2004). Microsatellite genetic linkage maps of myrobalan plum and an almond-peach hybrid - location of root-knot nematode resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(4), 827–838.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M.-J., Poizat, C., Zanetto, A., Arús, P., et al. (2002). Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105(1), 127–138.
- Dondini, L., Costa, F., Tataranni, G., Tartarini, S., & Sansavini, S. (2004). Cloning of apricot RGAs (Resistance Gene Analogs) and development of molecular markers associated with Sharka (PPV) resistance. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 79(5), 729–734.
- Dondini, L., Lain, O., Geuna, F., Banfi, R., Gaiotti, F., Tartarini, S., Bassi, D., et al. (2007). Development of a new SSR-based linkage map in apricot and analysis of synteny with existing *Prunus* maps. *Tree Genetics & Genomes*, 3(3), 239–249.
- Dondini, L., Lain, O., Vendramin, V., Rizzo, M., Vivoli, D., Adami, M., Guidarelli, M., et al. (2010). Identification of QTL for resistance to plum pox virus strains M and D in Lito and Harcot apricot cultivars. *Molecular Breeding*, 27(3), 289–299.
- EPPO. (1994). Data sheets on quarantine pests: Plum pox potyvirus (Stand: März 2013). http://www.eppo.int/QUARANTINE/virus/Plum_pox_virus/PPV000_ds.pdf.

- EPPO. (2004). Diagnostic protocols for regulated pests: Plum pox potyvirus. *EPPO Bulletin*, 34, 155–157.
- EPPO. (2012). PQR - EPPO database on quarantine pests (Stand: März 2013). <http://www.eppo.int>.
- Etzold, H. (2002). Simultanfärbung von Pflanzenschnitten mit Fuchsin, Chrysoidin und Astrablau. *Mikrokosmos*, 91, 316–318.
- Fanigliulo, A., Comes, S., & Crescenzi, A. (2004). Evaluation of cherry cultivars for their response to infection by Plum pox virus sweet cherry strain. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 657, 309–320.
- Fanigliulo, A., Comes, S., Maiss, E., Piazzolla, P., & Crescenzi, A. (2003). The complete nucleotide sequence of Plum pox virus isolates from sweet (PPV-SwC) and sour (PPV-SoC) cherry and their taxonomic relationships within the species. *Archives of virology*, 148(11), 2137–2153.
- FAOSTAT. (2011). Food and Agriculture Organization of the United Nations (Stand: März 2013). <http://faostat.fao.org>.
- Fernández-Fernández, M. R., Martínez-Torrecedrada, J. L., Roncal, F., Domínguez, E., & García, J. A. (2002). Identification of immunogenic hot spots within Plum pox potyvirus capsid protein for efficient antigen presentation. *Journal of Virology*, 76(24), 12646–12653.
- Fernández-Fernández, M. R., Mouriño, M., Rivera, J., Rodríguez, F., Plana-Durán, J., & García, J. A. (2001). Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. *Virology*, 280(2), 283–291.
- García, J. A., Lucini, C., García, B., Alamillo, J. M., & López-Moya, J. J. (2006). The use of Plum pox virus as a plant expression vector. *EPPO Bulletin*, 36(2), 341–345.
- GDR. (2009). Gemome Database for Rosaceae (Stand: Januar 2011). <http://www.rosaceae.org>.
- Glasa, M. (2010). *5th SharCo-Meeting (26.04.2010). mündliche Mitteilung*. Antakya-Hatay, Türkei.
- Glasa, M., Malinowski, T., Predajňa, L., Pupola, N., Dekena, D., Michalczyk, L., & Candresse, T. (2011). Sequence variability, recombination analysis, and specific detection of the W strain of Plum pox virus. *Phytopathology*, 101, 980–985.
- Glasa, M., Palkovics, L., Komínek, P., Labonne, G., Pittnerová, S., Kúdela, O., Candresse, T., et al. (2004). Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *Journal of General Virology*, 85, 2671–2681.
- Goytia, E., Fernández-Calvino, L., Martínez-García, B., López-Abella, D., & López-Moya, J. J. (2006). Production of plum pox virus HC-Pro functionally active for aphid transmission in a transient-expression system. *Journal of General Virology*, 87(11), 3413–3423.

- Grüntzig, M., Ernst, I., Herzog, J., Kegler, H., Fischer, M., & Fuchs, E. (2001). Zum Verhalten von *Prunus armeniaca* L. und *P. domestica* L. gegenüber dem Plum pox virus (PPV). *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 34, 435–462.
- Hadersdorfer, J., Neumüller, M., Treutter, D., & Fischer, T. C. (2011). Fast and reliable detection of Plum pox virus in woody host plants using the Blue LAMP protocol. *Annals of Applied Biology*, 159(3), 456–466.
- Hagen, L. S., Chaib, J., Fady, B., Decroocq, V., Bouchet, J. P., Lambert, P., & Audergon, J. M. (2004). Genomic and cDNA microsatellites from apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Molecular Ecology Notes*, 4(4), 742–745.
- Hartmann, W. (1997). Strategy for breeding sharka resistant plums. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 478, 31–38.
- Hartmann, W. (1998). Züchtung scharkaresistenter Pflaumen- und Zwetschensorten. *Erwerbsobstbau*, 40, 8–12.
- Hartmann, W. (2001). Die Bedeutung der Hypersensibilität für die Züchtung scharkaresistenter Pflaumen und Zwetschen. *Erwerbsobstbau*, 43, 125–130.
- Hartmann, W., & Neumüller, M. (2006). Breeding for resistance: breeding for Plum pox virus resistant plums (*Prunus domestica* L.) in Germany. *EPPO Bulletin*, 36, 332–336.
- Howad, W., Yamamoto, T., Dirlwanger, E., Testolin, R., Cosson, P., Cipriani, G., Monforte, A. J., et al. (2005). Mapping with a few plants: using selective mapping for microsatellite saturation of the *Prunus* reference map. *Genetics*, 171(3), 1305–1309.
- Ilardi, V., & Di Nicola-Negri, E. (2011). Genetically engineered resistance to Plum pox virus infection in herbaceous and stone fruit hosts. *GM crops*, 2(1), 24–33.
- Joobeur, T., Periam, N., De Vicente, M. C., King, G. J., & Arús, P. (2000). Development of a second generation linkage map for almond using RAPD and SSR markers. *Genome*, 43(4), 649–655.
- Jung, S., Jiwan, D., Cho, I., Lee, T., Abbott, A., Sosinski, B., & Main, D. (2009). Synteny of *Prunus* and other model plant species. *BMC genomics*, 10, 76–93.
- Kegler, H., Bauer, E., Grüntzig, M., Fuchs, E., Verderevskaia, T. D., & Bivol, T. F. (1985). Nachweis unterschiedlicher Resistenztypen bei Pflaumen gegen das Scharka-Virus (plum pox virus). *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 5, 339–346.
- Kegler, H., Fuchs, E., Grüntzig, M., & Schwarz, S. (1998). Some results of 50 years of research on the resistance to plum pox virus. *Acta Virologica*, 42, 200–215.
- Kegler, H., Grüntzig, M., & Fuchs, E. (1994). A glasshouse test for detecting resistance of plum genotypes to plum pox virus. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 359, 152–158.
- Kegler, H., Grüntzig, M., Fuchs, E., Rankovic, M., & Ehrig, F. (2001). Hypersensitivity of Plum Genotypes to Plum Pox Virus. *Journal of Phytopathology*, 149, 213–218.
- Kegler, H., Grüntzig, M., & Schimanski, H.-H. (1991). Zur Resistenz der Pflaumenhybride K4 und ihrer F1-Nachkommen gegen das Scharka-Virus der Pflaume (plum pox virus). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes (Braunschweig)*, 43, 102–106.

- Kegler, H., Kontzog, H.-G., & Spaar, D. (1993). Charakterisierung der Virusresistenz. In H. Kegler & W. Friedt (Eds.), *Resistenz von Kulturpflanzen gegen pflanzenpathogene Viren* (pp. 55–155). Jena: Gustav Fischer Verlag.
- Kikkert, J. R. (1993). The Biolistic® PDS-1000/He device. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33(3), 221–226.
- Krczal, H., & Kunze, L. (1972). Untersuchungen zur Übertragung des Scharkavirus durch Blattläuse. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem*, 144, 71–84.
- Lalli, D. A., Decroocq, V., Blenda, A. V., Schurdi-Levraud, V., Garay, L., Le Gall, O., Damsteegt, V., et al. (2005). Identification and mapping of resistance gene analogs (RGAs) in *Prunus*: a resistance map for *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(8), 1504–1513.
- Lefort, F., & Douglas, G. C. (1999). An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annals of Forest Science*, 56(3), 259–263.
- Lichtenegger, L. E. (2012). *Studien zur Züchtung von scharkaresistenten Klonen der Europäischen Pflaume *Prunus domestica* (L.) und zu deren Umweltstabilität*. Dissertation Technische Universität München.
- Lichtenegger, L., Treutter, D., Neumüller, M., & Hartmann, W. (2012). *Prunus domestica* cultivar “Ortenauer” confers hypersensitivity resistance to seedlings when used as parent: Studies on the inheritance of hypersensitivity resistance to the plum pox virus. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 968, 167–170.
- Lopes, M. S., Sefc, K. M., Laimer, M., & Da Camara Machado, A. (2002). Identification of microsatellite loci in apricot. *Molecular Ecology Notes*, 2(1), 24–26.
- López-Moya, J. J., & García, J. A. (2000). Construction of a stable and highly infectious intron-containing cDNA clone of plum pox potyvirus and its use to infect plants by particle bombardment. *Virus research*, 68(2), 99–107.
- López-Moya, J. J., Valli, A., & García, J. A. (2009). Potyviridae. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Lucas, W. J. (2006). Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*, 344(1), 169–84.
- Martínez-Gómez, P., Audergon, J. M., & Dicenta, F. (2000). Efficiency of inoculation of peach GF305 seedlings with Plum pox virus by different methods. *Acta Virologica*, 44, 329–333.
- Martínez-Gómez, P., Sozzi, G. O., Sánchez-Pérez, R., Rubio, M., & Gradziel, T. M. (2003). New approaches to *Prunus* tree crop breeding. *Food, Agriculture & Environment*, 1(1), 52–63.
- Messina, R., Lain, O., Marrazzo, M. T., Cipriani, G., & Testolin, R. (2004). New set of microsatellite loci isolated in apricot. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 432–434.

- Michelmore, R. W., Paran, I., & Kesseli, R. V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88(21), 9828–9832.
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W., & Arús, P. (2005). Development and transportability across *Prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites. *Molecular Ecology Notes*, 5(3), 531–535.
- Nagyová, A., Kamencayová, M., Glasa, M., & Šubr, Z. W. (2012). The 3'-proximal part of the Plum pox virus P1 gene determinates the symptom expression in two herbaceous host plants. *Virus genes*, 44(3), 505–512.
- Nemeth, M. (1994). History and importance of plum pox in stone-fruit production. *Eppo Bulletin*, 24, 525–536.
- Neumüller, M. (2005). *Die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume (Prunus domestica L.) gegenüber dem Scharkavirus (Plum pox virus)*. Dissertation Universität Hohenheim.
- Neumüller, M. (2011). Fundamental and applied aspects of plum (*Prunus domestica*) breeding. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* (pp. 139–156). Global Science Books.
- Neumüller, M., & Hartmann, W. (2008). The phenotypically quantitative nature of hypersensitivity of European plum (*Prunus domestica* L.) against the Plum pox virus and its description using the hypersensitivity index. *Horticultural Science*, 35, 50–64.
- Petri, C., Webb, K., Hily, J.-M., Dardick, C., & Scorza, R. (2008). High transformation efficiency in plum (*Prunus domestica* L.): a new tool for functional genomics studies in *Prunus* spp. *Molecular Breeding*, 22(4), 581–591.
- Petruschke, M., & Schröder, M. (1999). Scharka-Resistenzverhalten von neuen Hohenheimer Zwetschenkreuzungen. *Obstbau*, 24, 166–169.
- Predajňa, L., Nagyová, A., & Šubr, Z. (2010). Simple and efficient biolistic procedure for the plant transfection with cDNA clones of RNA viruses. *Acta Virologica*, 54, 303–306.
- Qureshi, S. N., Saha, S., Kantety, R. V., & Jenkins, J. N. (2004). EST-SSR: a new class of genetic markers in cotton. *The Journal of Cotton Science*, 8, 112–123.
- Raccah, B., Huet, H., & Blanc, S. (2001). Potyviruses. In K. F. Harris, P. S. Oney, & J. E. Duffus (Eds.), *Virus-Insect-Plant Interactions* (pp. 181–200). San Diego: Academic Press.
- Ravelonandro, M. (2011). 8th SharCo-Meeting, mündliche Mitteilung (15.11.2011). Freising, Deutschland.
- Riechmann, J. L., Laín, S., & García, J. A. (1990). Infectious in vitro transcripts from a plum pox potyvirus cDNA clone. *Virology*, 177, 710–716.
- Rubio, M., Martinezgomez, P., & Dicenta, F. (2008). Study of long-distance movement of Plum pox virus (Sharka) as an alternative resistance-evaluation method in *Prunus*. *Scientia Horticulturae*, 118(3), 223–227.

- Ruiz, E. M. V., Soriano, J. M., Romero, C., Zhebentyayeva, T., Terol, J., Zuriaga, E., Llácer, G., et al. (2011). Narrowing down the apricot Plum pox virus resistance locus and comparative analysis with the peach genome syntenic region. *Molecular Plant Pathology*, 12, 535–547.
- Salvador, B., Delgadillo, M. O., Sáenz, P., García, J. A., & Simón-Mateo, C. (2008). Identification of Plum pox virus pathogenicity determinants in herbaceous and woody hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(1), 20–29.
- Salvador, B., & García, J. A. (2006). Causal agent of sharka disease: Plum pox virus genome and function of gene products. *OEPP/EPPO Bulletin*, 36, 229–238.
- Schlötterer, C., & Tautz, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic acids research*, 20(2), 211–215.
- Schröder, M. (2005). Aufgaben der Pflanzenvirologie in Baden-Württemberg. *Beitrag aus der Festschrift*, 2–6.
- Shukla, D. D., Ward, C. W., & Brunt, A. A. (1994). *The Potyviridae* (pp. 74–112). Wallingford: CAB International.
- Soriano, J. M., Domingo, M. L., Zuriaga, E., Romero, C., Zhebentyayeva, T., Abbott, A. G., & Badenes, M. L. (2012). Identification of simple sequence repeat markers tightly linked to Plum pox virus resistance in apricot. *Molecular Breeding*, 30(2), 1017–1026.
- Sosinski, B., Gannavarapu, M., Hager, L. D., Beck, L. E., King, G. J., Ryder, C. D., Rajapakse, S., et al. (2000). Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(3), 421–428.
- Tautz, D., & Renz, M. (1984). Simple sequence are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic acids research*, 12(10), 4127–4138.
- Testolin, R., Marrazzo, T., Cipriani, G., Quarta, R., Verde, I., Dettori, M. T., Pancaldi, M., et al. (2000). Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome*, 43(3), 512–20.
- Thompson, D. (2006). Control and monitoring: control strategies for Plum pox virus in Canada. *EPPO Bulletin*, 36(2), 302–304.
- Topp, B. L., Russell, D. M., Neumüller, M., Dalbó, M. A., & Liu, W. (2012). *Plum*. (M. L. Badenes & D. H. Byrne, Eds.) *Fruit Breeding* (pp. 571–621). Boston, MA: Springer US.
- Vidal, E., Moreno, A., Bertolini, E., Pérez-Panadés, J., Carbonell, E. A., & Cambra, M. (2010). Susceptibility of *Prunus* rootstocks to natural infection of Plum pox virus and effect of mineral oil treatments. *Annals of Applied Biology*, 157(3), 447–457.
- Wu, K. K., Burnquist, W., Sorrells, M. E., Tew, T. L., Moore, P. H., & Tanksley, S. D. (1992). The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theoretical and Applied Genetics*, 83(3), 294–300.
- Wu, R. (2002). A Bivalent Polyploid Model for Linkage Analysis in Outcrossing Tetraploids. *Theoretical Population Biology*, 62(2), 129–151.

- Wu, R., Ma, C.-X., & Casella, G. (2004). A mixed polyploid model for linkage analysis in outcrossing tetraploids using a pseudo-test backcross design. *Journal of Computational Biology*, 11(4), 562–580.
- Wünsch, A. (2009). Cross-transferable polymorphic SSR loci in *Prunus* species. *Scientia Horticulturae*, 120(3), 348–352.
- Yamamoto, T., Shimada, T., Imai, T., Yaegaki, H., Haji, T., Matsuta, N., Yamaguchi, M., et al. (2001). Characterization of Morphological Traits based on a genetic linkage map in peach. *Breeding Science*, 51, 271–278.
- Zagrai, I., Zagrai, L., & Ion, L. (2009). The response of different *Prunus* genotypes to D and Rec Strains of Plum Pox Virus. *Bulletin UASMV*, 66(66), 1–7.
- Zhang, Q., Gao, Y. J., Yang, S. H., Ragab, R. A., Saghai Maroof, M. A., & Li, Z. B. (1994). A diallel analysis of heterosis in elite hybrid rice based on RFLPs and microsatellites. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 185–192.

TABELLENVERZEICHNIS

TAB. 2.2-1 AUSGEWÄHLTE ZUCHTKLONE.....	23
TAB. 2.2-2 VERWENDETE CHEMIKALIEN, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND GERÄTE	24
TAB. 2.2-3 ZUSAMMENSTELLUNG DER <i>BULK</i> S FÜR DIE <i>BULK SEGREGANT ANALYSIS</i>	26
TAB. 2.2-4 AUSGEWÄHLTE SSR MARKER-SERIEN	27
TAB. 2.2-5 EINSTELLUNGEN DER PCR	27
TAB. 2.3-1 VERWENDETE SSR MARKER DER URSPRUNGSSPEZIES <i>P. ARMENIACA</i>	31
TAB. 2.3-2 VERWENDETE SSR MARKER DER URSPRUNGSSPEZIES <i>P. DULCIS</i> , <i>P. SALICINA</i> UND <i>P. AVIUM</i>	31
TAB. 2.3-3 VERWENDETE SSR MARKER DER URSPRUNGSSPEZIES <i>P. PERSICA</i>	32
TAB. 2.3-4 SEGREGATION DER SIEBEN MARKER IN HYPERSENSIBLEN UND NICHT HYPERSENSIBLEN ZUCHTKLONEN.....	33
TAB. 3.2-1 CHEMIKALIEN, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND GERÄTE ZUR BIOLISTISCHEN INOKULATION	43
TAB. 3.2-2 PARAMETER FÜR DIE DURCHFÜHRUNG DER BIOLISTISCHEN INOKULATION	45
TAB. 3.2-3 CHEMIKALIEN, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND GERÄTE ZUR DURCHFÜHRUNG DES DAS-ELISA.46	
TAB. 3.3-1 ANZAHL DER MIT DEN CDNA-KONSTRUKTEN PIC-PPV-NK-GFP UND PIC-PPV-5'BD-GFP INFIZIERTEN IN-VITRO-PFLANZEN	48
TAB. 3.3-2 ERGEBNISSE DER IN-VITRO-VEREDLUNG	49
TAB. 3.3-3 ANZAHL DER MIT DEN VERSCHIEDENEN CDNA-KONSTRUKTEN INFIZIERTEN IN-VITRO-PFLANZEN..	51
TAB. 3.3-4 ANZAHL DER MIT DEN VERSCHIEDENEN CDNA-KONSTRUKTEN INFIZIERTEN IN-VITRO-PFLANZEN..	52
TAB. 4.2-1 ABSTAMMUNG DER UNTERSUCHTEN HYPERSENSIBLEN ZUCHTKLONE	60
TAB. 4.2-2 ÜBERSICHT EXPERIMENT 1	62
TAB. 4.2-3 ÜBERSICHT EXPERIMENT 2	63
TAB. 4.2-4 ÜBERSICHT EXPERIMENT 3	64
TAB. 4.2-5 ÜBERSICHT EXPERIMENT 4	64
TAB. 4.2-6 ÜBERSICHT EXPERIMENT 5	65
TAB. 4.2-7 LISTE ALLER VERWENDETEN PPV-STÄMME UND –ISOLATE	66
TAB. 4.2-8 ÜBERSICHT EXPERIMENT 6	67
TAB. 4.2-9 ÜBERSICHT EXPERIMENT 7	68
TAB. 4.2-10 ÜBERSICHT EXPERIMENT 8	69
TAB. 4.2-11 ÜBERSICHT EXPERIMENT 9	70
TAB. 4.3-1 ERGEBNISÜBERSICHT EXPERIMENT 6	83
TAB. 4.3-2 ERGEBNISÜBERSICHT EXPERIMENT 7	84
TAB. 4.3-3 ÜBERSICHT DER VEREDLUNGSVARIANTEN	84
TAB. 4.3-4 ÜBERSICHT ÜBER DIE REAKTIONEN DER EINZELNEN VEREDLUNGSPARTNER NACH PPV- INOKULATION	87
TAB. 4.3-5 ERGEBNISSE EXPERIMENT 9	88
TAB. 4.3-6 ERGEBNISSE EXPERIMENT 10	89

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1.1-1 WELTWEITE VERBREITUNG DES SCHARKAVIRUS	2
ABB. 1.2-1 VERSCHIEDENE PPV-SYMPTOME BEI <i>PRUNUS DOMESTICA</i> L.	3
ABB. 1.3-1 REAKTION DES VIRUS UND DER PFLANZE NACH VIRUSINOKULATION	7
ABB. 1.3-2 MÖGLICHE HYPERSENSIBLE REAKTIONEN BEI <i>PRUNUS DOMESTICA</i> L.	10
ABB. 2.2-1 AUFSPALTUNG DER NACHKOMMEN DER VERWENDETEN KREUZUNGSKOMBINATIONEN.....	22
ABB. 3.2-1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PPV-CDNA-KLONE DC (BLAU), NK (BEIGE), SWCM (ROT) UND DER DARAUS ENTSTANDENEN CHIMÄREN	42
ABB. 3.3-1 PPV-INFIZIERTE IN-VITRO-PFLANZEN	48
ABB. 3.3-2 GFP-EXPRIMIERUNG IN DER ANFÄLLIGEN SORTE 'HAUSZWETSCHKE, TYP SCHÜFER'	50
ABB. 4.2-1 ÜBERSICHT ÜBER DIE VORGENOMMENEN PPV-INOKULATIONEN	69
ABB. 4.2-2 PFLANZPLAN DER VERSCHIEDENEN UNTERLAGEN MIT ANGABE DER PFLANZENANZAHL DER 2010 VEREDELTEN UNTERLAGEN UND DER EDELSORTEN	71
ABB. 4.3-1 REAKTIONEN DES PPV-INFIZIERTEN EDELSORTENAUSTRIEBS	74
ABB. 4.3-2 ERGEBNISÜBERSICHT EXPERIMENT 1	75
ABB. 4.3-3 REAKTION DER SORTE 'HOH 2043' VEREDELT AUF 'DOCERA' 5	75
ABB. 4.3-4 ANZAHL DER PPV-NEGATIVEN EDELSORTEN MIT ANGABE DER UNTERLAGE	76
ABB. 4.3-5 REAKTION DER PPV-INFIZIERTEN SORTEN 'RUBIRA' (PFIRSICH) UND 'CANINO' (APRIKOSE) VEREDELT AUF 'DOCERA 6'	78
ABB. 4.3-6 ERGEBNISÜBERSICHT EXPERIMENT 2	79
ABB. 4.3-7 ERGEBNISÜBERSICHT EXPERIMENT 3	79
ABB. 4.3-8 ERGEBNISÜBERSICHT EXPERIMENT 4	80
ABB. 4.3-9 ERGEBNISSE EXPERIMENT 5.....	81
ABB. 4.3-10 REAKTIONEN VON 'DOCERA 6' AUF PPV-INOKULATION	82
ABB. 4.3-11 REAKTION DER HYPERSENSIBLEN SORTE 'JOJO' DREI MONATE NACH DER PPV-INOKULATION MITTELS INFIZIERTER RINDENSPÄNE ('KATINKA', PPV-D).....	85
ABB. 4.3-12 REAKTION DER HYPERSENSIBLEN SORTE 'JOJO' DREI MONATE NACH DER PPV-INOKULATION MITTELS INFIZIERTER RINDENSPÄNE	86
ABB. 4.3-13 PFLANZPLAN DER SORTEN-UNTERLAGEN-KOMBINATIONEN MIT ANGABE DER ANZAHL DER INFIZIERTEN <i>BULKS</i> DER SORTEN UND UNTERLAGEN.....	89
ABB. 4.3-14 SCHNITT DURCH DIE VEREDLUNGSSTELLE ZWISCHEN DER HYPERSENSIBLEN UNTERLAGE 'DOCERA 5' UND EINEM PPV-FREIEN RINDENSPAN ('KATINKA')	91
ABB. 4.3-16 SCHNITT DURCH DIE VEREDLUNGSSTELLE ZWISCHEN DER HYPERSENSIBLEN UNTERLAGE 'JOJO' UND EINER PPV-FREIEN (A) ODER EINER PPV-INFIZIERTEN (B) SORTE ('KATINKA') MITTELS SPALTPFROPFUNG	92
ABB. 4.3-15 SCHNITT DURCH DIE VEREDLUNGSSTELLE ZWISCHEN DER HYPERSENSIBLEN UNTERLAGE 'DOCERA 5' UND EINEM PPV-INFIZIERTEN RINDENSPAN ('KATINKA')	92

ANHANG

Tabelle I Größenangabe [bp] der in der SSR-Marker-Analyse erhaltene Amplifikate
Angabe jeweils für die Elternsorten

SSR	Stanley	Ortenauer	Jubiläum	Hoh 4517
AMPA100	141 143 149 175	133 141 149	133 143	133 149
AMPA101	179 185 200 208 242	175 179 187 198 204	179 189 200 244	175 187 204 208
AMPA107	193	171 206	167 193	171 179 193
AMPA109	205 212 214 216	199 205 212 238	199 205 216	199 214
AMPA121	100 177 269 276 291	100 177 270 272 274 277	100 177 263 268 270	100 177 265 276 291
AMPA123	183 192 195 202	178 186 196	183 194 197 202	181 183 196 202
BPPCT001	140 144 172	121 139 145	142 149 172	138 143 172
BPPCT007	126 130 136 143 151	128 138 145		126 130 136
BPPCT008	93 103 117 121	95 113 121 191 195	93 99 103 116 121 124	93 116 121 191
BPPCT009	121 134 138 145 152 164	134 138 145 164	121 138 145 152 164	121 134 138 145 152 164
BPPCT010	111 116 120 129	120 137 142	116 120 129 137 142	116 120 129 137 142
BPPCT011	147 166 168 170	166 168	166 170	147 168 170
BPPCT012	124 130 144 163	144 148 163 166	141 148	124 144 169
BPPCT022	90 97	90 97	90 97	90 97
BPPCT024	77 90 94 98 102	88 98 110	77 90 102 104 110	94 98 104 110
BPPCT025	156 172 185	166 177 180 185 196	156 161 181	156 161 166 172
BPPCT030	136 146	136 146 173	136 146 181	136 146
BPPCT036	237 436	436	252 428 434	237 255 436
BPPCT040	130 134 147 149	128 134 149 155	124 130 134 149	126 130 149
BPPCT041	206 222 224 230	208 216 219 222	206 212 224	212 216 221 225 230
CPDCT008	187 201 206 236	189 205 215 230	189 201 204 236	187 201 204
CPDCT016	135 150 168 191	135 143 148	131 134 178	139 144 148 171 180
CPDCT023	168 173 186 193	168 186	168	168 193
CPDCT028	179	132 143 147 167 189	132 141 179	143 147 167 185
CPDCT044	199 218 234 241 261	162 216 245 253	216 222 234 236 243	199 216 222 240 253 261
CPDCT045	122 126 134 151	122 126 136	126 128 134 136	122 126 128 134 136
CPPCT025	216 218	216	216 218	216 218
CPPCT052	105 142 146 152 157	105 137 139 142 148	105 133 139 146 152 157	105 136 139 148
CPPCT23	166	166 168	166	166
CPPCT24	139 155 162 169 183 187	155 162 179 196	139 155 160 169 183	155 160 169 183 187 196
CPSCT012	139 154 160 168	160 166 170	139 143 154 160	154 160 170
CPSCT021	125 132 153 176	132 134 149 153 185	132 147 149 157 162 172	125 132 134 143 147 149
CPSCT022	151 169 187 197	151 169 192	169 187 195	151 183 193 203
CPSCT027	111 159 173	156 164 171 177	111 145 160 184	160 171 177 191 196
EPDCU3489	156 173	156 158 173	156 158	154 158 173
EPPB4217	107 117 124	107 115	107 117	107 116
EPPB4225	122 140 142 150 162	103 138 142 150 152	140 142 146 150 160 180	103 140 142 150 152 160
EPPB4230	178 208 212 214 223	178 211 214 223	182 207 213 222	178 208 210 212 223
EPPCU0004	173 181 186 184 192	173 181 186 184	173 184 186	173 181 184 186

EPPCU1090	118	157	118	157
EPPCU1775	150 154 167 173	146 148 152	150 171	152
EPPCU1902	167 169	167 169 173	165 167 169 177	165 167 169 173
EPPCU2005	154 156 164 166 168	151 154 158 166 168	151 158 164 166	154 156 158 164 166
EPPCU2256	150 152 163 168 173 179	179	148 150 152 180	148 150 152 168 178
EPPCU3664	96	90 97 100	96 100	96 100
EPPCU4921	114 118	114 118	114 118	114 118
EPPCU5176	97 101 105	97 101 105	97 101 105	97 101 105
EPPCU5516	157 162 167 172	157 163 170	162 167	157 163 168 170
EPPCU9168	174 176 178 180	174 176 178 180	174 176 178 180	174 176 178 180
EPPCU9268	187	187	187	187
EPPCU9300	122 134 144	122 134 144 154	122 134 144	124 136 144 149
EPPCU9338	174 184 197 200	174 194 200 220 226	194 197 200 223 174	197 200 223 229 174 202
EPPCU9343	193 197 201	188 193 212 218	189 193 197	189 193 197 201 212
EPPCU9366	215 217	213 215 219	213 215 217	213 215 217
M12a	163 169 183 218	163 175 187 198 205 218	163 173 179 187 196 217	163 171 183 187 205 217
M6a	179 182 200 205 229	190 205 223 227	200 205 227	190 198 200 205
MA005c	172 174 177 179	185 190	148 179 193	170 185 179 194
MA010a	103 108 111 116	108 116	107 109 116	103 107 111 116
MA013a	152 183 195 208 218	193 195 208 224	191 195 208 226	171 193 195 208 224
MA015a	292 294 314 318 332	294 298 300 314	292 294 318	292 294 300 318
MA017a	98 125 127 153 181	49 82 98 125 127	49 82 98 125 127	49 82 98 125 127 181
MA020a	160 172 188 195	174 177 190	170 188	172 186
MA027a	93 107 128	95 113 132 138	87 136	93 113 136 138 173
MA039a	170 178 184	170 176 178	170 176 180	170 178 184 196
PacA10	85 87 89 93	85 87 111 115 124 127	85 113 115	85 87 89
PacA18	150 167 173 181	165 171 181	159 168 182 194	166 171 181
PacA33	184 191 201	172 176 182 184 188 190	174 176 184 194	176 183 191
PacA49	102 115 249	96 102 110 115 246	96 101 105 115 245 250	102 115 245 250
PacB26	170 185 187 191	185 187 191	181 183 187 189 193	181 187 193
PacB35	225 231 235	228 233	217 231	220 223 228 233 235
PacC13	115 125 127 141	84 89 115 123 125 127	84 113 123 145	84 115 125 141 145
PacC25	185 187 195	185 189 195	185 187 195	185 195
PacC3	128 140	128 140 163	128 140 163	128 140 163
PACITA12	131 142 168	131 142	131 142 165	131 142 144 168
pchcms04	215 219 221 233 238 241	214 219 221 236 241	215 221 233 241	215 221 233 238 242
pchgms10	221 224 227	221 224	221 224 227	221 224
PMS67	141 152	145 147 152	141 151 158	145 147 152
UDAp-407	194 207 217 225 262	217 221 225 230 244	194 225 244 260	207 217 225 244
UDAp-415	129 159 169 175	129 142 167	129 144 150 160	129 142 159 167
UDAp-416	71 81 88 100	81 88 102	81 88 96 100	81 88 96 100
UDAp-420	169 176	152 157 169 186 176	159 169 186 176	152 157 169 176
UDAp-422	155 185 187 191	170 180 193	155 173 181 189	180 187 191
UDAp-436	102 107	102	102 106 108	102
UDAp-439	96 100	90 112 120	90 96 116	88 112 120
UDAp-444	111 113 129 139 143 168	103 111 115 139 145 156	111 113 129 137 166	111 113 115 137 139 170
UDAp-446	126 132 140 144 154	140 151 163	140 144 154 161	122 132 140 151 161

UDAp-456	139 141 143 152	133 139 141 145	139 143 152	137 141 143 188
UDAp-457	146	150	149 170	136 145 162 174
UDAp-467	203 211 215 231 234	zu klein	203 209 217 222	209 215 220 233
UDAp-472	160 166 172 182 202	160 178 200 209	160 166 184	160 172 178 182 209
UDAp-485	166 177 193	166 180 193 198	171 174 193 201	168 180 193 198
UDP96-003	79 82	79 82	79 82	79 82
UDP96-005	106 109 115 132 138	115 132	106 109 128 138 149	116 132 138
UDP96-008	133 141 143	123 131 135 137 141	131 133 141 143	131 133 137 141 143
UDP96-018	104 237 258 264 281	104 237 258 266 274 281	104 237 266 274 281	104 237 262 266 274 281
UDP98-024	93 114	76 114	76	76 93 100 114
UDP98-409	123 146	127 148	145	123 148
UDP98-410	129 135 140	131 135 140 150	129 131 135 142	129 131 135 137 142
UDP98-411	143 157 165 182	121 145 162 167 186 196	121 147 158 174 181 186	121 158 162 166 181 186
UDP98-412	95 100 106 113 139	100 106 113 231	95 106 109 133	95 103 109 113 139 231
UDP98-416	83	83	83	83

VERÖFFENTLICHUNGEN

- Mühlberger L., Neumüller M., Treutter D.: Reaction of PPV infected scions of European plum genotypes (*Prunus domestica* L.) grafted onto rootstocks with hypersensitivity resistance to PPV.
45. Gartenbauwissenschaftliche Tagung, Berlin (D), 25.-28.02.2009
- Mühlberger L., Neumüller M., Treutter D.: Reaction of PPV infected scions of European plum genotypes (*Prunus domestica* L.) grafted onto rootstocks with hypersensitivity resistance to PPV.
21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Neustadt (D), 05.-10.07.2009
- Mühlberger L., Paskaš K., Neumüller M., Treutter D.: Distribution of the Plum pox virus in different genotypes of European plum (*Prunus domestica* L.).
47. Gartenbauwissenschaftliche Tagung, Hannover (D), 23.-26.02.2011
- Neumüller M., Mühlberger L., Siegler H., Hartmann W., Treutter D. (2013). New rootstocks with resistance to Plum pox virus for *Prunus domestica* and other stone fruit species: The 'Docera' and 'Dospina' rootstock series.
Acta Horticulturae (ISHS), 985, 155-165.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken:

- Herrn Prof. Dr. Dieter Treutter für die Überlassung des Projektes und die uneingeschränkte Unterstützung während meiner gesamten Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Wolfgang Oßwald für die Übernahme des Zweitprüferamtes sowie Frau Prof. Dr. Brigitte Poppenberger-Sieberer für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.
- Frau Dr. Véronique Decroocq (INRA, Bordeaux) für die fachliche Beratung zur Markeranalyse und, auch Patrick Lambert (INRA, Avignon), für die Überlassung von Primersequenzen.
- Herrn Prof. Dr. Juan Antonio García (CSIC, Madrid) für den fachlichen Austausch und die Diskussion sowie Dr. Bernardo Rodamilans und Maria Calvo für die zur Verfügungstellung von isolierten Plasmiden.
- Dr. Peter Westermeier für die Ermöglichung der Durchführung der Markeranalysen am Institut für Pflanzenzüchtung und dem gesamten Laborteam des Instituts für Pflanzenzüchtung für das freundliche Entgegenkommen und die ständige Hilfsbereitschaft.

Ein großes Dankeschön an das gesamte Obstbau-Team, vor allem an

Herrn Dr. Michael Neumüller für die stetige Hilfestellung und Diskussionsbereitschaft und für das entgegengebrachte Vertrauen in allen Lebenslagen, außerdem auch für die Korrektur des Manuskripts,

Ina Tittel für die Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Präparate, das Gewebelabor-Team für die Vermehrung und Kultivierung der Pflanzen und das Gärtner-team für die Veredlung und Betreuung der Versuchspflanzen.

Die Zeit am Institut für Obstbau wird mir immer in positiver Erinnerung bleiben!

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und vor allem bei meinem Freund Chris für die unendliche Geduld und das Verständnis.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Louisa Mühlberger
 Geburtsdatum, Ort: 17. Mai 1979, Prien am Chiemsee
 Wohnsitz: Hopfenstraße 17, 84144 Geisenhausen

Schulbildung und akademische Ausbildung

09/1986 – 07/1990 Volksschule Geisenhausen
 09/1990 – 07/1997 Maximilian-von-Montgelas Gymnasium in Vilsbiburg (neusprachlich)
 09/2000 – 07/2002 Staatl. Berufsoberschule Landshut (wirtschaftlich)
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
 10/2002 – 07/2007 Studium der Biologie, Technische Universität München
 Abschluss: Diplom
 06/2008 – 03/2012 Promotion am Fachgebiet Obstbau, WZW, TUM, Prof. Dieter Treutter

Berufserfahrung und sonstige Ausbildung

01/1998 – 07/2000 Ausbildung zur Industriekauffrau,
 VS Lichtsysteme GmbH, Landshut
 08/2000 – 08/2007 Teilzeitbeschäftigung als Industriekauffrau,
 VS Lichtsysteme GmbH, Landshut
 09/2007 – 06/2008 Chemisch-technische Assistentin,
 Loewe Biochemica GmbH, Sauerlach
 05/2012 – 08/2012 Anwendungsspezialistin im Technischen Kundenservice,
 Tem International GmbH, München
 seit 04/2013 Angestellte im Bereich Produktentwicklung,
 n-tec GmbH, Essenbach-Altheim